

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**MESTRADO EM QUÍMICA**

**Raïssa Ainsworth Rustichelli Teixeira**

**Síntese de nanopartículas de ouro modificadas para interações específicas *in vitro* com células neoplásicas**

**Juiz de Fora**

**2018**

**Raissa Ainsworth Rustichelli Teixeira**

**Síntese de nanopartículas de ouro modificadas para interações específicas *in vitro* com células neoplásicas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Físico-química

Orientador: Dr. Antônio Carlos Sant'Ana

**Juiz de Fora**

**2018**

**Raissa Ainsworth Rustichelli Teixeira**

**Síntese de nanopartículas de ouro modificadas para interações específicas *in vitro* com células neoplásicas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Físico-química

Aprovada em 23 de fevereiro de 2018

*Dedico este trabalho aos meus pais, Sérgio e Taïssa, que, com muito amor, sempre me apoiaram, acreditaram em mim e não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por mais uma conquista.

Aos meus pais Sérgio e Taïssa pelos ensinamentos de vida, pelo que me proporcionam durante todos esses anos, pelo apoio incondicional, por me mostrarem que tudo é possível quando sabemos o que queremos, por estarem sempre presentes e, principalmente, por todo o amor e carinho.

Às minhas irmãs Paula e Marina pelo carinho e exemplos de perseverança.

Ao Luiz Augusto por toda a paciência, carinho, incentivo, amor e por estar sempre comigo quando preciso.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antônio Carlos Sant'Ana por toda a sua paciência, ensinamentos, conversas filosóficas, atenção e pela sua amizade.

Ao Prof. Dr. Gustavo Fernandes Souza Andrade por todos os ensinamentos passados, incentivos e atenção.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Sodré Costa pela orientação durante a graduação, pela realização de cálculos teóricos, pela atenção e amizade.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Nádia Rezende Barbosa Raposo e seu aluno de mestrado Alexandre Lataliza pela realização dos ensaios biológicos, pela disposição de querer colaborar no trabalho, pela paciência e amizade.

A todos os colegas e ex-colegas de trabalho do Laboratório de Nanoestruturas Plasmônicas (LabNano) por me receberem tão bem, por se disponibilizarem a ajudar.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho ou para a minha formação acadêmica.

À UFJF pela disponibilização de recursos, espaço para pesquisa, professores e bolsa de mestrado.

Ao CNPq e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

*“The distance between your dreams and reality is called action”*

(Autor desconhecido)

## RESUMO

O presente trabalho visou a construção de um sistema utilizando nanopartículas de ouro (AuNPs) juntamente com as biomoléculas direcionadoras, ácido fólico (HFol) e anticorpo anti-receptor de folato, para aplicação em testes *in vitro* com células de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7 a fim de promover um sistema de entrega controlada dos fármacos anastrozol e tamoxifeno. Entre os diferentes adsorbatos utilizados, as interações do cristal violeta (CV), mercaptoetanol (ME), HFol, polímero PEGSH, anastrozol e tamoxifeno, foram analisadas através das técnicas espectroscópicas eletrônica (UV-VIS-NIR), Raman e espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS). A espectroscopia SERS foi aplicada, também, para mapeamento do sinal do CV (marcador SERS) dos sistemas completos em células de câncer MCF-7 a fim de avaliar o efeito da presença e ausência das biomoléculas direcionadoras na afinidade com as células. O mapeamento realizado mostrou a importância da presença do anticorpo aumentando de 13%, no sistema sem nenhum identificador celular, para 30% do sinal de CV, no sistema com apenas anticorpo como biomolécula direcionadora, e aumentou de 30% para 65% na presença do HFol. As AuNPs modificadas com HFol e anticorpo, quando conjugadas com tamoxifeno, diminuíram a concentração mínima efetiva do fármaco na ação contra as células MCF-7, mostrando-se um sistema com potencial aplicação para entrega controlada de fármacos.

Palavras-chave: Nanopartículas de ouro. Espectroscopia SERS. Câncer.

## ABSTRACT

The present work was aimed on the construction of a system using gold nanoparticles (AuNPs) with two targeting biomolecules, folic acid (HFol) and anti-folate receptor antibody, for application on *in vitro* tests with breast cancer cells MDA-MB-231 and MCF-7 to form a drug delivery system with anastrozole and tamoxifen. Among the different used adsorbates, the interactions of crystal violet (CV), mercaptoethanol (ME), HFol, polymer (PEGSH), anastrozole and tamoxifen, were analysed through electronic spectroscopy (UV-VIS-NIR), Raman and Surface Enhanced Raman Scattering (SERS). SERS spectroscopy was also applied on mapping of CV signal (SERS marker) of the complete systems with cancer cells MCF-7 in order to evaluate the effect of the presence or absence of these targeting biomolecules on the affinity with cancer cells. The performed mapping showed the relevance of the presence of the antibody by increasing from 13%, on the system with no biomolecules, to 30% of the CV signal, on the system with just antibody as biomolecule and increased from 30% to 65% in presence of HFol. AuNPs modified with folic acid and antibody, when conjugated with tamoxifen, reduced the minimum effective concentration of the drug in the action against MCF-7 cells, indicating that this system has a potential to be applied as a drug delivery system.

Keywords: Gold nanoparticles. SERS spectroscopy. Cancer.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos fármacos anastrozol (a) e tamoxifeno (b). .....	19
Figura 2 - Esquema de níveis de energia representando espalhamentos Rayleigh (a) Stokes (b) e Anti-Stokes (c). .....	22
Figura 3 - Excitação coletiva de elétrons em esferas metálicas .....	25
Figura 4 - Gráfico do fator Q x comprimento de onda para diversos metais. ....	27
Figura 5 - Espectro SERRS do cristal violeta ( $1,0 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> ) adsorvido sobre AuNP .....	35
Figura 6 - Estrutura molecular do cristal violeta .....	36
Figura 7 - Estrutura molecular do mercaptoetanol .....	37
Figura 8 - Estudo cinético por espectroscopia UV-VIS-NIR da adsorção do mercaptoetanol ( $1,0 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> ) na superfície das AuNPs .....	37
Figura 9 - Espectro SERS do mercaptoetanol ( $1,0 \times 10^{-5}$ mol L <sup>-1</sup> ) adsorvido em AuNP.....	38
Figura 10 - Estrutura molecular do ácido fólico.....	39
Figura 11 - Espectros UV-VIS-NIR da AuNP com ácido fólico, em diferentes concentrações, adsorvido na superfície metálica .....	40
Figura 12 – Espectros experimentais SERS do ácido fólico adsorvido em superfície de AuNPs (a) e Raman do sólido (b). .....	41
Figura 13 - Estrutura molecular do PEGSH .....	42
Figura 14 - Espectro UV-VIS-NIR da síntese etapa por etapa.....	42
Figura 15 - Comparação de espectros experimentais SERS do anastrozol adsorvido em superfície de AuNP (a) e Raman do sólido (b). Espectro SERS com correção de linha de base. ....	44
Figura 16 - Estrutura otimizada da molécula de anastrozol livre .....	45
Figura 17 - Comparação dos espectros SERS do tamoxifeno adsorvido em superfície de ouro experimental (a), teórico com um átomo de ouro (b) Raman do sólido experimental (c) e o espectro teórico do tamoxifeno livre (d).....	47
Figura 18 - Estrutura otimizada da molécula de tamoxifeno livre .....	48
Figura 19 - Estrutura otimizada da molécula de tamoxifeno com um átomo de ouro .....	49

Figura 20 - Resultados de ensaio de viabilidade celular com absorvância em 540 nm de células MDA-MB-231 tratadas durante 48h com cristal violeta (a), mercaptoetanol (b), PEGSH (c) e ácido fólico. ....	51
Figura 21 - Resultado de ensaio de viabilidade celular com absorvância em 540 nm de células MDA-MB-231 tratadas durante 48h com cada etapa de montagem da síntese.....	52
Figura 22 - Placa de 96-poços revelada com MTT com amostras tratadas com anastrozol puro (7.1 - 7.8) e anastrozol com o sistema nanoestruturado (6.1 - 6.8) .....	52
Figura 23 - Resultado ensaios de viabilidade celular com absorvância em 540 nm de células MDA-MB-231 tratadas durante 48h com anastrozol com a síntese completa do sistema nanoestruturado (a) e anastrozol puro (b).....	53
Figura 24 - Esquema de diluição seriada.....	54
Figura 25 - Resultado ensaios de viabilidade celular com absorvância em 540 nm de células MDA-MB-231 tratadas durante 48h com soluções diluídas do sistema nanoestruturado sem fármaco. ....	55
Figura 26 - Resultado ensaios de viabilidade celular com absorvância em 540 nm de células MDA-MB-231 tratadas durante 48h com anastrozol .....	55
Figura 27 - Resultado ensaios de viabilidade celular com absorvância em 540 nm de células MCF-7 tratadas durante 48h com anastrozol.....	56
Figura 28 - Resultados de ensaio de viabilidade celular com absorvância em 540 nm de células MCF-7 tratadas durante 48h com cristal violeta (a), mercaptoetanol (b), PEGSH (c) e ácido fólico. ....	57
Figura 29 - Resultado ensaios de viabilidade celular com absorvância em 540 nm de células MCF-7 tratadas durante 48h com soluções diluídas do sistema nanoestruturado sem fármaco .....	58
Figura 30 - Resultado ensaios de viabilidade celular com absorvância em 540 nm de células MCF-7 tratadas durante 48h com tamoxifeno.....	60
Figura 31 - Resultado ensaios de viabilidade celular com absorvância em 540 nm de células MCF-7 tratadas durante 48h com AuNP modificada com ácido fólico conjugada com tamoxifeno (a) e AuNP modificada com ácido fólico e anticorpo conjugada com tamoxifeno (b).....	61
Figura 32 - Resultados de ensaio de viabilidade celular com absorvância em 540 nm de células MCF-7 tratadas durante 48h com AuNP modificada com ácido fólico e anticorpo (a), AuNP modificada com ácido fólico (b) e anticorpo (Anti-FOLR1) (c). ....	62
Figura 33 - Mapeamento do sinal do cristal violeta em células de câncer MCF-7. Lamínula de vidro com células, tratadas com AuNP modificadas, fixadas (a), intensidade do sinal da banda	

em  $1150\text{ cm}^{-1}$  dos espectros SERS do CV em cada ponto analisado (b) e padrão espectral do CV em cada ponto analisado (c)..... 63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atribuição vibracional de bandas do anastrozol.....	44
Tabela 2 - Atribuição vibracional de bandas selecionadas do tamoxifeno.....	48
Tabela 3: Descrição de componentes presentes nas amostras de etapas de montagem da síntese .....	50
Tabela 4 - Relação de montagem de nanosistema com percentual de sinal do CV em interação com células de câncer MCF-7 .....	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial de Saúde
DNA	Ácido desoxirribonucleico
INCA	Instituto Nacional de Câncer
NIH	National Cancer Institute
ER	Receptor de estrógeno
AuNPs	Nanopartículas de ouro
RNA	Ácido ribonucleico
LSPR	Localized Surface Plásmion Resonance
LSP	Localized Surface Plásmion
SERS	Surface Enhanced Raman Spectroscopy – espalhamento Raman intensificado por superfície
CV	Cristal violeta
ME	Mercaptoetanol
Anti-FOLR1	Anticorpo anti-receptor de folato
HFol	Ácido fólico
PEGSH	Poli(etileno glicol) metil eter tiol
MDA-MB-231	Linhagem celular de carcinoma mamário
PR	Progesterona
AR	Aromatase
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7 - Linhagem celular de carcinoma mamário
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromida
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium
FBS	Tampão de fosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
NIQUA	Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
<b>1.1 Câncer</b> .....	17
<b>1.2 Nanopartículas de ouro aplicadas a sistemas de carreamento de fármacos</b> .....	19
<b>1.3 Espectroscopia Raman</b> .....	20
<b>1.4 Nanopartículas plasmônicas</b> .....	24
<b>1.5 Efeito SERS</b> .....	25
<b>1.6 Aplicações</b> .....	28
2. OBJETIVOS .....	29
<b>2.1 Objetivos específicos</b> .....	29
3. METODOLOGIA.....	30
<b>3.1 Instrumentação</b> .....	30
3.1.1 Espectroscopia Raman e espectroscopia SERS.....	30
3.1.2 Espectroscopia UV-VIS-NIR .....	30
<b>3.2 Reagentes</b> .....	30
<b>3.3 Limpeza das vidrarias</b> .....	31
<b>3.4 Síntese das nanopartículas de ouro modificadas</b> .....	31
<b>3.5 Interações dos cultivos celulares com AuNPs modificadas</b> .....	32
3.5.1 Teste de citotoxicidade com células tumorais .....	32
3.5.2 Mapeamento do marcador nas células.....	33
3.5.3 Análise estatística .....	34
<b>3.6 Cálculos computacionais</b> .....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	35
<b>4.1 Caracterizações espectroscópicas</b> .....	35

4.1.1	Cristal violeta.....	35
4.1.2	Mercaptoetanol .....	36
4.1.3	Ácido fólico .....	39
4.1.4	PEGSH.....	41
4.1.5	Anastrozol.....	43
4.1.6	Tamoxifeno.....	46
<b>4.2</b>	<b>Testes <i>in vitro</i> .....</b>	<b>49</b>
4.2.1	MDA-MB-231 .....	49
4.2.2	MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7).....	56
<b>4.3</b>	<b>Mapeamento SERS .....</b>	<b>62</b>
5.	CONCLUSÕES .....	65
6.	PERSPECTIVAS FUTURAS .....	66
	REFERÊNCIAS .....	67

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer

O diagnóstico, tratamento e cura para diversas doenças têm sido um grande desafio para as áreas de pesquisa na ciência. Entre as doenças de maior destaque, o câncer tem sido motivo de grandes pesquisas para desenvolvimento de técnicas de diagnóstico, drogas para tratamento e a eventual cura. O câncer de mama ainda é considerado o tipo mais frequente em mulheres e, também, o maior responsável por mortes. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que até o ano de 2030 haverá cerca de 27 milhões de casos incidentes no mundo (**Estimativa 2016, Incidência de Câncer no Brasil, 2015**).

O termo “câncer” é usado para definir um grupo que inclui mais de 100 doenças que têm como característica comum o crescimento desordenado de células. Células normais requerem sinais de crescimento mitogênico para passar de um estado quiescente para um estado ativo de proliferação. Estes sinais são transmitidos para a célula por receptores transmembranares que se ligam a moléculas de sinalização (fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular e moléculas de adesão/interação célula-célula). Muitos dos oncogenes têm o potencial para imitar estes sinais de crescimento fazendo com que células tumorais tenham sua dependência significativamente reduzida a estes estímulos de crescimento (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

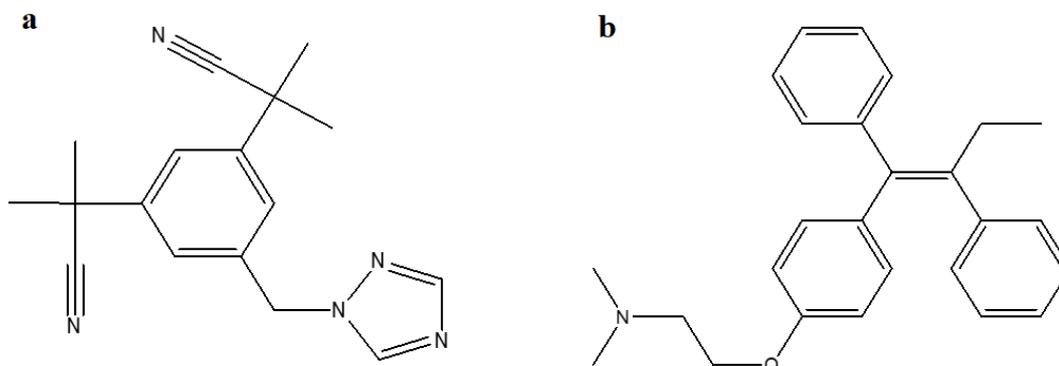
Além das células de câncer serem autossuficientes para sinais de crescimento e terem um potencial ilimitado para replicação celular, estas células podem invadir outros tecidos e órgãos espalhando-se, assim, para outras partes do corpo, no processo conhecido como metástase. Os fatores que fazem com que células se tornem malignas são bastante variados, no entanto acredita-se que apenas 5-10% dos casos de câncer pode ser atribuído a defeitos genéticos. Os outros 90-95% dos casos são conferidos a efeitos externos variados, como poluição, exposição ao sol, infecções, consumo de cigarro entre outros (ANAND *et al.*, 2008).

Os tratamentos mais utilizados atualmente são a radioterapia, cirurgia e a quimioterapia (QIN *et al.*, 2017). A radioterapia é um método que envolve a incidência de radiação ionizantes no volume que engloba o tumor e age danificando o DNA do tecido tumoral

(INCA, 2017). O procedimento cirúrgico é um método primário embora seja bastante aplicado, com finalidade curativa ou paliativa, e mais efetivo em casos em que o câncer é sólido e isolado. A quimioterapia é um procedimento que utiliza vários compostos químicos (antineoplásicos), que atuam em conjunto nas células de câncer em diferentes fases do ciclo celular matando as células e impedindo que avancem para outros tecidos (INCA, 2017). A escolha dos fármacos nesse tratamento varia de acordo com o tipo de câncer e pode ser aplicado conjuntamente com a radioterapia e cirurgia, dependendo da abordagem do tratamento e o estágio da doença (NIH, 2017).

No organismo humano, em situações anormais, o descontrole na produção de hormônios, como estrógeno e progesterona, pode ocasionar o surgimento de cânceres, como é o caso de alguns tipos de câncer de mama. Neste caso, a abordagem pode ser o tratamento utilizando fármacos que tem efeito direto no mecanismo de síntese ou distribuição desses hormônios que estimulam o crescimento celular. Um exemplo de fármaco bastante aplicado, tanto para tratamento quanto para prevenção, é o anastrozol (Figura 1). Este, por sua vez, é um inibidor de aromatase, enzima responsável pela aromatização de andrógenos, moléculas que são precursores dos estrógenos (BHATNAGAR, 2007). Outro fármaco, também bastante utilizado para tratamentos antiestrogênicos, é o tamoxifeno (Figura 1). Moléculas antiestrogênicas competem com as moléculas de estrógeno para formar um complexo com o receptor de estrógeno (ER) na célula. Desta forma, o tamoxifeno dificulta a chegada do hormônio ao receptor e, assim, interfere no crescimento celular (WAKELING *et al.*, 1991).

Figura 1 - Estrutura dos fármacos anastrozol (a) e tamoxifeno (b).



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Os tratamentos mais frequentemente utilizados, apesar de serem bastante efetivos, tendem a ser muito agressivos ao corpo humano. Devido à pouca especificidade, estes fármacos atingem as células de câncer, mas acabam afetando células saudáveis também o que, em geral, aumenta o nível de toxicidade desses tratamentos.

## 1.2 Nanopartículas de ouro aplicadas a sistemas de carregamento de fármacos

Tendo em vista a pouca especificidade e alta taxa de toxicidade dos tratamentos convencionais, as pesquisas de novas formas de tratamento têm sido cada vez mais abrangentes. Entre as alternativas de pesquisa, as nanopartículas metálicas tem recebido grande destaque pela eficácia e possibilidade de aplicação em diversos casos, pois apresentam diferentes propriedades funcionais e estruturais. Quando conjugadas com uma biomolécula específica para determinado tecido-alvo, podem ser utilizadas para aumentar a seletividade e afinidade com células de câncer. Considerando as dimensões das nanopartículas de ouro (AuNPs), estas possuem grande área superficial específica, o que permite a conjugação com agente terapêuticos anticancerígenos, favorecendo a aplicação para liberação controlada de fármacos (*drug delivery*) (BOISSELIER e ASTRUC, 2009).

Tratando-se de AuNPs, há várias pesquisas envolvendo sistemas de carreamento de fármacos utilizando agentes biológicos conjugados com AuNPs para melhorar a especificidade e intensificar o efeito do tratamento. Um dos agentes biológicos pesquisados foi o folato, que é uma vitamina necessária para síntese, reparação e funcionamento do DNA e RNA. Sendo assim, interfere diretamente na manutenção da células e tem grande importância quando se trata de crescimento (Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline, 1998). Todas as células possuem receptores de folato, no entanto células de câncer tem uma concentração muito maior destes receptores na superfície celular. Portanto células neoplásicas tem uma demanda muito maior desta vitamina comparado a células normais (WANG e LOW, 1998).

A conjugação de nanopartículas de prata com ácido fólico (HFol) foi aplicada por Boca-Farcu e colaboradores para verificar a eficácia no tratamento de câncer de ovário. Neste trabalho foi verificado que a porcentagem de viabilidade celular decai com aumento da concentração de nanopartículas funcionalizadas com HFol (BOCA-FARCAU *et al.*, 2014).

Outros agentes biológicos muito relevantes são os anticorpos que são proteínas específicas que reagem apenas com o antígeno contra o qual foi produzido. Os anticorpos são fatores importantes que podem contribuir muito no tratamento de doenças, já que proporcionam uma seletividade maior pelos tecidos alvo. Aliando as funcionalidades dos anticorpos à modificação das AuNPs, pode-se aumentar a eficácia de tratamento antineoplásicos bem como aprimorar as condições de diagnósticos, como mostrado no artigo de MacLaughlin (MACLAUGHLIN *et al.*, 2013).

### 1.3 Espectroscopia Raman

A utilização de técnicas espectroscópicas é cada vez mais ampla por suas infinitas aplicações em diversas áreas da ciência. Entre as técnicas mais aplicadas atualmente, a espectroscopia Raman, assim como a espectroscopia no infravermelho, são ferramentas para detecção, identificação e caracterização de moléculas (ETCHEGOIN e LE RU, 2009). A espectroscopia Raman envolve o espalhamento inelástico de uma radiação monocromática

que incide na molécula, enquanto a espectroscopia no infravermelho implica na absorção de fótons em ressonância com as transições vibracionais. As propriedades moleculares que variam de acordo com graus de liberdade vibracionais são momento dipolo, no caso da espectroscopia no infravermelho, e a polarizabilidade, no caso da espectroscopia Raman (AROCA, 2006).

Na espectroscopia Raman, o vetor do momento de dipolo induzido ( $P$ ) oscila com um campo elétrico externo aplicado:

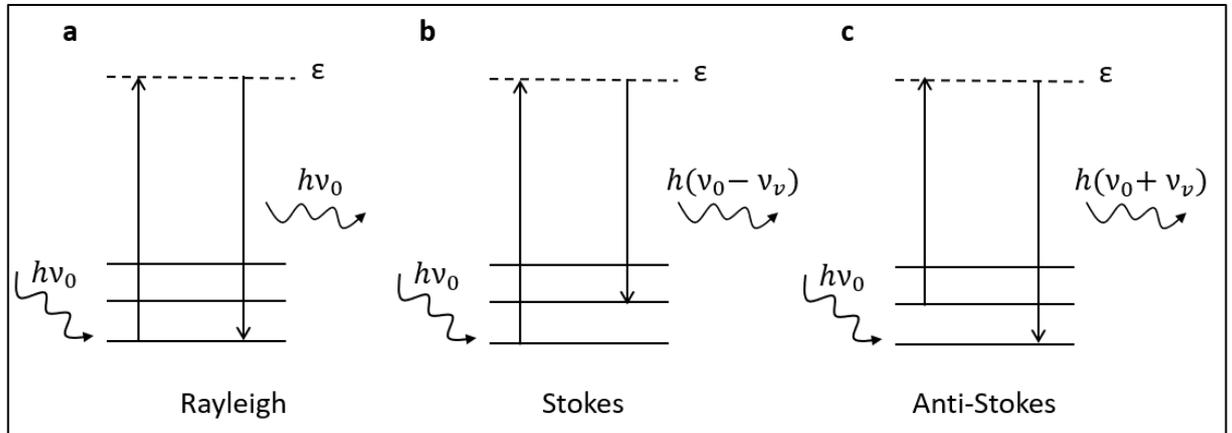
$$P = \alpha \cdot E \quad (1)$$

onde  $\alpha$  é o tensor polarizabilidade molecular e  $E$  é o vetor do campo elétrico da radiação incidente (SALA, 2008; ETCHEGOIN e LE RU, 2009).

Na espectroscopia Raman, a frequência vibracional é medida como deslocamento a partir da frequência do feixe incidente. Sendo assim, o espalhamento pode ocorrer em três situações como ilustrado na Figura 2: quando uma molécula é excitada a partir de um nível vibracional fundamental para um estado virtual retornando elasticamente para o mesmo nível de origem (espalhamento Rayleigh – frequência espalhada é igual à incidente ( $\nu_0$ )), ou inelasticamente para um nível mais energético do que o de origem (espalhamento Stokes -  $\nu_0 - \nu_\nu$ ), onde  $\nu_\nu$  é a frequência vibracional fundamental da molécula; quando a molécula parte do primeiro nível vibracional já excitado para o nível virtual e retorna ao nível vibracional fundamental (espalhamento Anti-Stokes -  $\nu_0 + \nu_\nu$ ) (NAKAMOTO e FERRARO, 1994; ETCHEGOIN e LE RU, 2009).

Com a radiação incidente, a molécula é excitada perturbando todos os níveis de energia (nível virtual) e, em seguida, a radiação é espalhada para um nível vibracional excitado, processo conhecido como espalhamento Stokes. Sendo assim, a energia do fóton espalhado é menor que o fóton incidente e a diferença entre os dois é a energia vibracional correspondente à diferença entre o nível fundamental e o primeiro nível excitado (MCCREERY, 2000; SALA, 2008).

Figura 2 - Esquema de níveis de energia representando espalhamentos Rayleigh (a) Stokes (b) e Anti-Stokes (c).



Fonte: Elaborada pela própria autora.

De acordo com a teoria clássica, o campo elétrico ( $E$ ) da onda eletromagnética oscila com o tempo ( $t$ ):

$$E = E_0 \cos 2\pi\nu_0 t \quad (2)$$

onde  $E_0$  é a amplitude da vibração e  $\nu_0$  a frequência da radiação excitante. As vibrações moleculares são compostas por  $3N - 6$  modos normais (ou graus de liberdade vibracionais) ( $Q_j$ ) em uma molécula não linear com  $N$  átomos.

$$Q_j = Q_j^0 \cos 2\pi\nu_j t \quad (3)$$

onde  $\nu_j$  é a frequência fundamental característica do  $j^{\text{ésimo}}$  modo normal. Assim, a polarizabilidade dos elétrons na molécula será modulada pela vibração molecular de forma que:

$$\alpha = \alpha_0 + \left( \frac{\delta\alpha}{\delta Q_j} \right)_0 Q_j + \dots \quad (4)$$

onde  $\alpha_0$  é a polarizabilidade na posição de equilíbrio e  $\left( \frac{\delta\alpha}{\delta Q_j} \right)_0$  é a razão de variação de  $\alpha$  com respeito à variação de  $Q_j$ , calculada na posição de equilíbrio. Sabendo que o dipolo

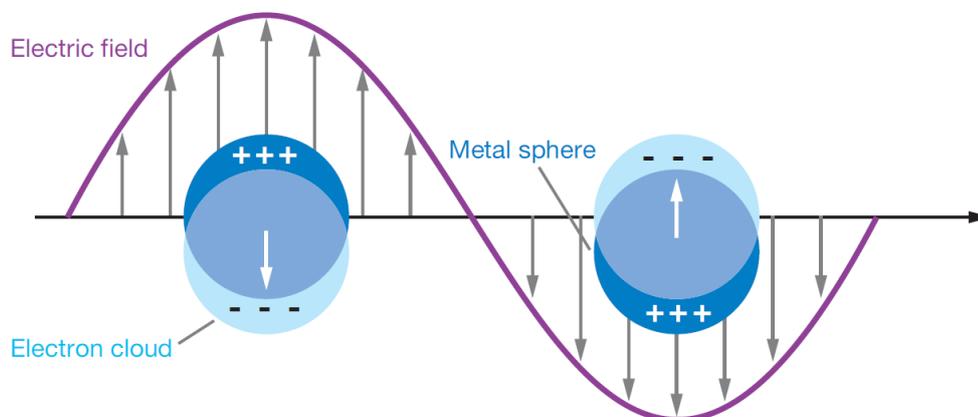


de espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS, do inglês *Surface Enhanced Raman Scattering*), que é um efeito de intensificação do espalhamento Raman de moléculas adsorvidas na superfície de nanoestruturas metálicas, é uma ferramenta importante podendo aumentar em geral  $10^6$  vezes a intensidade do espalhamento Raman de substratos próximos à superfície do metal (ETCHEGOIN e LE RU, 2009).

#### 1.4 Nanopartículas plasmônicas

No contexto de utilização de AuNPs em sistemas de carreadores de fármacos, as AuNPs estão sendo tratadas como estruturas plasmônicas. A espectroscopia eletrônica na análise das transições de ressonância de plásmos de superfície localizado (LSPR, do inglês *Localized Surface Plasmon Resonance*) permite observar as bandas de extinção do plásmo de superfície localizado em nanoestruturas metálicas de ouro, prata ou cobre na região do visível. Neste fenômeno, há uma excitação do movimento coletivo dos elétrons deslocalizados na superfície do metal provocada pela incidência de radiação eletromagnética de um comprimento de onda específico. Na Figura 3 é esquematizada a excitação de elétrons com o campo elétrico incidente em nanoesferas metálicas (WILLETS e VAN DUYNE, 2007). A fim de ter a ressonância necessária para essa excitação, as energias dos modos de oscilação desses elétrons têm que coincidir com a energia dos fótons da radiação incidente (AROCA, 2006). Diferente do efeito de propagação da excitação do plásmo de superfície, que ocorre em superfícies metálicas estendidas, o LSPR ocorre em volumes pequenos como nanoesferas, nanobastões e nanoprismas. As nanoestruturas são muito menores que o comprimento de onda da radiação incidente (KELLY *et al.*, 2003), de forma que se pode considerar que o volume integral da nanoestrutura se encontra em um campo elétrico uniforme.

Figura 3 - Excitação coletiva de elétrons em esferas metálicas



Fonte: (WILLETS e VAN DUYNE, 2007).

A transição LSPR amplifica os campos elétricos em regiões próximas às superfícies das nanopartículas metálicas. O campo elétrico resultante das transições LSPR pode intensificar sinais Raman de espécies químicas adsorvidas nestas superfícies, possibilitando, assim, o uso da técnica SERS (CAMPBELL e XIA, 2007).

## 1.5 Efeito SERS

O espalhamento Raman intensificado por superfície, desde sua primeira observação em 1974 por Fleischmann *et al.* (FARIA *et al.*, 1999), tem motivado cientistas para entender melhor o seu funcionamento e suas diversas aplicações. O efeito SERS tem sido explicado seguindo dois modelos principais, o modelo eletromagnético e o modelo químico. Em ambos, o analito deve estar adsorvido em um substrato SERS ativo, formados por nanoestruturas de metais de cunhagem.

No modelo eletromagnético, a intensificação ocorre quando a radiação excitante interage com os elétrons da superfície levando a uma transição de plásmon (em um modelo clássico é uma onda oscilatória de elétrons na superfície, que induz campo elétrico local) (MCNAY *et al.*, 2011). Esta excitação provoca a intensificação do campo eletromagnético local na superfície da nanopartícula metálica, intensificando, assim, o sinal Raman das moléculas adsorvidas sobre o metal (MOSKOVITS, 1985). Para que o efeito SERS ocorra, a superfície

deve ser rugosa no nível nanométrico (MCNAY *et al.*, 2011). O efeito de intensificação eletromagnético não requer contato direto da molécula com a nanoestrutura metálica, mas a intensificação decresce com o aumento da distância entre as duas. O efeito eletromagnético pode colaborar com um fator na ordem de  $10^{12}$  para a intensificação (KNEIPP *et al.*, 2002).

No modelo químico, são consideradas as interações entre a molécula espalhadora e a superfície, tendo dependência com relação à estrutura eletrônica da molécula adsorvida. Uma explicação é a ocorrência do acoplamento eletrônico entre a molécula e o metal, formando, assim, um complexo adsorbato-superfície que resulta no aumento da seção de choque Raman da molécula adsorvida (KNEIPP *et al.*, 2002). Ocorrem mudanças na polarizabilidade molecular devido à formação do complexo de transferência de carga. A energia dos orbitais moleculares de fronteira da molécula adsorvida é próximo do nível de Fermi (nível mais energético possível de ser ocupado) do metal (KNEIPP *et al.*, 2002; ETCHEGOIN e LE RU, 2009). Considerando que neste modelo há contato da molécula com a superfície, os espectros SERS podem divergir dos espectros Raman das soluções (MCNAY *et al.*, 2011). Em geral, a intensificação SERS através do fator químico contribui nos fatores de intensificação na ordem de  $10$  a  $10^2$  (KNEIPP *et al.*, 2002).

Voltando ao modelo eletromagnético, a intensificação também é dada pela presença dos *hot spots*, que são regiões de pequena dimensão formados entre duas partículas metálicas muito próximas. Devido à proximidade das nanopartículas, o plásmon de superfície das duas interage e provoca uma intensificação maior do campo elétrico local. Os *hot spots* podem gerar uma intensificação na ordem de  $10^{12}$  ou maior (AROCA, 2006).

Os metais de ouro, prata e cobre possuem propriedades ópticas diferentes. Grande parte dessas propriedades é por apresentarem elétrons livres (*plasma*) que se movem em um fundo de íons positivos o que garante a neutralidade do sistema. A utilização desses metais na prática e suas respostas ópticas podem ser explicadas através da função dielétrica que é um número complexo. De forma simplista, considera-se uma esfera muito menor que o comprimento de onda da radiação incidente, em um meio com constante dielétrica constante ( $\epsilon_M$ ) e um campo elétrico externo uniforme. Desta forma, o campo elétrico interno à esfera pode ser mostrado como constante e proporcional ao campo elétrico incidente ( $E_i$ ).

$$E_{ln} = \frac{3\varepsilon_M}{\varepsilon(\omega) + 2\varepsilon_M} E_i \quad (8)$$

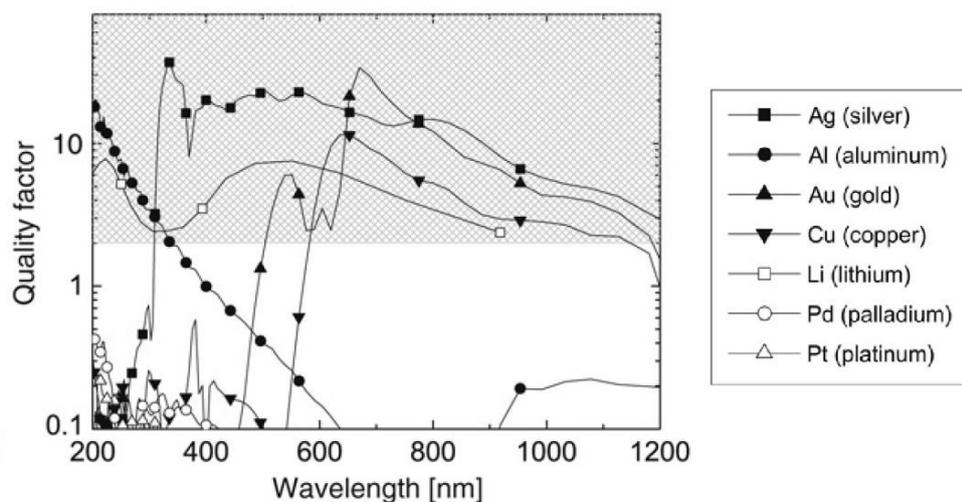
A parte real é responsável pela condição de ressonância da transição LSPR e a parte imaginária está relacionada à intensidade dessa banda, pois informa sobre a absorção de luz do metal. Quando a parte imaginária se aproxima de zero em um comprimento de onda em que a parte real está próxima de  $-2\varepsilon_M$ , a resposta óptica nesta condição é bastante alta, sendo, então, condição de ressonância. Desta forma, para o metal ser considerado um bom substrato SERS, a parte real da função dielétrica deve ser negativa e a parte imaginária deve apresentar o menor valor possível (ETCHEGOIN e LE RU, 2009).

As duas partes, real ( $Re$ ) e imaginária ( $Im$ ), da função dielétrica são unidas no fator de Qualidade ( $Q$ ):

$$Q = \frac{\omega \left( \frac{d[Re(\varepsilon(\omega))]}{d\omega} \right)}{2[Im(\varepsilon(\omega))]^2} \quad (9)$$

O fator  $Q$  tem que ser maior que 2 para que o metal seja um bom substrato SERS, mas seria ideal se este fator fosse maior que 10, como é mostrado na Figura 4 (ETCHEGOIN e LE RU, 2009).

Figura 4 - Gráfico do fator  $Q$  x comprimento de onda para diversos metais.



Fonte: (ETCHEGOIN e LE RU, 2009).

A Figura 4 mostra que os metais de Ag, Au e Cu podem apresentar efeito SERS com radiações excitantes de comprimentos de onda na região do visível e infravermelho próximo, considerando que a prata ainda pode ser aplicada com excitações na região do ultravioleta (ETCHEGOIN e LE RU, 2009).

## 1.6 Aplicações

A aplicação de espectroscopia na área médica inclui desde a pesquisa básica nos campos de biofísica e bioquímica até o desenvolvimento de novos métodos para diagnóstico de doenças e controle de terapias (KNEIPP *et al.*, 2002). Quanto às possibilidades de uso de substratos SERS, os coloides metálicos têm grande potencial por possuírem algumas vantagens como a grande área superficial específica, que permite uma melhor interação entre o analito e o substrato; possibilidade de síntese em diferentes formas; facilidade de modificação da superfície, para adaptar o sistema nanoestruturado para diversas aplicações desde sistema de carreamento de fármacos (WANG *et al.*, 2012; SHI *et al.*, 2017) à utilização em montagem de células solares (KUNDU e PATRA, 2017).

Considerando as vantagens oferecidas pelo uso de AuNPs com a técnica espectroscópica SERS e a especificidade nas interações com os tecidos biológicos proporcionada pelos compostos HFol e anticorpo, a coadsorção destes com um fármaco antineoplásico pode auxiliar no tratamento contra o câncer.

## 2. OBJETIVOS

O projeto proposto tem como objetivo geral a síntese de AuNPs modificadas com biomoléculas que possibilitem interações específicas com células tumorais *in vitro*, a fim de se obter um eficiente sistema de entrega controlada de fármacos.

### 2.1 Objetivos específicos

- Estudos espectroscópicos, por UV-VIS-NIR e SERS, das interações dos adsorbatos: cristal violeta (CV), mercaptoetanol (ME), HFol, PEGSH, anastrozol e tamoxifeno, com as AuNPs.
- Análise através de testes de viabilidade celular das interações das culturas celulares (MDA e MCF-7) com cada componente: AuNPs, CV, ME, HFol, PEGSH, anastrozol, isolados
- Análise através de testes de viabilidade celular das interações das culturas celulares (MDA) com as AuNPs modificadas com CV, ME, HFol, PEGSH, na presença e ausência do anastrozol
- Análise através de testes de viabilidade celular das interações das culturas celulares (MCF-7) com as AuNPs modificadas com CV, HFol, PEGSH, na presença e ausência de anticorpo e dos fármacos, anastrozol e tamoxifeno.
- Estudo das interações das culturas celulares (MCF-7) com as AuNPs modificadas com CV, HFol, anticorpo, PEGSH, tamoxifeno por mapeamento SERS da molécula de prova CV.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Instrumentação**

##### **3.1.1 Espectroscopia Raman e espectroscopia SERS**

As medidas de Raman e SERS foram realizadas através do Espectrômetro Raman, marca Bruker - Senterra, equipado com microscópio óptico acoplado marca, com lente de magnificação 50x, abertura numérica de 0,75 e linha de excitação 632,8 nm e potência de laser 0,2 a 10 mW, com detector CCD. Foi utilizado, também, o Espectrômetro FT-Raman Bruker, modelo RFS-100, com laser de Nd/YAG com excitação em 1064 nm, potência de laser de 20 mW, equipado com um detector de Germânio, acoplado a um microscópio óptico Olympus com lente de magnificação de 40 vezes e abertura numérica de 0,45.

##### **3.1.2 Espectroscopia UV-VIS-NIR**

Os espectros eletrônicos para as nanopartículas de ouro (AuNPs) e de absorção dos adsorbatos cristal violeta, PEGSH, HFol e agentes biológicos foram obtidos utilizando o Espectrofotômetro Shimadzu modelo 1800 com varredura de 200 - 1100 nm para espectros na região do UV-VIS-NIR. Foram utilizadas cubatas de quartzo de caminho óptico de 1 mm ou 1 cm.

Os resultados de análises de testes biológicos foram obtidos utilizando um Espectrofotômetro Multiskan GO de microplacas da Thermo Scientific com varredura de 200 a 1000 nm.

#### **3.2 Reagentes**

Ácido Fólico (Sigma Aldrich), Cristal Violeta (Sigma Aldrich), Mercaptoetanol (Sigma Aldrich), Poly(ethylene glycol) methyl ether thiol - Mn 800 (Sigma Aldrich), Ácido tetracloroáurico ( $\geq 99\%$ , Sigma Aldrich), Anticorpo Anti- Receptor Folato (Sigma Aldrich), Alcool Etílico Absoluto 99% grau térmico (Vetec), Citrato de Trissódio dihidratado ( $\geq 99\%$ , Merck), Soro Fetal Bovino (FBS) (Vitrocell), Meio de cultura - Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM) (Vitrocell), Penicilina/Streptomicina (Sigma-Aldrich), Placa de cultivo celular 96-poços (Kasvi), Tampão Fosfato (PBS) (Sigma-Aldrich), Dimetil sulfóxido

(DMSO) (Vetec), Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (Sigma-Aldrich). Todos os reagentes foram utilizados sem pré-tratamento.

### 3.3 Limpeza das vidrarias

Todas as vidrarias utilizadas foram previamente higienizadas com água régia (mistura de HCl com HNO<sub>3</sub>, na proporção de 3:1) seguida por lavagem exaustiva com água deionizada, para remover o excesso de água régia.

### 3.4 Síntese das nanopartículas de ouro modificadas

Na síntese de nanopartículas de ouro, utilizou-se uma solução de ácido cloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>) de 0,01% (m/m) e uma solução de citrato de sódio (Na<sub>3</sub>-citrato) de 1% (m/m). Para a síntese, 50 mL da solução de HAuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O foram aquecidos até o ponto de ebulição. Adicionou-se, então, 1,0 mL da solução de citrato de sódio. A reação foi mantida em aquecimento até a mudança de coloração para a cor vermelha. A redução de cloreto de ouro foi finalizada após cerca de 5 minutos. Com este procedimento, a maioria das nanopartículas deverão ter um tamanho ao redor de 16 nm, dependendo da quantidade da solução de citrato de sódio adicionada (FRENS, 1973).

Uma solução de cristal violeta (CV), molécula utilizada como marcador SERS, foi preparada (concentração  $2,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) e adicionada à suspensão coloidal de ouro no volume de 50 µL. O mercaptoetanol (ME) foi adicionado a partir de uma solução previamente preparada (concentração  $2,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) e adicionado à suspensão após a adição do cristal violeta, também no volume de 50 µL.

Uma solução do anticorpo (Anti-FOLR1)  $1,0 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> foi preparada utilizando tampão de fosfato salino (PBS) para ser adicionada à suspensão de AuNPs no volume de 23 µL, agindo como agente bioquímico (MACLAUGHLIN *et al.*, 2013).

Uma solução de ácido fólico (HFol)  $0,1$  mol L<sup>-1</sup> foi preparada com hidróxido de sódio ( $1$  mol L<sup>-1</sup>), diluída para  $2,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> e 50 µL foram adicionados à suspensão coloidal (BOCA-FARCAU *et al.*, 2014).

A solução de Poli(etileno glicol) metil eter tiol (PEGSH) de concentração ca.  $1,0 \times 10^{-8}$  g L<sup>-1</sup> foi diluída ( $2,0 \times 10^{-11}$  mol L<sup>-1</sup>) e adicionada ao sistema no volume de 50 µL, seguindo indicação do artigo de referência e adaptado por resultados prévios (QIAN *et al.*, 2008; YOSHIMOTO *et al.*, 2010).

Uma solução de anastrozol foi preparada utilizando álcool etílico absoluto e adicionada à suspensão coloidal de nanopartículas de ouro modificadas. O sistema é mantido em agitação constante durante uma hora em temperatura ambiente a fim de promover máxima interação entre as moléculas de anastrozol e o sistema de nanopartículas (SARKAR e YANG, 2008). O mesmo procedimento foi adotado para interação do fármaco tamoxifeno com as nanopartículas modificadas. Os fármacos foram adicionados, em sistemas individuais, em volumes de 50 µL de solução etanólica. O volume final para todos os sistemas foi 1 mL para proceguirem para testes *in vitro*.

A caracterização de cada etapa de síntese foi realizada através de espectroscopia eletrônica UV-VIS-NIR e SERS.

### 3.5 Interações dos cultivos celulares com AuNPs modificadas

#### 3.5.1 Teste de citotoxicidade com células tumorais

A atividade antiproliferativa foi avaliada em duas linhagens celulares de carcinoma mamário, com receptor de estrógeno (ER) negativo (MDA-MB-231) e com receptores positivos para estrógeno (ER), progesterona (PR) e aromatase (AR) (MCF-7), através do uso do reagente MTT. Estas células foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) e 10.000 U.I. ml<sup>-1</sup> de penicilina e 10 mg ml<sup>-1</sup> estreptomicina e incubadas a 37 °C em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>. Células com crescimento exponencial foram semeadas em placas de 96 poços ( $1,0 \times 10^4$  de células por poço) e mantidas durante 24h para fixação. As células foram tratadas com diferentes concentrações dos variados componentes das sínteses e incubadas por 48h. Ao final do período de incubação, os poços foram lavados com 200 µL de PBS seguido pela adição de 20 µL de MTT e incubados por 3h a 37 °C. Em seguida o reagente foi removido e adicionou-se 100 µL de DMSO para fazer a leitura de absorvância utilizando o leitor de micro placas a

540 nm seguido do cálculo de porcentagem de viabilidade. Foi utilizado solução de 0,1% de DMSO (v/v) em poços de controle de solvente. Cada medida foi realizada em quintuplicata.

Os ensaios realizados com células neoplásicas foram realizados em colaboração com a pesquisadora Profa. Dr. Nádia Raposo e o mestrando Alexandre Lataliza no NIQUA (Núcleo de Identificação e Quantificação Analítica) localizado na UFJF.

### 3.5.2 Mapeamento do marcador nas células

O estudo de direcionamento das nanopartículas modificadas foi realizado utilizando a linhagem celular de carcinoma mamário com receptores positivos para estrógeno (MCF-7). A metodologia de cultivo celular seguiu o mesmo procedimento da análise de citotoxicidade, exceto pela etapa de revelação de células viáveis com reagente MTT. As células foram cultivadas em DMEM com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS) e 10.000 U.I. ml<sup>-1</sup> de penicilina e 10 mg ml<sup>-1</sup> estreptomicina e incubadas a 37 °C em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>. Células com crescimento exponencial foram semeadas em placas de 24 poços (10<sup>4</sup> de células por poço) e mantidas durante 24h para fixação. As células foram depositadas em lamínulas de vidro previamente higienizadas e tratadas.

As lamínulas de vidro foram cortadas em tamanhos adequados aos poços de placas de 24 poços. Primeiramente, as lamínulas foram lavadas com água deionizada. Em seguida, foram lavadas com acetona, etanol, água deionizada e solução piranha. As lavagens foram intervaladas por banho de ultrassom durante 5 min. Por último, as lamínulas foram lavadas com água deionizada, novamente, e mantidas em solução de hidróxido de sódio (1 mol L<sup>-1</sup>).

Após o período de fixação das células, as mesmas foram tratadas, em triplicata, com três amostras diferentes: AuNPs modificadas (sem anticorpo) com tamoxifeno (15 µmol L<sup>-1</sup>), AuNPs modificadas (com anticorpo) com tamoxifeno (15 µmol L<sup>-1</sup>) e AuNP com CV (1,0 x 10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup>). Em seguida, foram incubadas, novamente, pelo período de 48h.

A fim de realizar o mapeamento do sinal SERS do CV nas células, retirou-se o meio de cultura do poço referente à lamínula a ser analisada. Em seguida, retirou-se a lamínula do poço e esta foi colocada em uma lâmina de vidro previamente higienizada. Retirou-se, então,

o excesso de líquido da lamínula com um papel posicionado na borda da lamínula, sem ter contato com as células. Por fim, o sinal foi mapeado com a linha laser 632,8 nm.

### 3.5.3 Análise estatística

A significância estatística dos resultados de ensaios *in vitro* foi determinada utilizando a análise de variância (ANOVA) e, em seguida, o teste post-hoc Bonferroni. Ao mensurarmos a relevância estatística, quando a probabilidade de que o efeito tenha ocorrido é maior que 95 %, esta resulta em  $p < 0,05$  que são considerados resultados estatisticamente significantes. As análises foram realizadas usando o *software Graphpad Prism 5.0 (GrapaPad Software Inc., CA)*.

## 3.6 Cálculos computacionais

Nesta dissertação, os cálculos teóricos foram realizados utilizando o programa ORCA 3.0.3 (*software*) em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Antônio Sodré Costa do Núcleo de Estudos em Química Computacional (NEQC) da UFJF. Para a obten o dos resultados do tamoxifeno livre, foi aplicado o método DFT com funcional TPSSh com fun es de base def2-SVP, para otimiza o da estrutura e cáculo de frequência, e soluço com constante dielétrica 24,3 (etanol).

Nos c culos para obten o de frequência do anastrozol foi aplicado o método DFT com funcional TPSSh com as fun es de base def2-SVP e soluço com constante dielétrica 24,3 (etanol).

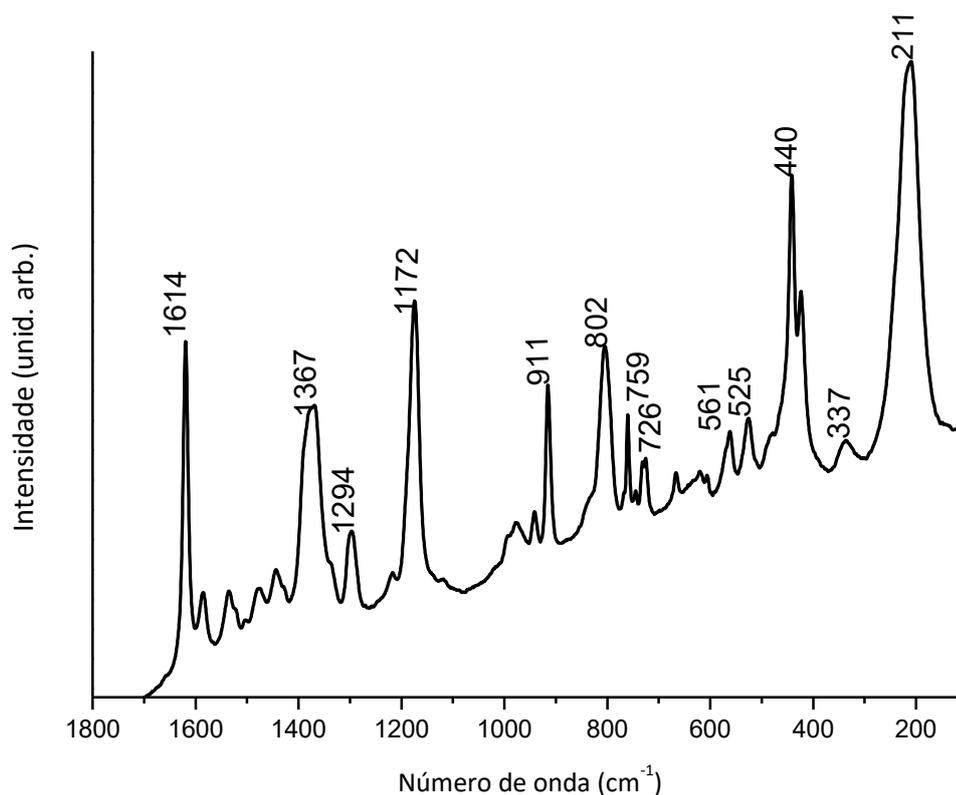
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Caracterizações espectroscópicas

#### 4.1.1 Cristal violeta

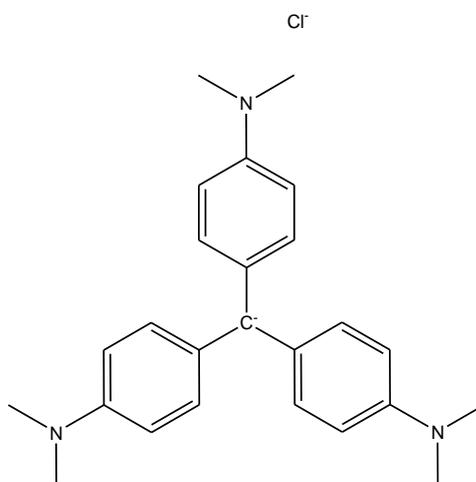
O espectro SERRS (Surface Enhanced Resonance Raman Spectroscopy) do CV, mostrado na Figura 5, apresenta uma característica específica, associada ao Raman ressonante, pois o mesmo apresenta uma banda em, aproximadamente, 600 nm no espectro UV-VIS. Isso faz com que entre em ressonância com a radiação incidente utilizada no experimento, sendo a linha laser 632,8 nm (MENG *et al.*, 2013). O CV foi utilizado na síntese com a função de marcador SERS, uma vez que seu sinal é muito intenso, mesmo em concentrações baixas.

Figura 5 - Espectro SERRS do cristal violeta ( $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) adsorvido sobre AuNP



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Figura 6 - Estrutura molecular do cristal violeta



Fonte: Elaborada pela própria autora.

O padrão espectral do CV, mostrado na Figura 5, foi utilizado como marcador SERS nos mapeamentos realizados com a linhagem celular MCF-7. Através do mesmo, foi possível verificar o nível de interação das nanopartículas de ouro modificadas com diferentes biomoléculas, HFol e anticorpo (Anti-FOLR1) com as células de câncer de mama.

#### 4.1.2 Mercaptoetanol

Na síntese de nanopartículas de ouro esféricas, os tamanhos resultantes podem ser variados de acordo com a quantidade de agente redutor adicionado, no caso o citrato de sódio. Com a finalidade de testar a síntese com células de câncer, além de realizar os testes convencionais de caracterização, foi utilizada uma quantidade de citrato de sódio que resultava em um diâmetro de, aproximadamente, 16 nm. Com essas dimensões, há uma maior possibilidade de penetração na membrana celular, além da maior probabilidade de se obter sinais de *hotspots* que apresentam uma intensidade Raman mais elevada, pela agregação das AuNP na superfície das células. Para a caracterização desta etapa, foi utilizada a espectroscopia UV-VIS-NIR. A largura e comprimento de onda da banda de extinção dependem das dimensões das nanopartículas de ouro resultantes da síntese. Como mostrado na Figura 8, junto com o estudo cinético da adsorção do ME na superfície das AuNPs, as AuNPs puras apresentam uma banda

em 530 nm. Considerando que as AuNPs são esféricas, há uma única banda, uma vez que as dimensões transversal e longitudinal são bastante similares.

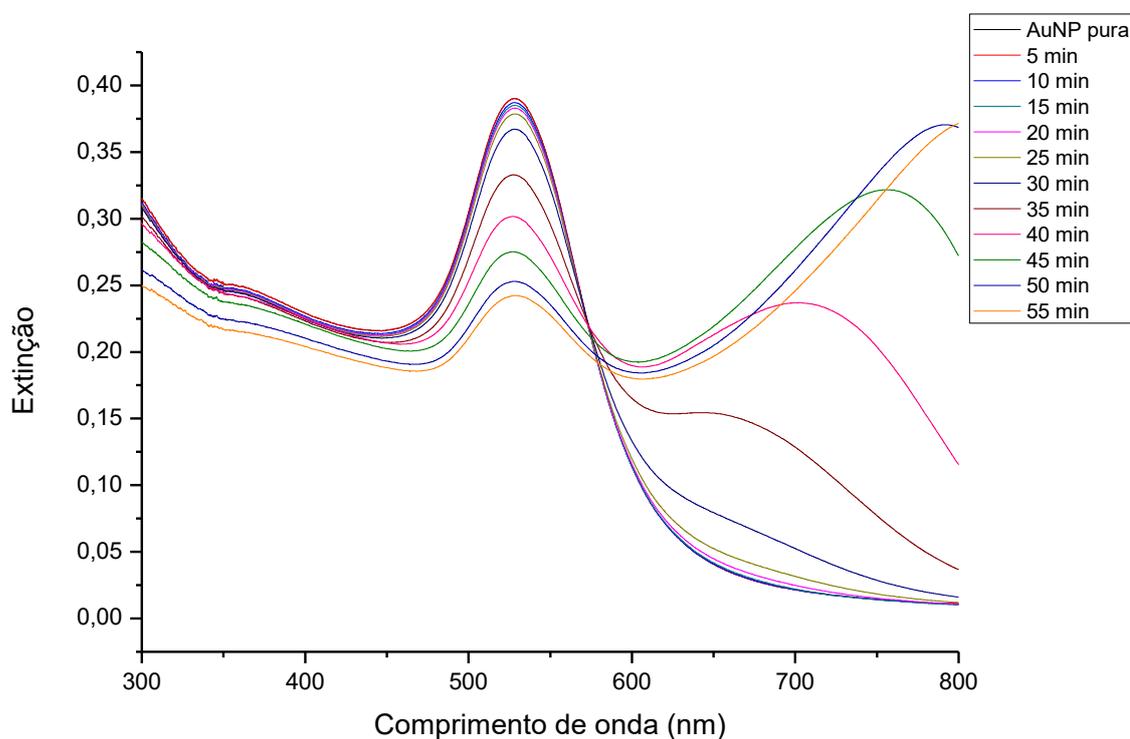
O ME foi adicionado à suspensão de AuNP com o intuito de aumentar a interação do metal com o HFol, tendo a função de modificador de superfície promotor de ligação de hidrogênio (FILGUEIRAS *et al.*, 2016).

Figura 7 - Estrutura molecular do mercaptoetanol



Fonte: Elaborada pela própria autora.

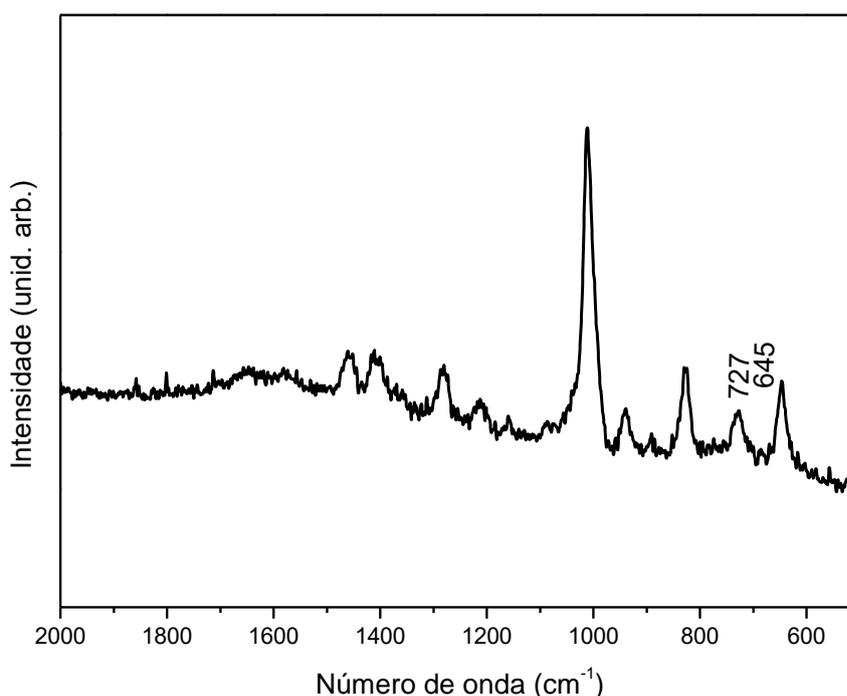
Figura 8 - Estudo cinético por espectroscopia UV-VIS-NIR da adsorção do mercaptoetanol ( $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) na superfície das AuNPs



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Analisando o estudo cinético realizado com espectroscopia UV-VIS-NIR da adsorção do ME na superfície de AuNPs na Figura 8, pode-se observar que, imediatamente após a adição do ME às AuNPs, estas iniciam um processo de agregação evidenciando a interação com as nanoestruturas. Neste processo de agregação, as dimensões das nanoestruturas são alteradas podendo expandir gradualmente nos sentidos longitudinal e transversal, aumentando, assim, o tamanho das mesmas. O espectro SERS obtido experimentalmente do ME adsorvido em superfície de AuNPs é mostrado na Figura 9, no qual evidencia-se a presença das bandas em 645 e 727  $\text{cm}^{-1}$  que estão atribuídas aos estiramentos da ligação C-S nas conformações *gauche* e *trans*, respectivamente, mostrando proporção diferente entre estes confôrmeros, quando comparado ao espectro do líquido (FONSECA, 2016).

Figura 9 - Espectro SERS do mercaptoetanol ( $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) adsorvido em AuNP



Fonte: Elaborada pela própria autora.

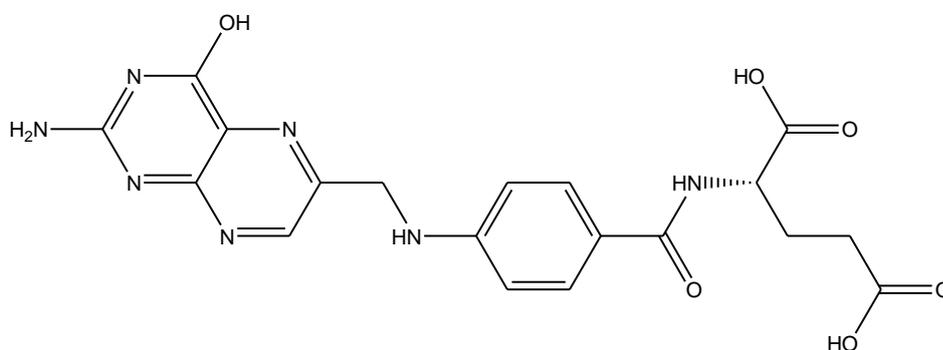
Comparando aos espectros Raman e SERS obtidos por Tarabara e colaboradores (1998), o deslocamento dessas bandas para um número de onda menor do observada no espectro Raman no ME líquido, sugere a redução da densidade eletrônica da ligação C-S, indicando que este pode ser um sítio de ligação com o metal (TARABARA *et al.*, 1998). A síntese contendo ME

foi utilizada, apenas, nos ensaios biológicos com a linhagem celular MDA – MB – 231. Como não foi observado nenhum efeito benéfico em seu uso para aumentar a interação do ouro com HFol, e por ser uma molécula que pode apresentar efeitos tóxicos a longo prazo, seu uso foi suspenso para os ensaios com a linhagem celular MCF-7.

#### 4.1.3 Ácido fólico

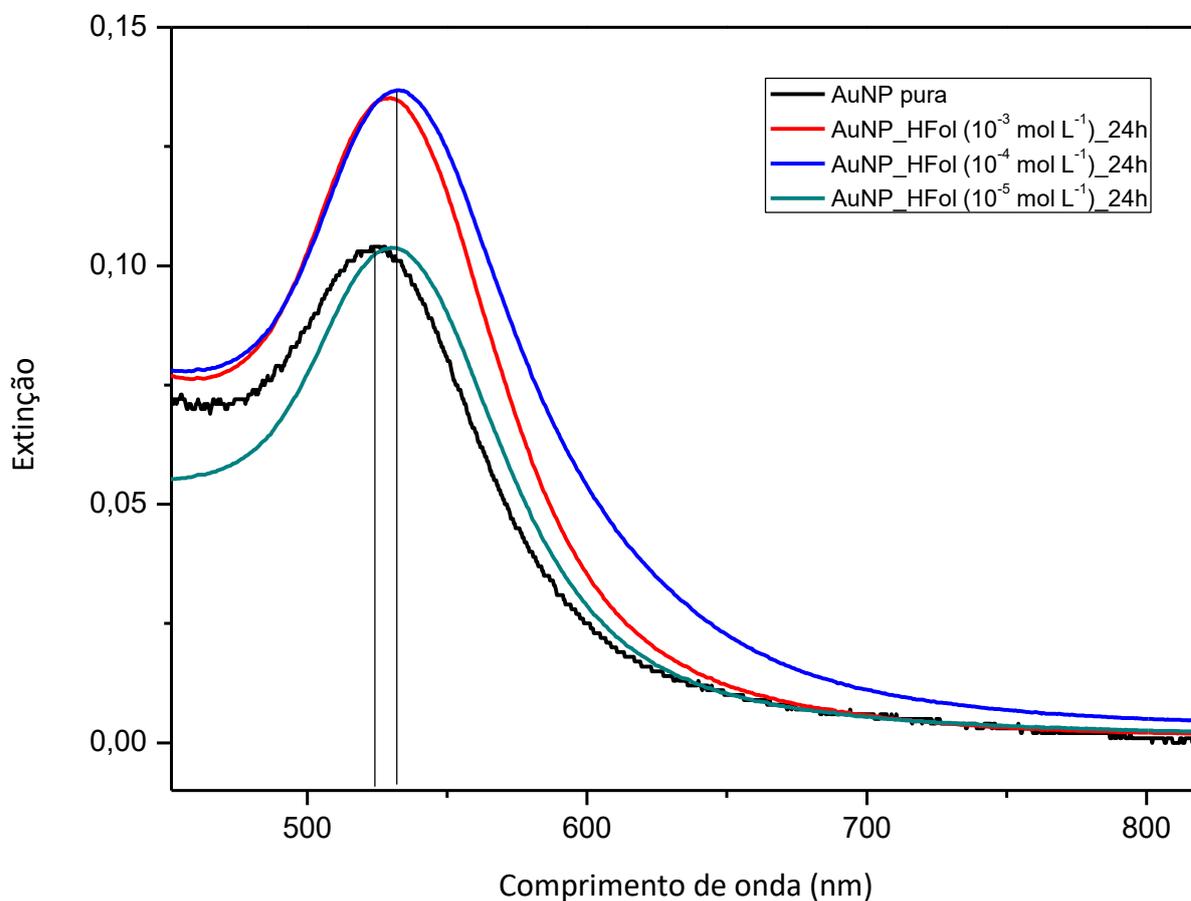
A partir do espectro de extinção mostrado na Figura 11, é possível observar que a banda LSPR correspondente à adsorção do HFol ( $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) na superfície de ouro teve um deslocamento após 24h de adsorção em relação à banda referente ao colóide de ouro puro. Isto indica que há interação da molécula com a AuNP. Sendo assim, apesar de outras concentrações também terem um deslocamento evidente, a menor concentração de HFol ( $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) foi escolhida por demonstrar uma relação de agregação mais similar ao do colóide puro e, assim, ser uma melhor opção para testes *in vitro* com células de câncer.

Figura 10 - Estrutura molecular do ácido fólico



Fonte: Elaborada pela própria autora.

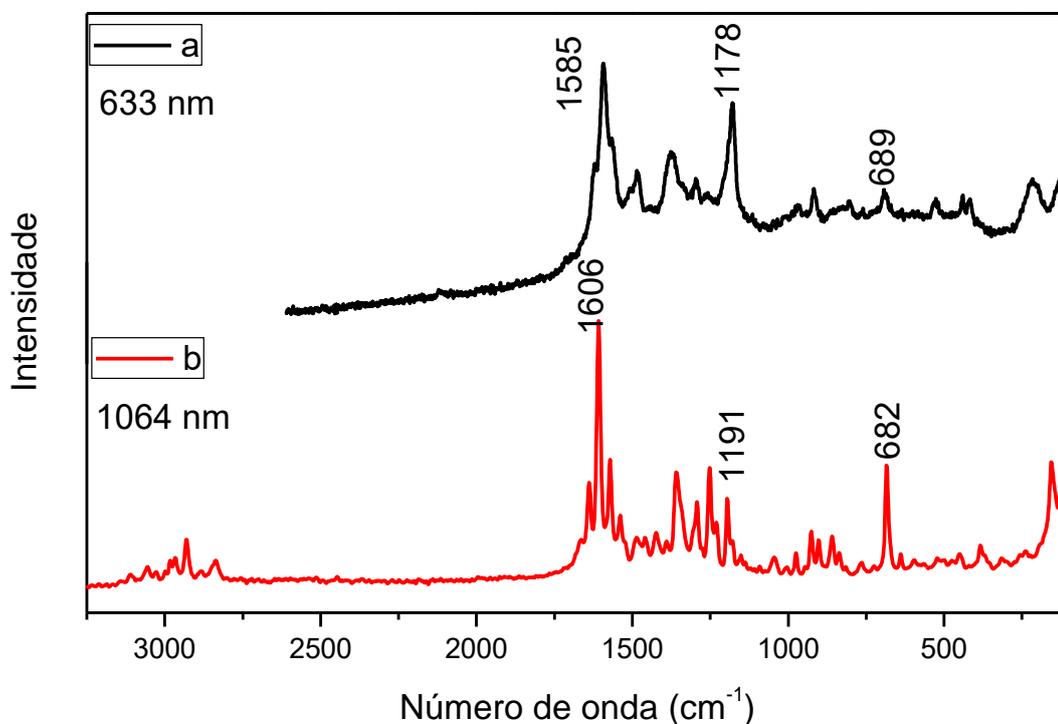
Figura 11 - Espectros UV-VIS-NIR da AuNP com ácido fólico, em diferentes concentrações, adsorvido na superfície metálica



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Através da análise dos espectros do HFol (Figura 12), é possível observar uma diferença espectral entre os espectros Raman e SERS, indicando que há interação com o metal. As bandas evidenciadas em  $1585\text{ cm}^{-1}$  (SERS) e  $1606\text{ cm}^{-1}$  (Raman) estão associadas a estiramentos de ligações CC dos anéis aromáticos. A mudança de intensidade das bandas em  $689$  e  $1178\text{ cm}^{-1}$  (SERS) e  $682$  e  $1191\text{ cm}^{-1}$  (Raman) podem nos dar mais informações de como o adsorbato interage com a superfície metálica (CASTILLO *et al.*, 2015). No entanto, cálculos teóricos são necessários para avaliar e definir melhor esses modos de interação.

Figura 12 – Espectros experimentais SERS do ácido fólico adsorvido em superfície de AuNPs (a) e Raman do sólido (b).



Fonte: Elaborada pela própria autora.

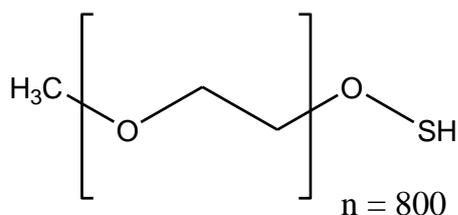
Sendo uma vitamina essencial às células normais e, devido a em alta concentração de receptores de HFol na superfície de células de câncer, mostra-se ainda mais substancial para células cancerígenas como mencionado na introdução, o HFol foi utilizado como biomolécula direcionadora. A sua presença aumenta a afinidade do sistema nanoestruturado pelas células de câncer, sendo assim fundamental para a eficiência do sistema.

#### 4.1.4 PEGSH

A interação das nanopartículas de ouro com cada componente da síntese causa uma mudança do índice de refração local (próximo à superfície das nanoestruturas) que é evidenciado pelo deslocamento da banda LSPR no espectro de extinção. A mudança do índice de refração produzido pela captura de uma biomolécula depende da concentração do analito na superfície da nanoestrutura (sensor) (HOMOLA, 2008). Logo, o deslocamento do máximo da banda de extinção a cada etapa de síntese, mostrado na Figura 14, é uma indicação de

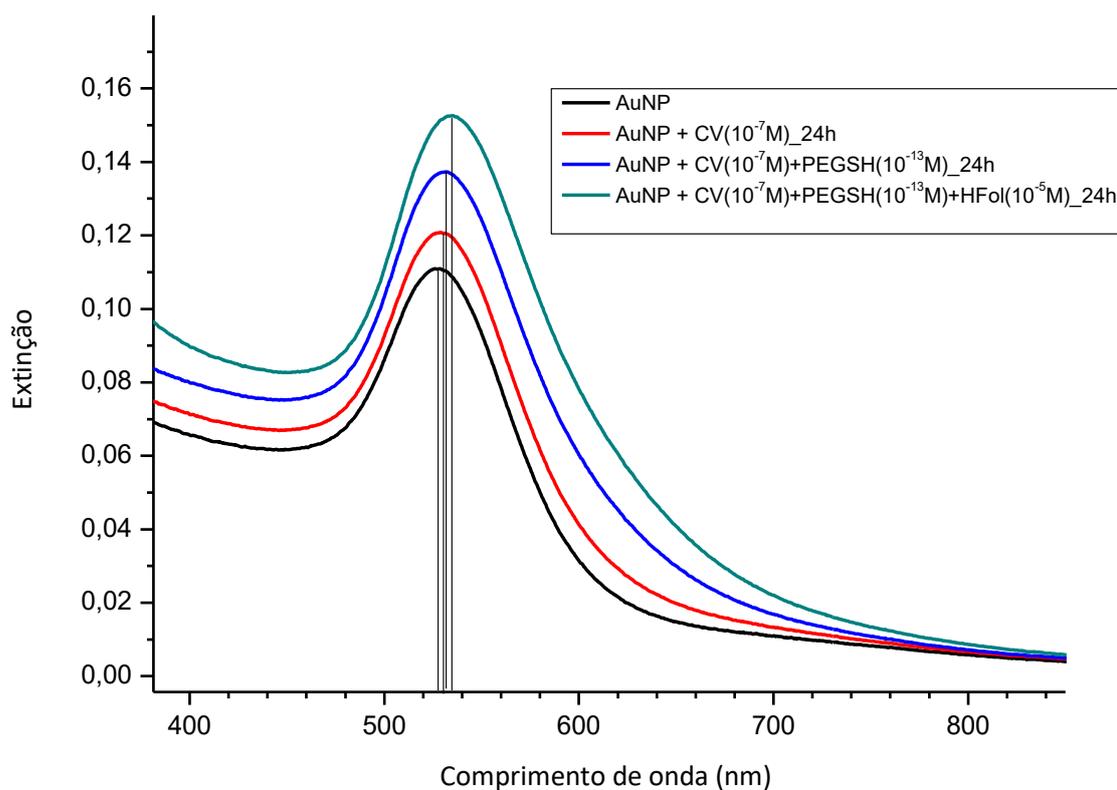
interação com os respectivos componentes modificadores das AuNPs. As amostras foram analisadas nas etapas de adição do CV, PEGSH e HFol nas concentrações indicadas na abaixo.

Figura 13 - Estrutura molecular do PEGSH



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Figura 14 - Espectro UV-VIS-NIR da síntese etapa por etapa



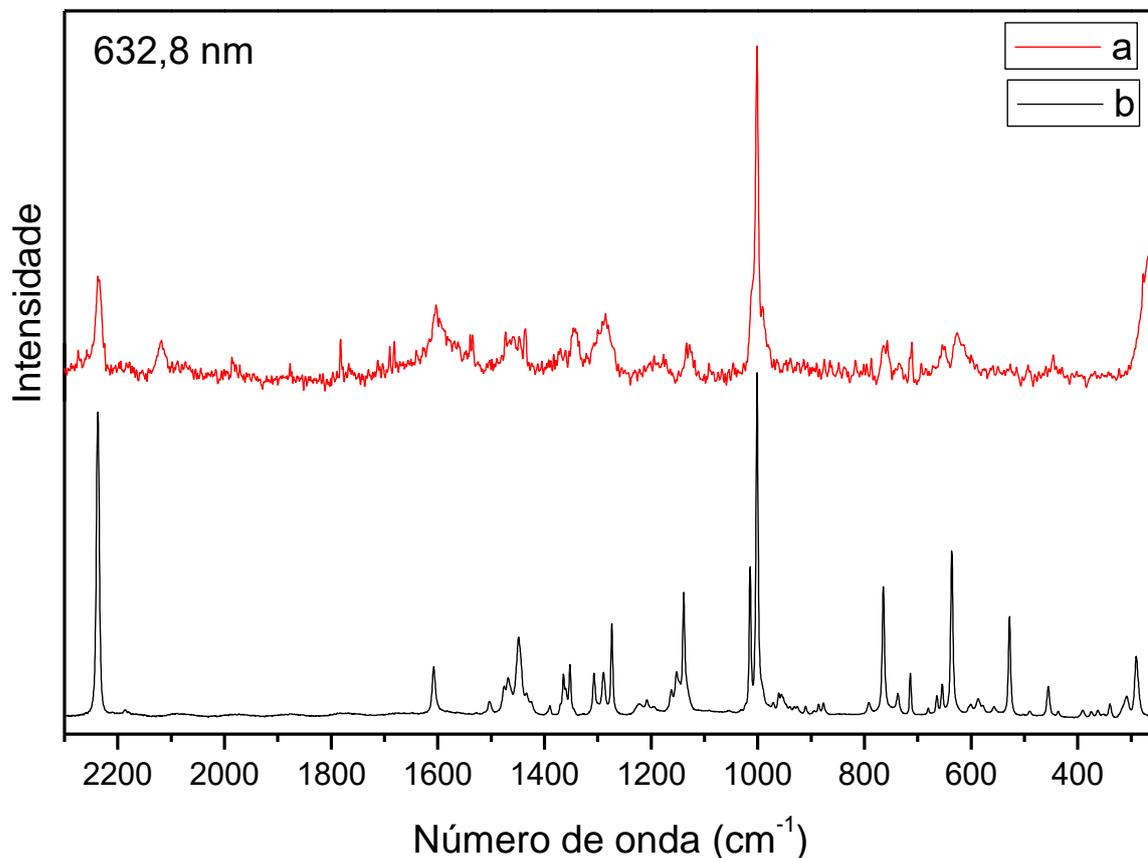
Fonte: Elaborada pela própria autora.

No sistema nanoestruturado, o polímero PEGSH foi utilizado com a finalidade de inibir o processo natural de agregação do sistema. Por ser um polímero com cadeia longa, com 800 unidades de monômeros, tende a formar uma camada na superfície da nanopartícula, sem impedir a interação das biomoléculas, HFol e anticorpo, com as células de câncer.

#### **4.1.5 Anastrozol**

Considerando que a solução de anastrozol previamente preparada foi feita utilizando álcool etílico como solvente, foi necessário redispersar o fármaco em água deionizada para obter o espectro SERS (Figura 15a). Tanto o espectro SERS do anastrozol adsorvido em superfície de ouro como o espectro Raman do sólido foram obtidos com a linha laser 632,8 nm. A atribuição dos modos vibracionais presentes nos espectros experimentais Raman do sólido e SERS do anastrozol adsorvido em superfície de ouro foi obtida através do cálculo do anastrozol livre. A Figura 15 mostra os espectros SERS do anastrozol adsorvido em superfície de ouro e Raman do sólido e a atribuição aos modos vibracionais é mostrada na Tabela 1. A Figura 16 mostra a estrutura otimizada do anastrozol livre obtida através de cálculos teóricos por DFT.

Figura 15 - Comparação de espectros experimentais SERS do anastrozol adsorvido em superfície de AuNP (a) e Raman do sólido (b). Espectro SERS com correção de linha de base.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

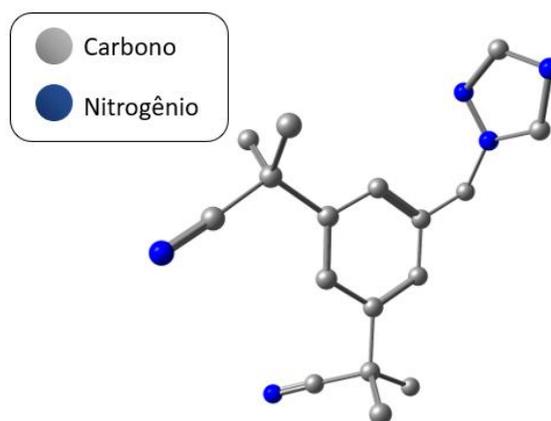
Tabela 1 - Atribuição vibracional de bandas do anastrozol

<i>Teórico Anastrozol (632.8 nm)</i>	<i>Raman sólido Anastrozol (632.8 nm)</i>	<i>SERS Anastrozol com AuNPs (632.8 nm)</i>	<i>Atribuição</i>
514	528	-	$\delta_{oop}$ triazol
639	636	626	$\delta_{oop}$ benzeno e $\delta_{oop}$ triazol
721	714	711	$\delta_{oop}$ benzeno
761	764	760	$\nu(C_{lateral}N)$ triazol
983	1001	1001	$\nu_{br}$ benzeno
1012	1014	1011	$\nu(CC)$ e $\nu(CN)_{triazol}$
1125	1139	1129	$\nu(CC)_{quaternário}$
1274	1274	1275	$\nu(CC)_{benzeno}$
1280	1289	1285	$\nu(CN)_{triazol}$

1330	1307	1302	$\delta(\text{CH}) + \nu(\text{CC})_{\text{benzeno}} + \nu(\text{CN})_{\text{triazol}}$
1367	1352	1343	$\nu(\text{CN})_{\text{triazol}} + \delta(\text{CH})$
1408	1364	-	$\delta(\text{CH})$
1437	1448	1436	$\nu(\text{CC})_{\text{benzeno}} + \delta(\text{CH})$
1441	1467	1460	$\nu(\text{CC})_{\text{benzeno}} + \delta(\text{CH})$
1444	1475	1473	$\nu(\text{CN})_{\text{benzeno}} + \delta(\text{CH})$
1605	1604	1590	$\nu(\text{CC})$
1607	1608	1604	$\nu(\text{CC})$
2269	2237	2238	$\nu(\text{CN})_{\text{nitrila}}$

$\nu$  = estiramento; oop = fora do plano; br = respiração;  $\delta$  = deformação angular.

Figura 16 - Estrutura otimizada da molécula de anastrozol livre



Fonte: Elaborada pela própria autora.

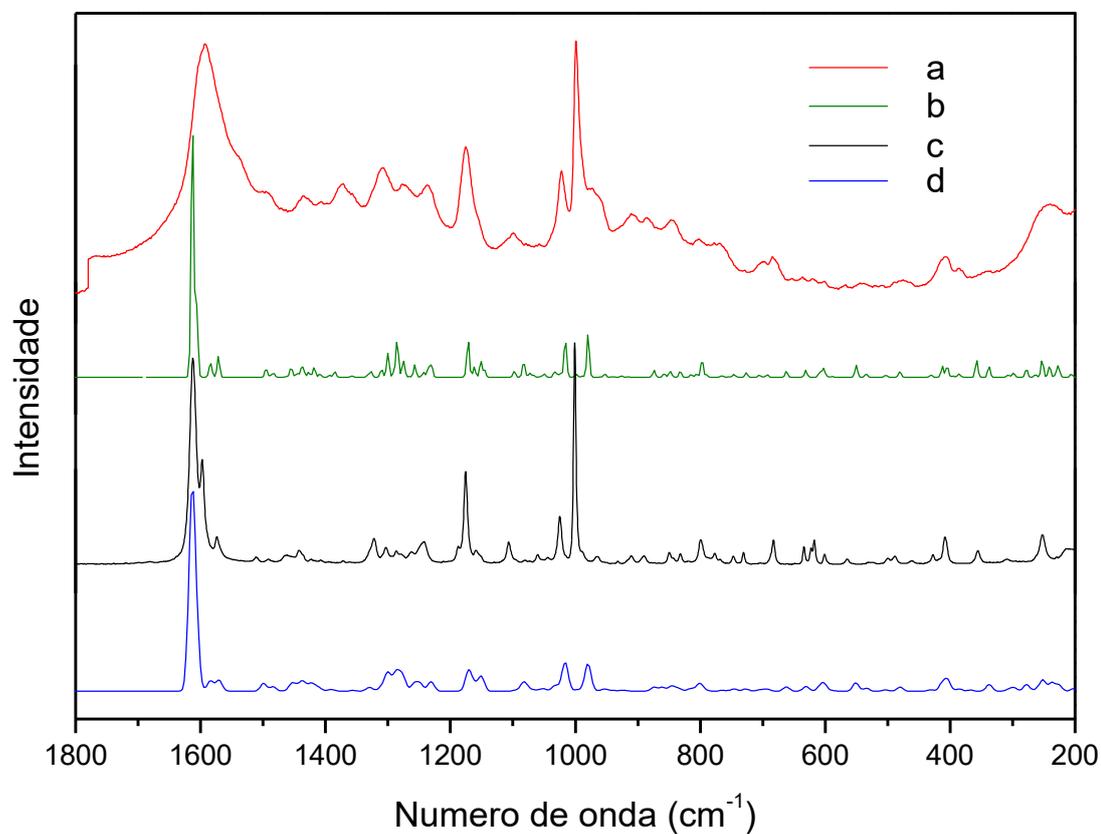
A partir do espectro SERS experimental, e da atribuição, foi possível observar que o modo vibracional do estiramento de nitrila ( $2238 \text{ cm}^{-1}$ ) não foi intensificado, em comparação com o espectro Raman do sólido. Isto é um indício que a molécula não adsorve através destes grupos funcionais. Por outro lado, há um aumento na intensidade relativa da banda em  $1285 \text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento CN do triazol sugerindo que este seja o sítio de interação com a superfície metálica.

#### 4.1.6 Tamoxifeno

A caracterização espectroscópica do fármaco tamoxifeno, assim como o anastrozol, foi obtida através de espectros Raman do sólido e SERS da molécula adsorvida na superfície do metal utilizando a linha laser 632,8 nm. Novamente, seguindo o procedimento para obtenção do espectro SERS do anastrozol, foi necessário redispersar o tamoxifeno de uma solução estoque etanólica em água deionizada. A princípio foi utilizado um artigo de referência (GAMBERINI *et al.*, 2007) para realizar a atribuição das bandas aos modos vibracionais. No entanto, como foram feitos cálculos teóricos para otimização das estruturas do tamoxifeno com e sem um átomo de ouro, foram obtidos, também, espectros Raman teóricos a partir dos quais foi possível fazer comparações com os espectros obtidos experimentalmente.

A Figura 17 mostra os espectros experimentais do tamoxifeno adsorvido em superfície de ouro (SERS), o Raman do sólido e o espectro teórico do tamoxifeno com um átomo de ouro e da molécula livre.

Figura 17 - Comparação dos espectros SERS do tamoxifeno adsorvido em superfície de ouro experimental (a), teórico com um átomo de ouro (b) Raman do sólido experimental (c) e o espectro teórico do tamoxifeno livre (d)



Fonte: Elaborada pela própria autora.

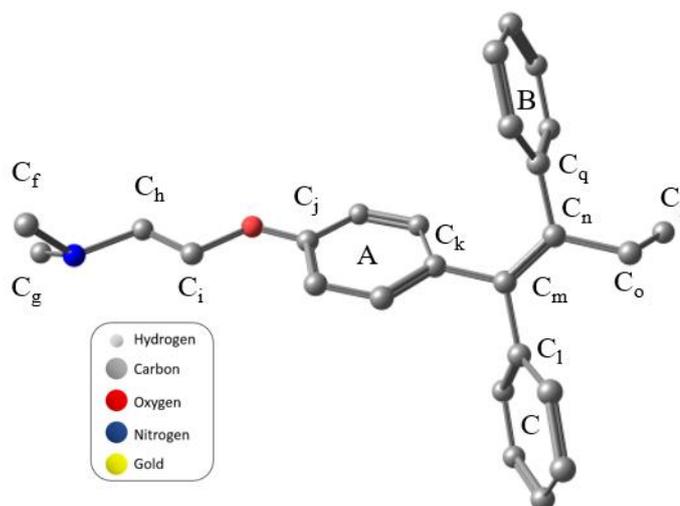
A Tabela 2 contém as atribuições vibracionais das bandas do tamoxifeno seguindo comparação com resultados obtidos computacionalmente da molécula de tamoxifeno livre. As referências de cada vibração atribuída estão relacionadas à Figura 17.

Tabela 2 - Atribuição vibracional de bandas selecionadas do tamoxifeno

<i>Teórico TAM</i>	<i>Raman sólido TAM (632.8 nm)</i>	<i>TAM com Au</i>	<i>SERS TAM com AuNPs (632.8 nm)</i>	<i>Atribuição</i>
980	1001	978	998	$\nu_{oop}(CC)_{B,C}$
1016	1024	1015	1022	$\nu_{br}(CC)_{A,B,C} + \nu(C_oC_p)$
1171	1177	1171	1175	$\nu(C_kC_mC_l) + \nu(CC)_{A,C} + \nu(C_nC_o)$
1285	1303	1300	1309	$\nu(CC)_A + \nu(C_jO) + \nu(C_kC_m)$
1389		1384	1373	$\nu(C_iC_h) + \nu(NC_h) + \nu(NC_fC_g)_{amina}$
1500	1510	1495	1495 (sh)	$\nu(CC)_A + \nu(C_jO) + \nu(C_kC_m)$
1605	1597	-	1593	$\nu(CC)_{B,C} + \nu(C_mC_n)$
1613	1611	1611	1611	$\nu(C_mC_n) + \nu(CC)_{A,B}$

$\nu$  = estiramento; oop = fora do plano; br = respiração; sh = ombro.

Figura 18 - Estrutura otimizada da molécula de tamoxifeno livre

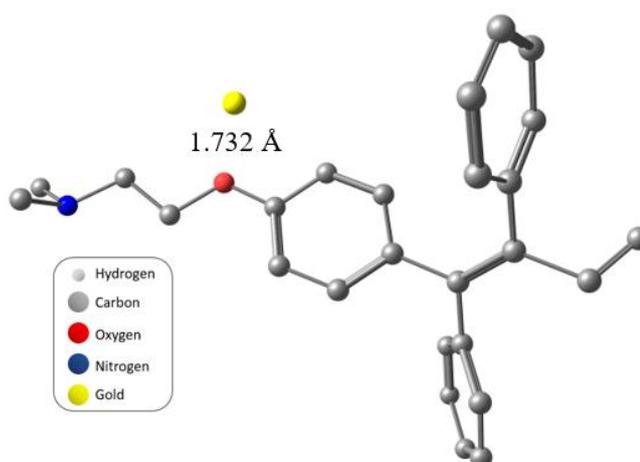


Fonte: Elaborada pela própria autora.

No espectro SERS do tamoxifeno adsorvido em superfície de ouro (Figura 17a), há intensificação das bandas em 1495 e 1309  $\text{cm}^{-1}$ , atribuídas a modos normais envolvendo o estiramento  $C_jO$  que pode ser um indicativo de que a molécula está adsorvendo através do oxigênio. Este resultado é coerente com o resultado reportado no artigo de Gamberini e colaboradores (2007), no qual é feito um estudo vibracional do composto citrato de

tamoxifeno. Através deste resultado, foi proposta uma simulação computacional da molécula de tamoxifeno com um átomo de ouro perto do oxigênio da molécula. A Figura 19 mostra a estrutura otimizada computacionalmente dessa interação e indica uma distância (1,732 Å) entre os átomos de ouro e oxigênio que sugere uma interação covalente.

Figura 19 - Estrutura otimizada da molécula de tamoxifeno com um átomo de ouro



Fonte: Elaborada pela própria autora.

## 4.2 Testes *in vitro*

### 4.2.1 MDA-MB-231

A fim de testar possíveis efeitos de toxicidade do sistema nanoestruturado e do fármaco antineoplásico envolvido, um ensaio utilizando a linhagem celular de carcinoma mamário MDA-MB-231 foi realizado. Em todos os ensaios de viabilidade celular realizados foi utilizado o método MTT de análise. Neste método, o reagente MTT é metabolizado pela mitocôndria celular. Sendo assim, quando a célula está viável, ou seja, com metabolismo ativo, a mesma metaboliza o MTT e o converte em um produto de coloração roxa, devido à formação de cristais de formazana (E,Z-1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazana). Em contrapartida, células mortas não são capazes de realizar esta conversão. Desta forma, a coloração roxa é usada como quantificador de viabilidade celular. Analisou-se a toxicidade de cada componente da síntese separadamente, testando cada um em cinco concentrações diferentes, como é mostrado na Figura 20. Os gráficos a, b, c e d (Figura 20) indicam os

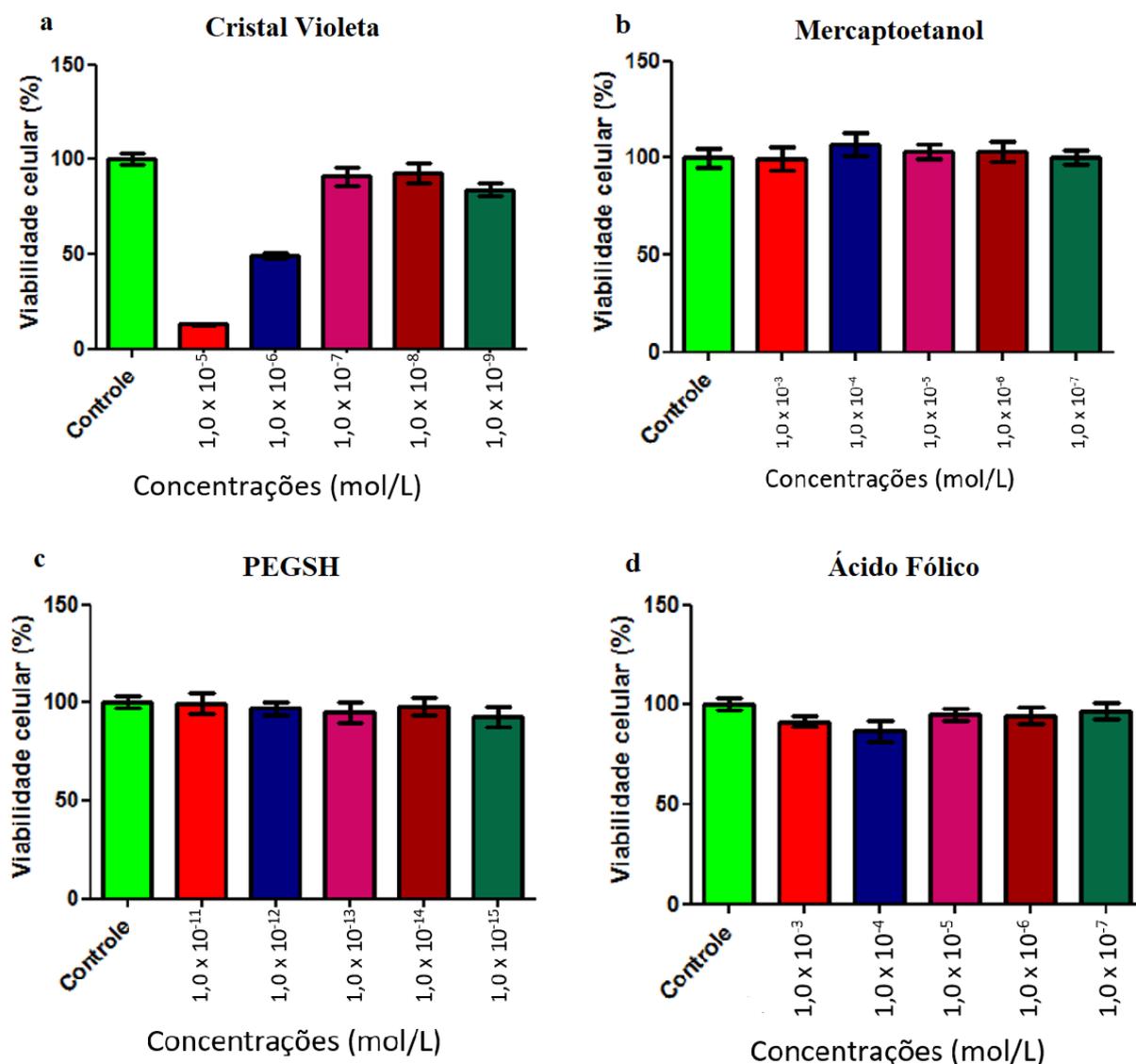
resultados de citotoxicidade para células MDA-MB-231 do CV, ME, PEGSH e HFol, respectivamente. Observou-se que os três últimos componentes (ME, PEGSH e HFol) não apresentaram toxicidade significativa às células ( $p > 0,05$ ). Apesar do CV (Figura 20a) apresentar certa toxicidade nas duas maiores concentrações, na concentração utilizada na síntese ( $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ ) o mesmo não causa toxicidade.

Além de testar a citotoxicidade de cada componente separadamente frente às células de linhagem MDA-MB-231, foi realizado, também, um teste de toxicidade de cada etapa de síntese (Figura 21). Como mostra a Tabela 3, as amostras testadas foram montadas de acordo com a sequência de adição dos componentes da síntese. Os resultados mostrados na Figura 21 indicam que a AuNP modificada apresentou toxicidade em todas as etapas de síntese. Sendo assim, foi necessário fazer uma diluição da síntese para diminuir os efeitos de toxicidade às células da linhagem MDA-MB-231 e, assim, poder analisar a toxicidade do fármaco em conjunto com a AuNP modificada, sem interferência de toxicidade da mesma.

Tabela 3: Descrição de componentes presentes nas amostras de etapas de montagem da síntese

<i>Amostra</i>	<i>Componentes</i>
1	AuNP
2	AuNP e cristal violeta (CV).
3	AuNP, cristal violeta (CV) e mercaptoetanol (ME).
4	AuNP, cristal violeta (CV), mercaptoetanol (ME) e ácido fólico.
5	AuNP, cristal violeta (CV), mercaptoetanol (ME), ácido fólico (HFol) e PEGSH.

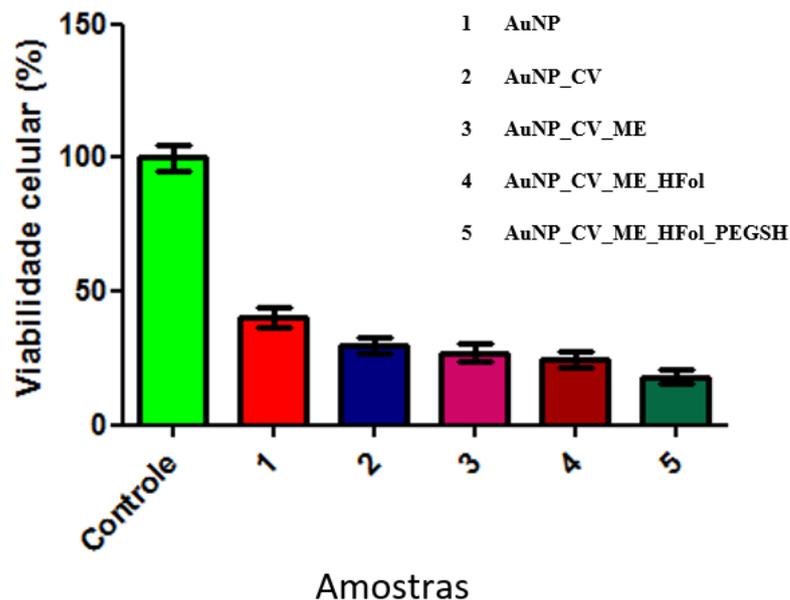
Figura 20 - Resultados de ensaio de viabilidade celular com absorbância em 540 nm de células MDA-MB-231 tratadas durante 48h com cristal violeta (a), mercaptoetanol (b), PEGSH (c) e ácido fólico.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

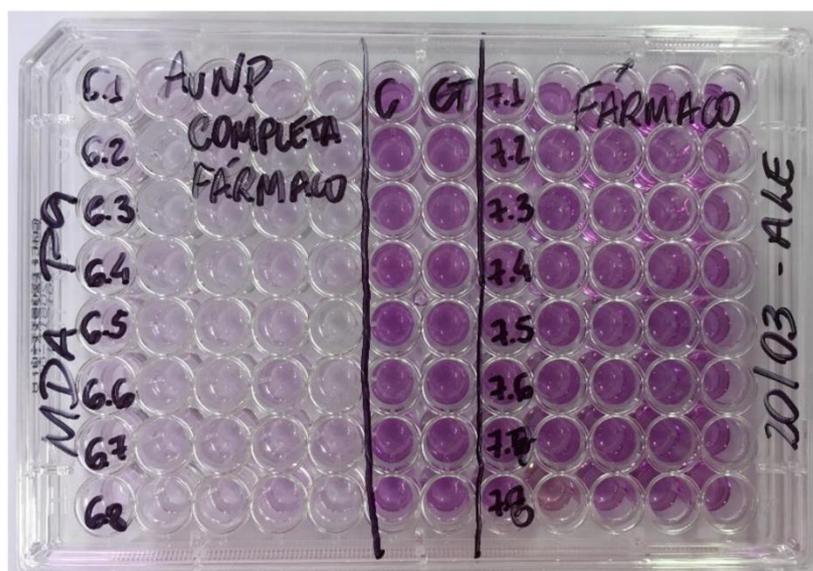
Tendo em vista que fármaco selecionado para a pesquisa (anastrozol) já tem aplicação reportada em tratamentos quimioterápicos de câncer de mama (BUZDAR *et al.*, 1996; VEKARIYA *et al.*, 2013), foi realizado um ensaio com oito concentrações do anastrozol. O fármaco foi testado na presença e ausência das nanopartículas de ouro modificadas, com o propósito de comparar a toxicidade do fármaco puro e com o sistema nanoestruturado.

Figura 21 - Resultado de ensaio de viabilidade celular com absorbância em 540 nm de células MDA-MB-231 tratadas durante 48h com cada etapa de montagem da síntese.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Figura 22 - Placa de 96-poços revelada com MTT com amostras tratadas com anastrozol puro (7.1 - 7.8) e anastrozol com o sistema nanoestruturado (6.1 - 6.8)

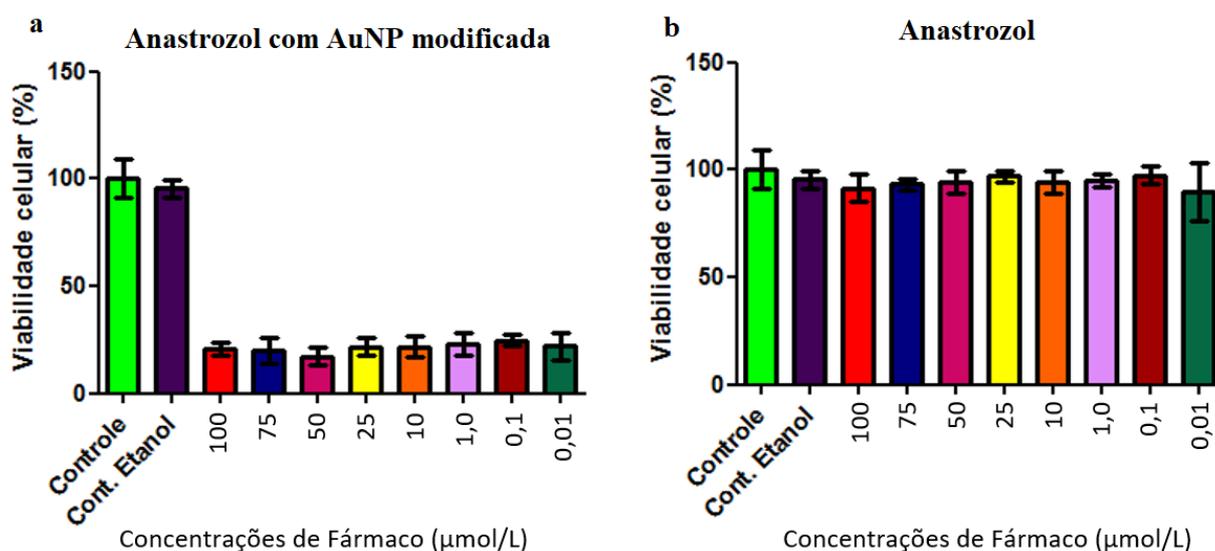


Fonte: Elaborada pela própria autora.

A Figura 22 ilustra o resultado do ensaio do anastrozol puro e com o sistema nanoestruturado utilizando o método MTT. A partir da explicação do funcionamento do método mostrada previamente, foi possível observar que o ensaio ilustrado na Figura 22 revelou que o fármaco puro não alterou a viabilidade celular visualmente quando utilizado nas concentrações de 0,01 a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Já o conjunto AuNP modificada com folato com anastrozol, nas mesmas concentrações do fármaco, teve efeito relativamente alto visualmente, diminuindo a viabilidade celular.

As observações referentes à Figura 22 são confirmados pelos resultados mostrados na Figura 23, na qual o conjunto AuNP com anastrozol apresentou toxicidade ( $p < 0,05$ ) e o anastrozol puro não causou toxicidade significativa às células ( $p > 0,05$ ).

Figura 23 - Resultado ensaios de viabilidade celular com absorbância em 540 nm de células MDA-MB-231 tratadas durante 48h com anastrozol com a síntese completa do sistema nanoestruturado (a) e anastrozol puro (b).

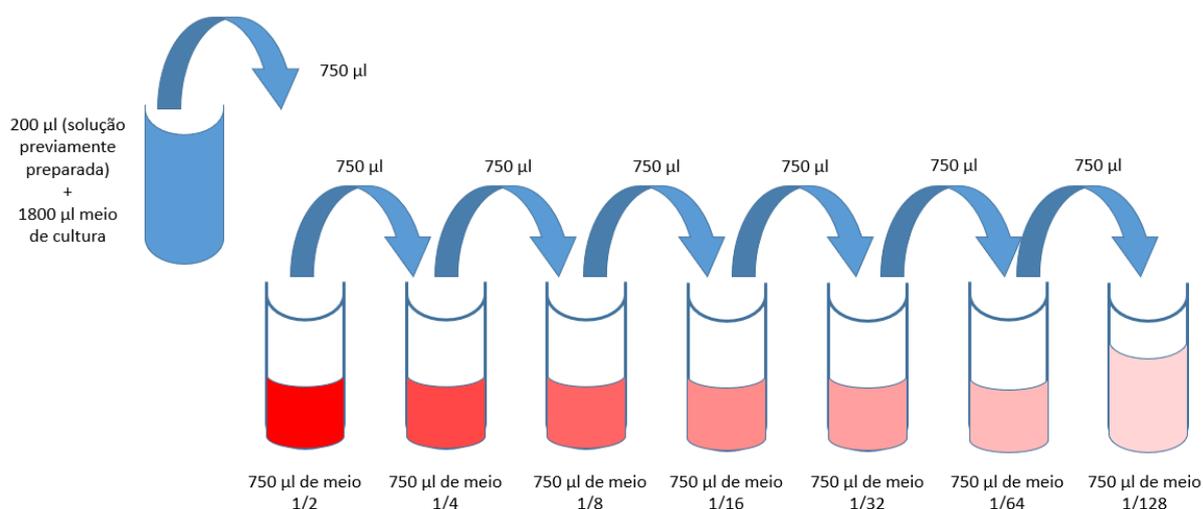


Fonte: Elaborada pela própria autora.

Com o intuito de analisar a toxicidade do anastrozol, foi realizado um segundo ensaio com a linhagem MDA-MB-231 testando um intervalo de concentração maior do fármaco, abrangendo de 100 a 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Além disso, foi feita uma diluição seriada da AuNP modificada com folato para analisar a toxicidade do sistema nanoestruturado completo sem o

fármaco frente a linhagem de carcinoma mamário. O procedimento de diluição seriada é ilustrado na Figura 24.

Figura 24 - Esquema de diluição seriada

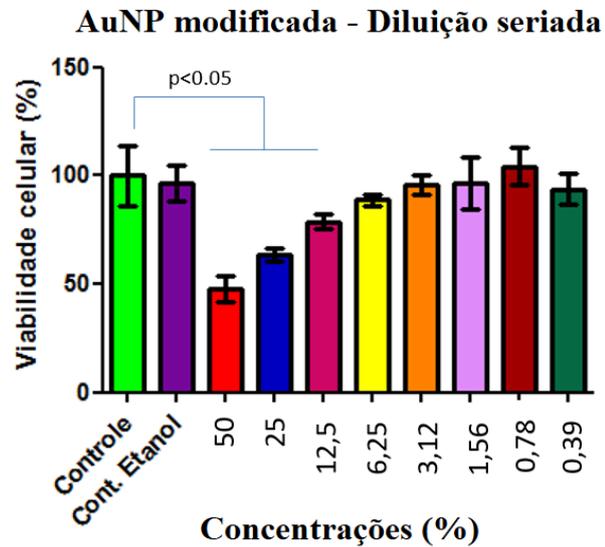


Fonte: Elaborada pela própria autora.

Após o procedimento de diluição seriada do sistema nanoestruturado, observou-se que a toxicidade da AuNP modificada com folato é diminuída ( $p > 0,05$ ) quando diluída até 6,25% da amostra original, não demonstrando toxicidade estatisticamente relevante (Figura 25).

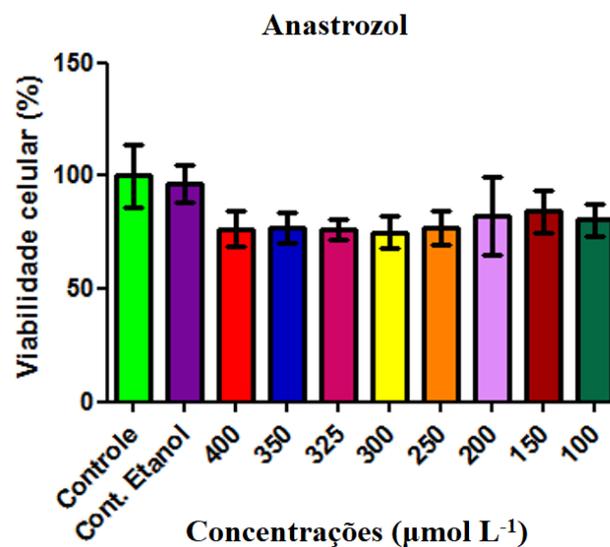
Como mostra a Figura 26, mesmo em concentrações mais elevadas, o anastrozol não apresentou toxicidade à linhagem celular de carcinoma mamário (MDA-MB-231). A ausência de expressão do receptor de estrógeno, devido à regulação da expressão gênica tornando-o inativo, causa a falha de resposta ao tratamento anti-hormonal. Esta é uma explicação para a não toxicidade do anastrozol nos dois primeiros ensaios realizados com a linhagem MDA-MB-231, uma vez que esse fármaco tem ação em células com receptor de estrógeno ativo (GIACINTI *et al.*, 2012).

Figura 25 - Resultado ensaios de viabilidade celular com absorbância em 540 nm de células MDA-MB-231 tratadas durante 48h com soluções diluídas do sistema nanoestruturado sem fármaco.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Figura 26 - Resultado ensaios de viabilidade celular com absorbância em 540 nm de células MDA-MB-231 tratadas durante 48h com anastrozol

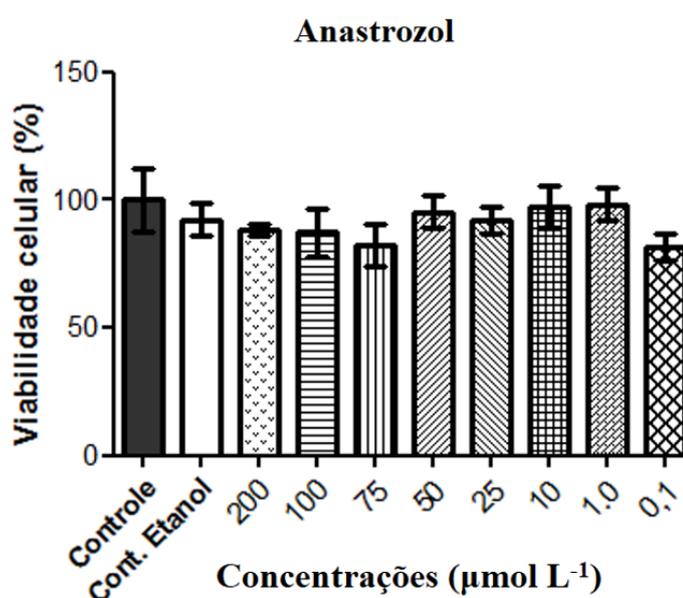


Fonte: Elaborada pela própria autora.

#### 4.2.2 MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7)

A fim de se testar a interação do fármaco anastrozol com uma linhagem celular de carcinoma mamário que tenha com receptor de estrógeno ativo, o terceiro ensaio biológico foi realizado com a linhagem MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) que é triplo positiva (receptor de estrógeno (+), receptor de progesterona (+) e receptor de aromatase (+)). O intervalo de concentração de anastrozol utilizado no terceiro ensaio foi o mesmo do primeiro teste com MDA-MB-231, de 0,1 a 200  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . O ensaio utilizando este intervalo de concentração de anastrozol não apresentou toxicidade significativa ( $p > 0,05$ ) à linhagem celular MCF-7, como mostrado na Figura 27.

Figura 27 - Resultado ensaios de viabilidade celular com absorbância em 540 nm de células MCF-7 tratadas durante 48h com anastrozol

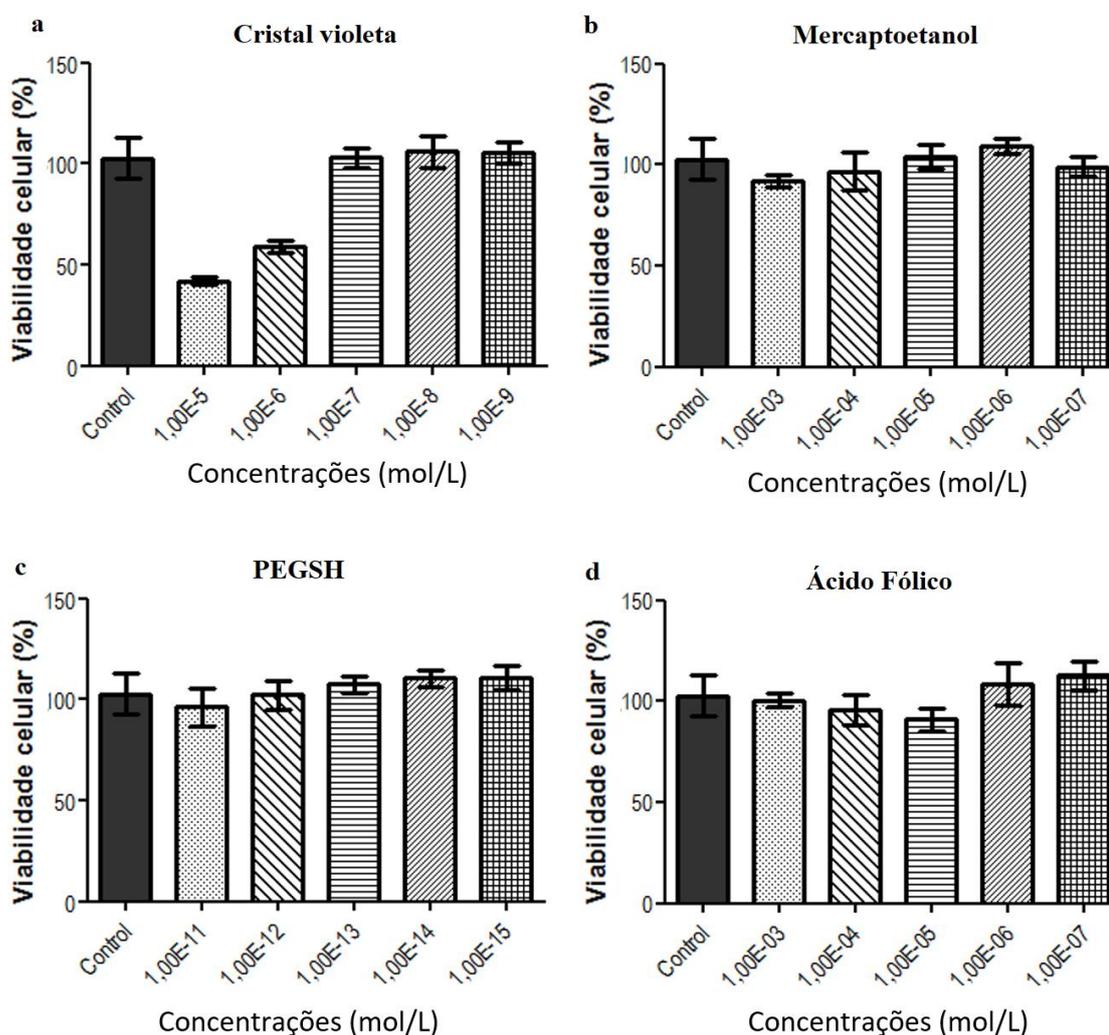


Fonte: Elaborada pela própria autora.

Considerando que foi feita uma alteração de linhagem celular da MDA-MB-231 para MCF-7, foi necessário repetir os testes de citotoxicidade de cada componente da síntese separadamente bem como a toxicidade do sistema nanoestruturado completo. Os resultados de toxicidade dos componentes de síntese são mostrados nos gráficos (a - d) da Figura 28.

Novamente, assim como ocorreu com a linhagem MDA-MB-231, o CV apresentou toxicidade relativamente alta ( $p < 0,05$ ) nas concentrações  $1,0 \times 10^{-5}$  e  $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. No entanto, a concentração utilizada na síntese continuou sendo a  $1,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>, que não apresentou toxicidade à linhagem celular MCF-7 ( $p > 0,05$ ).

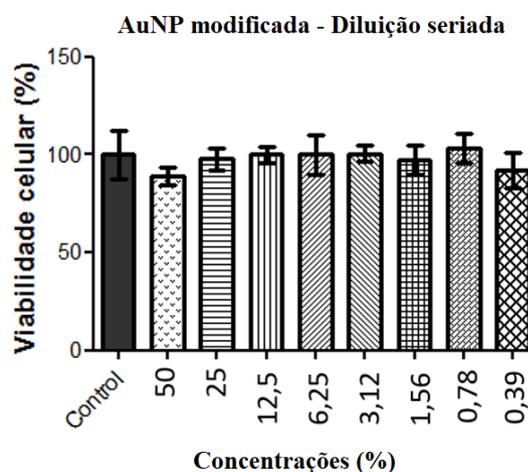
Figura 28 - Resultados de ensaio de viabilidade celular com absorbância em 540 nm de células MCF-7 tratadas durante 48h com cristal violeta (a), mercaptoetanol (b), PEGSH (c) e ácido fólico.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Por outro lado, o sistema nanoestruturado, diferente do que foi observado no ensaio com a linhagem MDA-MB-231 (Figura 21), não apresentou citotoxicidade relevante à linhagem MCF-7, como mostra a Figura 29. Seguindo o procedimento realizado com a primeira linhagem celular, o ensaio com a AuNP modificada com folato, também, foi feito com diluição seriada. Como não foi detectada toxicidade estatisticamente relevante ( $p > 0,05$ ), não foi necessário diluir os sistemas nanoestruturados completos nos ensaios seguintes.

Figura 29 - Resultado ensaios de viabilidade celular com absorbância em 540 nm de células MCF-7 tratadas durante 48h com soluções diluídas do sistema nanoestruturado sem fármaco



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Segundo Giacinti e colaboradores, o anastrozol tem ação em células com receptores de estrógeno ativos (GIACINTI *et al.*, 2012). Devido a esta informação, optou-se por testar este fármaco na linhagem MCF-7, como mostrado na Figura 27, e observou-se que o fármaco não apresentou toxicidade ( $p > 0,05$ ). Como o mecanismo de ação não era totalmente esclarecido, decidiu-se por estudá-lo mais a fundo. O anastrozol, assim como o letrozol, são exemplos de inibidores de aromatase tipo II (não-esteroidais) (AKCAY e BAYRAK, 2014) que agem em tecidos periféricos suprimindo a produção de estrógeno, mitigando a crescimento das células tumorais (BHATNAGAR, 2007). Como a aromatase é uma enzima responsável pela aromatização de andrógenos em estrógenos e o anastrozol age na enzima impedindo essa aromatização, o mesmo não age no sítio celular (CASSOL e GARICOCHEA, 2005). Logo, o anastrozol não atua diretamente no receptor de estrógeno da célula. Além disso, seria

necessário que a célula tivesse a enzima aromatase intracelular ativa, e não só seu receptor. Sendo assim, se a linhagem MCF-7 fosse transfectada com aromatase, tornando a enzima intracelular ativa (THIANTANAWAT *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2009), e fosse adicionado estradiol ao meio de cultura utilizado no ensaio com linhagem MCF-7, seria possível obter resultados de taxa de proliferação comparativas. Uma vez que o estradiol fosse adicionado e a célula tivesse a capacidade de processar a molécula, através da enzima intracelular transfectada, a célula teria o aumento da taxa de crescimento. Sendo assim, como o anastrozol atua na enzima aromatase, poderia inibir o crescimento celular.

Devido à impossibilidade de realizar o procedimento de transfecção da aromatase na linhagem celular MCF-7 e não ter nenhuma outra linhagem com a enzima ativa (e.g. linhagem celular 4T1 – carcinoma mamário (XANTHOPOULOS *et al.*, 2005)) disponível para continuar os ensaios com o anastrozol, optou-se por utilizar outro fármaco. Desta forma, iniciaram-se os testes *in vitro* com o fármaco tamoxifeno para analisar a eficiência do sistema nanoestruturado na linhagem celular MCF-7.

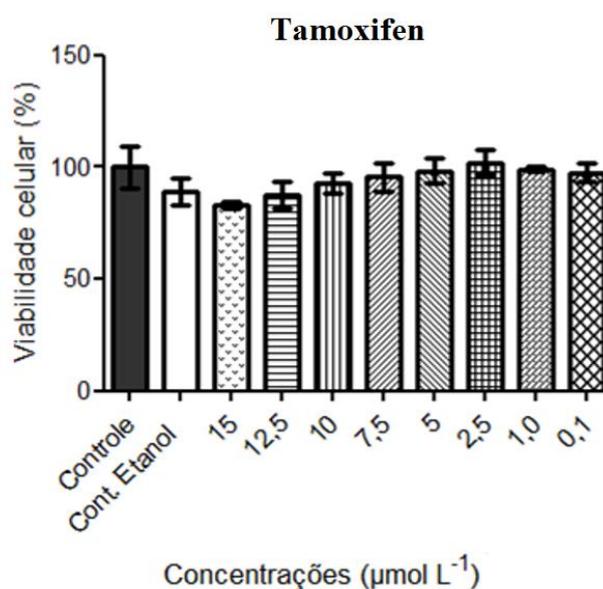
O tamoxifeno, assim como o anastrozol, também faz parte do grupo de fármacos antiestrogênicos não-esteroidais que são utilizados no tratamento de cânceres de mama hormônio-dependentes. Enquanto o anastrozol tem ação na enzima aromatase, o tamoxifeno é modulador seletivo que se liga ao receptor de estrógeno impedindo, assim, que a molécula de estrógeno se ligue, gerando uma competição inibitória (KALLIO *et al.*, 2005; RAVIKUMARA *et al.*, 2016). Além da ação direta no receptor de estrógeno, o tamoxifeno gera um colapso no potencial funcional da membrana por inibir a transferência de elétrons na cadeia respiratória (TUQUET *et al.*, 2000). No estudo de Kallio e colaboradores, é explicado que a mitocôndria é um dos pontos centrais de ação do tamoxifeno. A morte celular está associada à liberação de *citocromo c* (proteína heme associada à membrana interna da mitocôndria (NCBI, 2017), decréscimo do potencial da membrana mitocondrial e aumento da produção de espécies de oxigênio reativas (KALLIO *et al.*, 2005).

O teste de citotoxicidade do tamoxifeno foi realizado utilizando a mesma linhagem celular (MCF-7) com concentrações do fármaco variando entre 0,1 e 15  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A Figura 30 mostra

os resultados do ensaio de citotoxicidade da linhagem celular MCF-7 com o fármaco tamoxifeno, que apresentou toxicidade apenas na concentração  $15 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ).

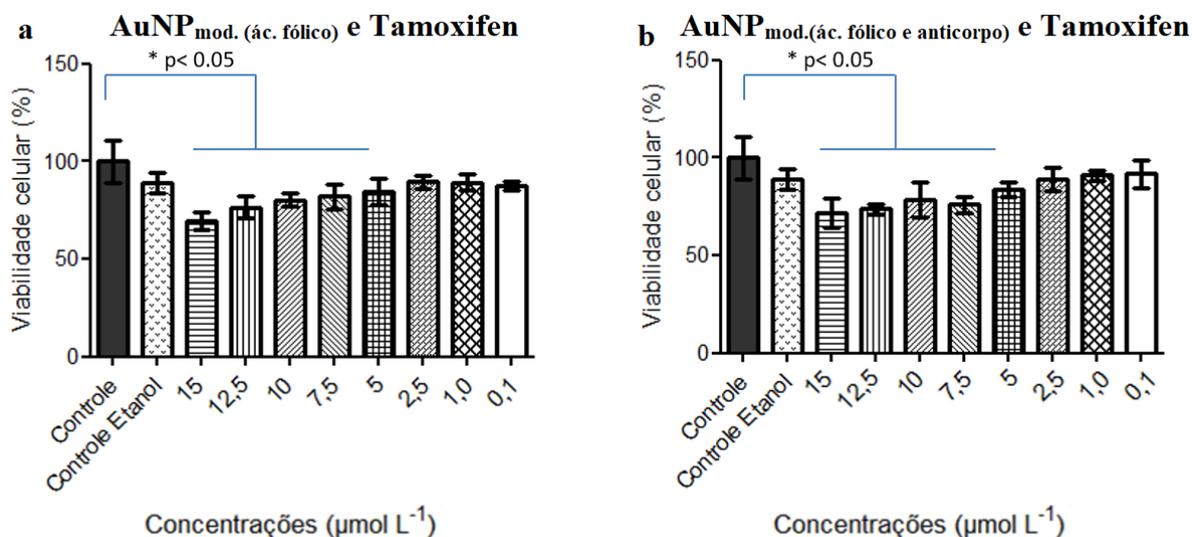
Por outro lado, quando o fármaco foi conjugado com o a AuNP modificada, a sua toxicidade foi mais elevada afetando a viabilidade celular em 15 a 30% nas concentrações de 5 a  $15 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $p < 0,05$ ). Os resultados da conjugação são mostrados na Figura 31.

Figura 30 - Resultado ensaios de viabilidade celular com absorbância em 540 nm de células MCF-7 tratadas durante 48h com tamoxifeno



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Figura 31 - Resultado ensaios de viabilidade celular com absorbância em 540 nm de células MCF-7 tratadas durante 48h com AuNP modificada com ácido fólico conjugada com tamoxifeno (a) e AuNP modificada com ácido fólico e anticorpo conjugada com tamoxifeno (b).



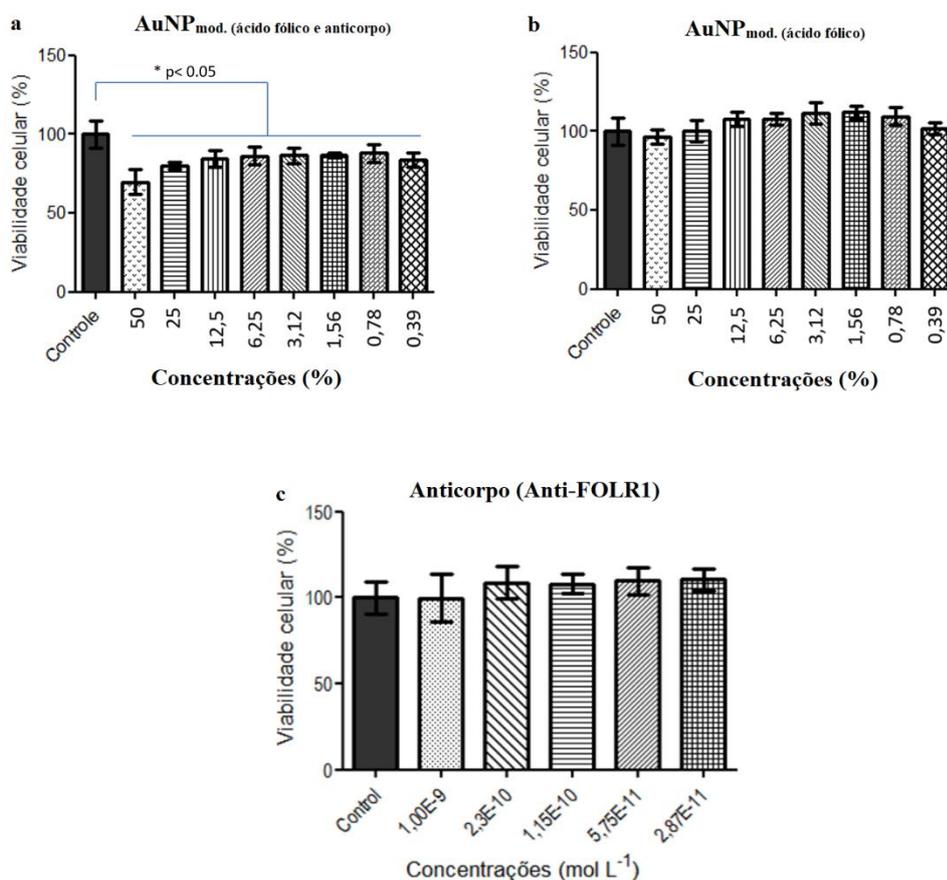
Fonte: Elaborada pela própria autora.

O ensaio do tamoxifeno com AuNP modificada foi realizado com duas sínteses diferentes, uma utilizando apenas o HFol como biomolécula direcionadora e a outra utilizando um anticorpo seletivo para receptores de ácido fólico (Anti-FOLR1) junto com o HFol. A finalidade de testar as duas sínteses foi de avaliar se a presença do anticorpo apresentava algum efeito adicional na especificidade para a linhagem celular MCF-7. Desta forma, foi feita uma comparação de toxicidade do tamoxifeno conjugado com a AuNP modificada apenas com HFol e com a AuNP modificada com HFol e anticorpo. A Figura 31 mostra os resultados do fármaco conjugado com as duas sínteses. Apesar da síntese que contém anticorpo parecer, inicialmente, que terá um resultado mais significativo, ambas as sínteses tiveram relativamente os mesmos resultados estatísticos.

A análise de toxicidade dos compostos isolados, anticorpo e as duas sínteses sem o fármaco, também foi realizada para a linhagem MCF-7. As amostras foram testadas utilizando o método de diluição seriada demonstrado na Figura 24. Os resultados mostrados na Figura 32 revelaram que a AuNP modificada com as duas biomoléculas direcionadoras apresentou certa

toxicidade à linhagem ( $p < 0,05$ ), o que não foi observado na análise da AuNP modificada apenas com HFol ( $p > 0,05$ ). O anticorpo anti-receptor de folato (Anti-FOLR1) também não apresentou toxicidade estatisticamente relevante à linhagem celular MCF-7 ( $p > 0,05$ ).

Figura 32 - Resultados de ensaio de viabilidade celular com absorbância em 540 nm de células MCF-7 tratadas durante 48h com AuNP modificada com ácido fólico e anticorpo (a), AuNP modificada com ácido fólico (b) e anticorpo (Anti-FOLR1) (c).



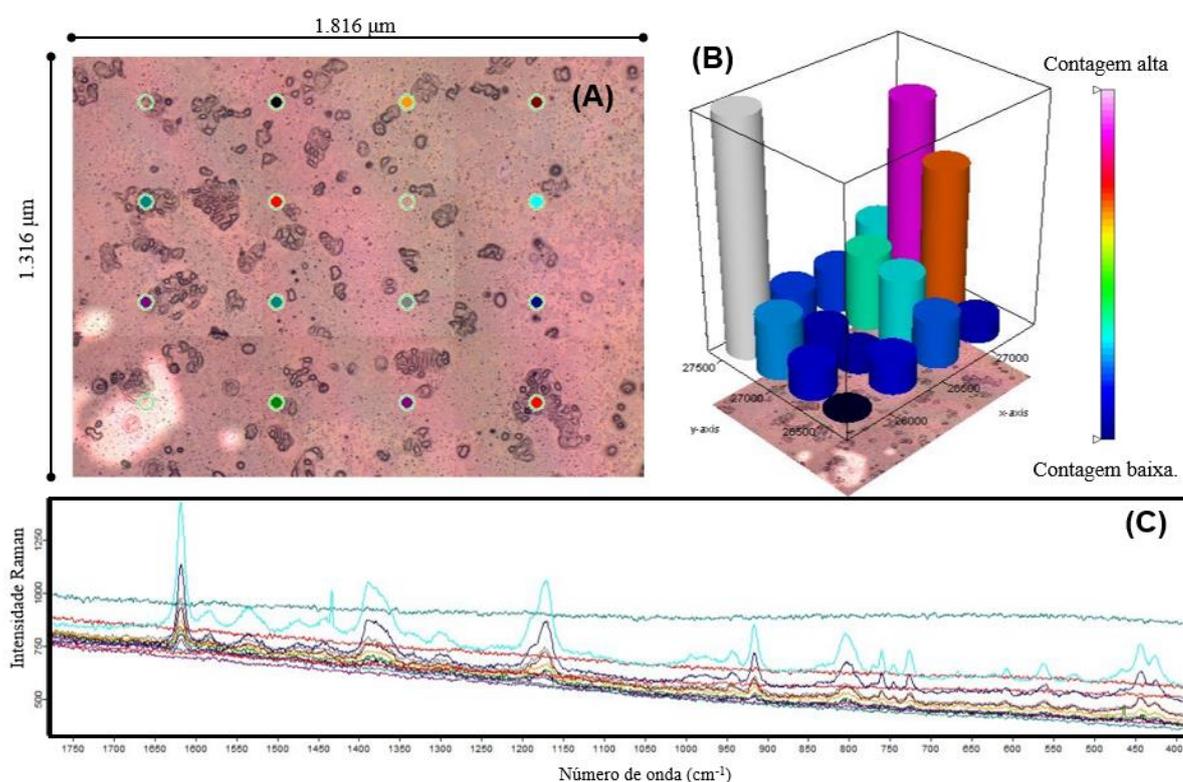
Fonte: Elaborada pela própria autora.

### 4.3 Mapeamento SERS

O mapeamento foi realizado utilizando o sinal do CV para rastrear a localização de nanopartículas de ouro e certificar a interação das mesmas com as células de câncer de mama da linhagem MCF-7. A Figura 33 é referente ao mapeamento do sinal do CV nas células de câncer MCF-7 com a amostra com PEGSH (3), sem as biomoléculas reconhecedoras, HFol e

anticorpo. Todos os mapeamentos realizados seguiram o mesmo padrão de análise, levando em consideração a presença de células para seleção de pontos. Através deste mapeamento foi possível verificar a interferência dos diferentes componentes, HFol, anticorpo e tamoxifeno, na interação com as células fazendo diferentes montagens, como mostra a Tabela 4.

Figura 33 - Mapeamento do sinal do cristal violeta em células de câncer MCF-7. Lamínula de vidro com células, tratadas com AuNP modificadas, fixadas (a), intensidade do sinal da banda em  $1150\text{ cm}^{-1}$  dos espectros SERS do CV em cada ponto analisado (b) e padrão espectral do CV em cada ponto analisado (c).



Fonte: Elaborada pela própria autora

Na Tabela 4, os resultados 1 e 1T foram obtidos utilizando-se os dois reconhecedores biológicos HFol e Anti-FOLR1, na ausência e presença do tamoxifeno, respectivamente; os resultados 2 e 2T não tiveram HFol na preparação; e dos resultados 3 e 3T foram excluídos o anticorpo e o HFol.

Tabela 4 - Relação de montagem de nanosistema com percentual de sinal do CV em interação com células de câncer MCF-7

<i>Nº</i>	<i>Montagem</i>	<i>Fração de pontos com sinal</i>	<i>Porcentagem com sinal (%)</i>
1	AuNP_CV_anti_HFol_PEGSH	13/20	65
1T	AuNP_CV_anti_HFol_PEGSH_TAM	15/18	83
2	AuNP_CV_anti_PEGSH	19/63	30
2T	AuNP_CV_anti_PEGSH_TAM	11/29	38
3	AuNP_CV_PEGSH	4/30	13
3T	AuNP_CV_PEGSH_TAM	7/21	33

CV = cristal violeta; anti = Anti-FOLR1; HFol = ácido fólico; PEGSH = polímero

Comparando os resultados da montagem com os dois reconhecedores biológicos (1), anticorpo e HFol, com a montagem que contém apenas o anticorpo (2), há um aumento na porcentagem de pontos com sinal do CV de 30 para 65% na presença do HFol, evidenciando sua importância para o sistema. A importância da presença do anticorpo também é evidenciada comparando os resultados da montagem com apenas o anticorpo (2) e a montagem sem nenhum reconhecedor biológico (3), quando o percentual de pontos com sinal do marcador cai de 30% (2) para 13% (3). Após análise dos resultados de percentual de sinal do marcador SERS, CV, nos ensaios com células de câncer, foi possível observar que a presença do fármaco tamoxifeno aumenta, consideravelmente, a quantidade de pontos com sinal do marcador CV e, conseqüentemente, a interação do nanosistema com as células. Todos os pontos considerados na estatística dos mapeamentos foram selecionados em áreas com células. A realização do mapeamento foi relevante para obter mais uma evidência de interação dos componentes do nanosistema e comprovação do efeito da presença das biomoléculas reconhecedoras das células de câncer.

## 5. CONCLUSÕES

Através das espectroscopias UV-VIS-NIR e SERS foi possível executar um estudo da interação dos adsorbatos: cristal violeta, mercaptoetanol, ácido fólico, PEGSH, anastrozol e tamoxifeno com as nanopartículas de ouro. Este estudo possibilitou a análise de como cada um destes adsorbatos interage com a superfície metálica, proporcionando a otimização dos nanosistemas para aplicação nos ensaios *in vitro* com células de câncer.

A realização de cálculos teóricos para o tamoxifeno, com e sem um átomo de ouro, possibilitou um melhor entendimento da interação da molécula com o metal. As comparações realizadas entre os espectros Raman e SERS experimentais e os obtidos a partir de cálculo indicam que a molécula está adsorvendo na superfície metálica através do oxigênio da estrutura do tamoxifeno.

Os espectros teóricos obtidos para o anastrozol, com e sem um átomo de ouro, possibilitou a atribuição de bandas presentes nos espectros Raman e SERS experimentais referentes a modos vibracionais que evidenciaram o sítio de interação da molécula com o metal. A partir destes resultados foi possível concluir que o anastrozol interage através do anel triazol da estrutura.

Após os ensaios iniciais de citotoxicidade, as concentrações foram definidas de modo que os nanosistemas não apresentaram citotoxicidade nos ensaios com a linhagem de células de câncer de mama MDA-MB-231 e MCF-7. O fármaco anastrozol não apresentou efeito tóxico para as linhagens MDA-MB-231 e MCF-7. Com a linhagem celular MCF-7, os nanosistemas completos em conjunto com o fármaco tamoxifeno, aumentaram a interação com as células e diminuíram a concentração mínima efetiva do fármaco. Conclui-se que o nanosistema construído tem potencial aplicação para entrega controlada de fármacos.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos a partir da utilização de nanopartículas de ouro com biomoléculas direcionadoras em ensaios *in vitro* com células de câncer apontam potenciais aplicações para sistemas de entrega controlada de fármacos. Portanto, este nanosistema pode ser testado com outros antineoplásicos a fim de atender diferentes tipos de células de câncer.

Como perspectivas futuras, objetiva-se adequar este nanosistema para testes *in vivo* e testar o nanosistema em diferentes linhagens de células de câncer de mama com outros fármacos. Além disso, continuar aplicando as técnicas espectroscópicas Raman e SERS como ferramentas de estudo de interação entre biomoléculas, e fármacos, com superfícies metálicas.

**REFERÊNCIAS**

AKCAY, H. T.; BAYRAK, R. Computational studies on the anastrozole and letrozole, effective chemotherapy drugs against breast cancer. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 122, p. 142-152, Mar 2014. ISSN 1386-1425. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000332438300017 >.

ANAND, P. et al. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 9, p. 2097-2116, Sep 2008. ISSN 0724-8741. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000258408400014 >.

AROCA, R. *Surface-enhanced vibrational spectroscopy*. John Wiley & Sons, 2006.

BHATNAGAR, A. S. The discovery and mechanism of action of letrozole. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 105, p. 7-17, 2007. ISSN 0167-6806. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000250507400003 >.

BOCA-FARCAU, S. et al. Folic Acid-Conjugated, SERS-Labeled Silver Nanotriangles for Multimodal Detection and Targeted Photothermal Treatment on Human Ovarian Cancer Cells. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 2, p. 391-399, Feb 2014. ISSN 1543-8384. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000330812500003 >.

BOISSELIER, E.; ASTRUC, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 6, p. 1759-1782, 2009. ISSN 0306-0012. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000266411500020 >.

BUZDAR, A. et al. Anastrozole, a potent and selective aromatase inhibitor, versus megestrol acetate in postmenopausal women with advanced breast cancer: Results of overview analysis of two phase III trials. **Journal of Clinical Oncology**, v. 14, n. 7, p. 2000-2011, Jul 1996. ISSN 0732-183X. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1996UV71500005 >.

CAMPBELL, D. J.; XIA, Y. **Plasmons: Why Should We Care?** Journal of Chemical Education. 84 2007.

CASSOL, L. B.; GARICOCHEA, B. **Uso de inibidores da aromatase no tratamento do câncer de mama e osteoporose** The use of aromatase inhibitors for breast cancer treatment and osteoporosis. Scientia Medica - Porto Alegre: PUCRS. 15 2005.

CASTILLO, J. J. et al. Silver-capped silicon nanopillar platforms for adsorption studies of folic acid using surface enhanced Raman spectroscopy and density functional theory. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 46, n. 11, p. 1087-1094, Nov 2015. ISSN 0377-0486. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000367663100008 >.

CHEN, Y. S. et al. Assessment of the In Vivo Toxicity of Gold Nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, v. 4, n. 8, p. 858-864, Aug 2009. ISSN 1931-7573. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000267897800014 >.

**Estimativa 2016, Incidência de Câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/ Ministério da Saúde 2015.

ETCHEGOIN, P.; LE RU, E. **Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy**. Elsevier, 2009. ISBN 978-0-444-52779-0.

FARIA, D. D.; TEMPERINI, M. L.; SALA, O. **Vinte anos de efeito SERS**: Química Nova. 22: p. 541 - 552 p. 1999.

FILGUEIRAS, A. L. et al. The adsorption of rifampicin on gold or silver surfaces mediated by 2-mercaptoethanol investigated by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 86, p. 75-80, Sep 2016. ISSN 0924-2031. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000384865000011 >.

FONSECA, B. G. **Estudo da interação entre peptídeos derivados de triptofano e nanopartículas metálicas**. 2016. (Mestrado). Instituto de Ciências Exatas - Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil.

FRENS, G. **Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions**: Nature Physical Science. 241: 20-22 p. 1973.

GAMBERINI, M. C. et al. Vibrational study of tamoxifen citrate polymorphism. **Journal of Molecular Structure**, v. 840, n. 1-3, p. 29-37, Sep 2007. ISSN 0022-2860. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000250069200005 >.

GIACINTI, L. et al. Scriptaid effects on breast cancer cell lines. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, n. 10, p. 3426-3433, Oct 2012. ISSN 0021-9541. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000305509900009 >.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000084722600005 >.

HOMOLA, J. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 2, p. 462-493, Feb 2008. ISSN 0009-2665. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000253165500007 >.

INCA. p. Instituto Nacional de Câncer, 2017. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/tratamento> >. Acesso em: 06/11/2017.

**Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline**. Washington

(DC): National Academies Press (US), 1998. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114310/> >.

KALLIO, A. et al. Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. **Apoptosis**, v. 10, n. 6, p. 1395-1410, Dec 2005. ISSN 1360-8185. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000234653600017 >.

KELLY, K. L. et al. The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 3, p. 668-677, Jan 2003. ISSN 1520-6106. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000180545300005 >.

KNEIPP, K. et al. Surface-enhanced Raman scattering and biophysics. **Journal of Physics-Condensed Matter**, v. 14, n. 18, p. R597-R624, May 2002. ISSN 0953-8984. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000175816300003 >.

KUNDU, S.; PATRA, A. Nanoscale Strategies for Light Harvesting. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 2, p. 712-757, Jan 2017. ISSN 0009-2665. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000392910400006 >.

MACLAUGHLIN, C. M. et al. Surface-Enhanced Raman Scattering Dye-Labeled Au Nanoparticles for Triplexed Detection of Leukemia and Lymphoma Cells and SERS Flow Cytometry. **Langmuir**, v. 29, n. 6, p. 1908-1919, Feb 2013. ISSN 0743-7463. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000315018200024 >.

MCCREERY, R. L. **Raman Spectroscopy for Chemical Analysis** 2000. ISBN 0-471-25287-5.

MCNAY, G. et al. Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS): A Review of Applications. **Applied Spectroscopy**, v. 65, n. 8, p. 825-837, Aug 2011. ISSN 0003-7028. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000293206800001 >.

MENG, W. et al. SERS and DFT study of crystal violet. **Journal of Molecular Structure**, v. 1035, p. 326-331, Mar 2013. ISSN 0022-2860. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000315315500044 >.

MOSKOVITS, M. SURFACE-ENHANCED SPECTROSCOPY. **Reviews of Modern Physics**, v. 57, n. 3, p. 783-826, 1985. ISSN 0034-6861. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1985APC5700006 >.

NAKAMOTO, K.; FERRARO, J. R. **Introductory Raman Spectroscopy**. 1994. ISBN 0-12-253990-7.

NCBI. **The National Center for Biotechnology Information** 2017.

NIH. p. National Cancer Institute, 2017. Disponível em: < <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types> >. Acesso em: 06/11/2017.

QIAN, X. M. et al. In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 83-90, Jan 2008. ISSN 1087-0156. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000252222500027 >.

QIN, S. Y. et al. Drug self-delivery systems for cancer therapy. **Biomaterials**, v. 112, p. 234-247, Jan 2017. ISSN 0142-9612. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000389166700020 >.

RAVIKUMARA, N. R.; BHARADWAJ, M.; MADHUSUDHAN, B. Tamoxifen citrate-loaded poly(d,l) lactic acid nanoparticles: Evaluation for their anticancer activity in vitro and in vivo. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 31, n. 5, p. 755-772, Nov 2016. ISSN 0885-3282. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000386976700012 >.

SALA, O. **Fundamentos da Espectroscopia Raman e no Infravermelho**. 2nd edition. 2008. ISBN 978-85-7139-868-9.

SARKAR, K.; YANG, H. Encapsulation and extended release of anti-cancer anastrozole by stealth nanoparticles. **Drug Delivery**, v. 15, n. 5, p. 343-346, Jul-Aug 2008. ISSN 1071-7544. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000257588800009 >.

SHI, J. J. et al. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 1, p. 20-37, Jan 2017. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000391518900005 >.

TARABARA, V. V.; NABIEV, I. R.; FEOFANOV, A. V. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) study of mercaptoethanol monolayer assemblies on silver citrate hydrosol. Preparation and characterization of modified hydrosol as a SERS-active substrate. **Langmuir**, v. 14, n. 5, p. 1092-1098, Mar 1998. ISSN 0743-7463. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000072390800019 >.

THIANTANAWAT, A.; LONG, B. J.; BRODIE, A. M. Signaling pathways of apoptosis activated by aromatase inhibitors and antiestrogens. **Cancer Research**, v. 63, n. 22, p. 8037-8050, Nov 2003. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000186770700073 >.

TUQUET, C. et al. Effects of tamoxifen on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria. **Cell Biology and Toxicology**, v. 16, n. 4, p. 207-219, 2000. ISSN 0742-2091. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000089975500001 >.

VEKARIYA, K. K.; KAUR, J.; TIKOO, K. Alleviating anastrozole induced bone toxicity by selenium nanoparticles in SD rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 268, n. 2, p. 212-220, Apr 2013. ISSN 0041-008X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000316978700012 >.

WAKELING, A. E.; DUKES, M.; BOWLER, J. A POTENT SPECIFIC PURE ANTIESTROGEN WITH CLINICAL POTENTIAL. **Cancer Research**, v. 51, n. 15, p. 3867-3873, Aug 1991. ISSN 0008-5472. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1991FY28700007 >.

WANG, L. S.; CHUANG, M. C.; HO, J. A. A. Nanotheranostics - a review of recent publications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 4679-4695, 2012. ISSN 1178-2013. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000307884200001 >.

WANG, S.; LOW, P. S. Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs, imaging agents, and nucleic acids to cancer cells. **Journal of Controlled Release**, v. 53, n. 1-3, p. 39-48, Apr 1998. ISSN 0168-3659. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000073522600006 >.

WILLETS, K. A.; VAN DUYNE, R. P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. In: (Ed.). **Annual Review of Physical Chemistry**. Palo Alto: Annual Reviews, v.58, 2007. p.267-297. (Annual Review of Physical Chemistry).

XANTHOPOULOS, J. M.; ROMANO, A. E.; MAJUMDAR, S. K. Response of mouse breast cancer cells to anastrozole, tamoxifen, and the combination. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, n. 1, p. 10-19, Jan 2005. ISSN 1110-7243. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000230737900002 >.

YOSHIMOTO, K. et al. Direct Observation of Adsorption-Induced Inactivation of Antibody Fragments Surrounded by Mixed-PEG Layer on a Gold Surface. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 23, p. 7982-7989, Jun 2010. ISSN 0002-7863. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000278717700045 >.