



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

GISELE PEREIRA DINIZ SCHUENCK

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE
NANOPARTÍCULAS DE OURO USANDO EPIGALOCATEQUINA-3-
GALATO (EGCG)**

VITÓRIA, ES

2018

GISELE PEREIRA DINIZ SCHUENCK

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE
NANOPARTÍCULAS DE OURO USANDO EPIGALOCATEQUINA-3-
GALATO (EGCG)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães.

VITÓRIA, ES

2018

GISELE PEREIRA DINIZ SCHUENCK

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE
NANOPARTÍCULAS DE OURO USANDO EPIGALOCATEQUINA-3-
GALATO (EGCG)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 19 de abril de 2018.

Prof. Dr. Marco Cesar C. Guimarães
Instituição: Universidade Federal
do Espírito Santo - UFES
Orientador

Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira
Instituição: Universidade Federal
do Espírito Santo - UFES
Membro Interno

Prof. Dr. Fábio Olivares
Instituição: Universidade Estadual
do Norte Fluminense - UENF
Membro Externo

VITÓRIA, ES
2018

DEDICATÓRIA

A minha amada família, em especial ao meu esposo Ricardo e aos meus filhos Bernardo e Alice, por me inspirarem a ser uma pessoa melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós” (autor desconhecido), e no fim desta jornada, não posso esquecer daqueles que deixaram um pouco de si e que percorreram este caminho comigo.

A Deus e a Nossa Senhora pela proteção e por me guiarem dia a dia.

Ao meu esposo Ricardo, por todo amor e companheirismo. Obrigada por acreditar mais em mim do que eu mesma. Seu encorajamento e incentivo foram fundamentais nessa caminhada. Você é meu equilíbrio nas minhas inconstâncias, minha alegria nas tristezas, minha paz nas tempestades, minha esperança nas perdas, minha motivação nos desânimos, minha certeza nas dúvidas.

Aos meus filhos Bernardo e Alice, razões do meu viver.

A toda a minha família e amigos, mesmo de longe, pelas palavras de conforto e de motivação, tornando tudo mais suave.

Ao meu orientador, Prof. Marco, pela amizade, confiança, compreensão, otimismo, paciência, e por todo apoio e incentivo demonstrados. Obrigada por sua “porta” estar SEMPRE aberta, não importando o motivo da minha visita.

Ao Prof. Jairo por todo o suporte técnico e científico, reflexões e ensinamentos que foram parte fundamental desse estudo.

A todos os colegas que fizeram ou fazem parte do laboratório LUCCAR, pelo acolhimento, pela amizade, por proporcionar um ambiente de trabalho baseado na cooperação e respeito: Wanderson, Luis, Danilo, Rafaela, Débora, Andressa, Gabriel, Rodolpho, Rayssa, Afrânio, Bruno, Tadeu, Fernanda, Gabriela, Natália, Mateus, Valmara, Arícia, Hélio e Flávio. Em especial, a Suely, pelos abraços matinais, pela disponibilidade e carinho.

Aos Professores Dr. Breno Valentim Nogueira e Dr. Fábio Olivares pela participação na banca.

Aos Laboratórios parceiros, LABPETRO (UFES), LABIOM (UFES), Laboratório de Imunopatologia (UFES), Laboratório de Físico-Química (UFES), Laboratório de Química (UFES-Aracruz) e Laboratório de triagem biológica de produtos naturais (UFES).

Aos meus amigos de turma, Isa e Vini, pela cumplicidade, pelas gargalhadas e por tornarem as aulas e trabalhos mais legais e divertidos.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos durante o mestrado.

A todos que direta ou indiretamente, ajudaram no desenvolvimento desse estudo e contribuíram no meu crescimento profissional e pessoal.

EPÍGRAFE

*“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos
é um oceano”. (Isaac Newton)*

RESUMO

DINIZ, G.P. **Síntese e caracterização físico-química de nanopartículas de ouro usando epigallocatequina-3-galato (EGCG)**. 2018. 101f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

As nanopartículas de ouro (AuNPs) tem se mostrado uma plataforma atraente para combinar uma variedade de propriedades biofísicoquímicas em um nanodispositivo unificado com grande potencial terapêutico. Neste estudo investigamos a capacidade do polifenol natural, epigallocatequina-3-galato (EGCG), de permitir a redução química de sais de ouro em nanopartículas de ouro e a estabilização em uma única etapa. As nanopartículas de ouro foram sintetizadas por oxirredução, com base em um Planejamento Fatorial Fracionado (triagem) e em seguida um Planejamento Composto Central (otimização) com o objetivo de determinar os pontos ótimos para a síntese. A caracterização do coloide sintetizado foi realizada com análises de UV-Vis, Infravermelho, Raman, Potencial Zeta, ICP-MS e Microscopia Eletrônica de Transmissão. Além disso, foi examinada a atividade citotóxica em modelo de macrófagos de camundongos. O pico de absorvância ocorreu em 533 nm e o diâmetro médio das nanopartículas foi de 14,54 nm. A nanoformulação apresentou boa estabilidade *in vitro* ao longo de mais de 6 meses e seu potencial zeta foi de -34,89 mV, sugerindo que o revestimento da EGCG previne a agregação. A análise de ICP-MS mostrou que a concentração de ouro reduzida com a síntese verde foi de 29,05 mg/L. Os dados obtidos pela espectroscopia do Infravermelho e Raman confirmaram a presença da EGCG nas nanopartículas de ouro. O coloide não apresentou efeito citotóxico para o modelo testado. A concentração inibitória referente a 50% de sobrevivência das células (IC50) para AuNPs-EGCG foi de 156,9 mg/L. Não foram utilizados produtos químicos, com exceção dos sais de ouro, neste processo verde de nanotecnologia biogênica, abrindo excelentes oportunidades para aplicações biomédicas.

Palavras-chave: Nanopartículas de ouro. EGCG. Epigallocatequina-3-galato. Síntese verde. Planejamento fatorial. Chá verde.

SYNTHESIS AND PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF GOLD NANOPARTICLES USING EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATE (EGCG)

ABSTRACT

DINIZ, G.P. **Synthesis and physical-chemical characterization of gold nanoparticles using epigallocatechin-3-gallate (EGCG)**. 2018. 101f. Dissertation - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Gold nanoparticles (AuNPs) are likely to provide an attractive platform for combining a variety of biophysicochemical properties into a unified nanodevice with great therapeutic potential. In this study we investigated the capacity of a natural polyphenol, epigallocatechin-3-gallate (EGCG) to allow chemical reduction of gold salts to AuNPs and stabilization in a single-step green process. The gold nanoparticles were synthesized by oxy-reduction, based on a Fractional Factorial Design (screening) and then a Central Composite Design (optimization) in order to determine the optimal points for the synthesis. The characterization of AuNPs was performed with UV-Vis, Infrared, Raman, Zeta Potential, ICP-MS and Transmission Electron Microscopy analyzes. In addition, the cytotoxic activity in the mouse macrophages model was examined. The absorbance peak occurred at 533 nm and the mean nanoparticle diameter was 14,54 nm. Nanoformulation showed good *in vitro* stability over more than 6 months and its zeta potential was -34,89 mV, suggesting that EGCG coating prevents aggregation. ICP-MS analysis showed that the reduced gold concentration with the green synthesis was 29,05 mg/L. The data obtained by Infrared and Raman spectroscopy confirmed the presence of EGCG in gold nanoparticles. The colloid did not present a cytotoxic effect for the model tested. The inhibitory concentration at the 50% cell survival (IC 50) effect for AuNPs-EGCG was 156,9 mg/L. No chemicals, other than gold salts, were used in this green biogenic nanotechnology process, opening up excellent opportunities for biomedical applications.

Keywords: Gold nanoparticles. EGCG. Epigallocatechin-3-gallate. Green Synthesis. Factorial design. Green Tea.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema detalhado mostrando a relação da escala de tamanho de alguns nanomateriais em comparação com outros materiais (parte superior). Adaptado de NATARIO, 2011..... 14
- Figura 2.** Mapa representativo dos campos científicos envolvidos na pesquisa nano. Os tamanhos das esferas são proporcionais à porcentagem de publicações desse campo científico particular. Fonte: Adaptado de KLAINÉ et al., 2012..... 15
- Figura 3.** Tabela Periódica das nanopartículas plasmônicas. Tabela de classificação de nanopartículas com base em parâmetros geométricos. Cada linha representa um nível diferente de dimensionalidade e complexidade, tais como esféricas (1,2), semelhante a haste (3 a 9), poligonais (10 a 16), poliédricas (17 a 23), ramificadas (24 a 29), estruturas mais complexas (30 a 36) e estruturas ocas (37 a 43). Fonte: Adaptado de (TAN et al., 2011)..... 17
- Figura 4.** Vitrais medievais multicoloridos. Nanopartículas metálicas são responsáveis pelos efeitos coloridos. Fonte: Adaptado de CHANG, 2005..... 18
- Figura 5.** Tamanho da partícula x Área superficial. Esta ilustração e tabela descrevem as mudanças nas características físicas das partículas de ouro em uma massa constante de 1 micrograma. (A) 1 partícula, (B) 10 partículas, (C) 100 partículas e (D) 1.000 partículas. Fonte: Adaptado de KLAINÉ et al., 2012..... 19
- Figura 6.** Ilustração de uma nanopartículas esférica de ouro típica, demonstrando a elevada relação superfície-volume. Em destaque, o núcleo sólido (amarelo); a grande área de superfície (azul) e a representação de ligantes de superfície (preto e verde). Fonte: DOANE; BURDA, 2012..... 20
- Figura 7.** Ilustração das oscilações de plasmons de superfície em nanopartículas de ouro esféricas. O campo elétrico de uma onda de luz induz uma polarização dos elétrons de superfície em relação ao núcleo de uma nanopartícula esférica (muito mais pesado). As cargas positivas das nanopartículas são assumidas como imobilizadas e as cargas negativas, isto é, os elétrons de condução, movem-se sob a influência de campos externos. Fonte: Adaptado de YASUN et al., 2013..... 21
- Figura 8.** Escala de cores das nanopartículas de ouro em função do tamanho. Fonte: Adaptado de FIGUEIRA; SANTOS, 2017..... 22
- Figura 9.** O crescimento exponencial no número de publicações sobre nanotecnologia de ouro e nanomedicina no período entre 1990 e 2010. (A) Publicações anuais em nanomedicina e nanomedicina com ouro e (B) Contribuições de vários países para publicações sobre nanomedicina com ouro em 2000 e 2010. (*) Outros países que representam 2,2% das publicações. Fonte: Adpatado de DREADEN et al., 2012..... 24
- Figura 10.** Representação esquemática da formação de nanoestruturas de ouro pelas técnicas "top down" e "bottom-up". Fonte: Adaptado de ROSA; FERNANDEZ; ZEGARRA, 2012..... 25

Figura 11. Ilustração esquemática do processo de formação de nanopartículas de ouro. Fonte: Adaptado de THANH; MACLEAN; MAHIDDINE, 2014.....	28
Figura 12. Imagens de <i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze, Theaceae: (A) arbusto com aproximadamente 1,5m de altura; (B) detalhe das folhas e flor. Fonte: Retirado de < http://chasbrasil.com/camellia-sinensis-planta-de-origem-chinesa-e-a-base-de-varios-chas/ > e < http://www.photomazza.com/?Camellia-sinensis&lang=en > - Autor: Giuseppe Mazza.....	30
Figura 13. Principais catequinas do chá verde. A maioria das propriedades medicinais do chá verde estão associadas a essas quatro catequinas polifenólicas: epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG) e epigalocatequina-3-galato (EGCG). As propriedades antioxidantes destas catequinas são atribuídas à presença dos grupos fenólicos hidroxilo no anel B em EC e EGC, e nos anéis B e D de ECG e EGCG. Fonte: Adaptado de ROYCHOUDHURY et al., 2017.....	32
Figura 14. Modelo proposto para ações celulares da EGCG. A EGCG pode iniciar a sinalização intracelular ligando e ativando receptores de membrana celular sem entrar nas células (linha sólida). Várias quinases podem fosforilar proteínas no citoplasma. Se a proteína alvo é um fator de transcrição, pode translocar para o núcleo e modificar a transcrição do gene. Alternativamente, a EGCG pode se translocar dentro das células onde pode ligar e interagir com seus alvos moleculares no citoplasma, mitocôndria ou núcleo (linhas tracejadas). Dependendo do tipo de célula e quantidades de EGCG usados, processos celulares podem ser ativados ou suprimidos. Akt (Akt quinase); ERK1/2 (quinase regulada por sinal extracelular); P (locais de fosforilação); PI3K (fosfatidilinositol-3-OH-quinase); PKA (proteína quinase dependente de AMP cíclica); Src (Src quinase). Fonte: LORENZ, 2013.....	34
Figura 15. Modelo geral de um processo ou sistema. O sistema atua como uma função - desconhecida, em princípio, senão não precisaríamos de experimentos – que opera sobre as variáveis de entrada (os fatores) e produz como saída uma ou mais respostas observadas. Algumas das variáveis do processo são controláveis, sendo outras não-controláveis. O objetivo do planejamento de experimentos inclui a determinação de quais variáveis x mais influenciam a resposta y. Fonte: Adaptado de MONTGOMERY, 2005.....	38
Figura 16. Imagens mostrando a sequência de preparo das grades. Primeiro passo é demonstrado em A, onde a suspensão coloidal de AuNPs foi gotejada no centro de uma lamina de vidro histológica; após um tempo de repouso, verifica-se a formação do anel de café nas bordas da gota (B-C); uma grade previamente coberta com polímero hidrofóbico formvar é colocada sobre a gota (D); a grade é arrastada cuidadosamente sobre todo o anel formado para recuperar o máximo possível de AuNPs (E); a grade preparada (F). Fonte: OLIVEIRA, 2016.....	48
Figura 17. Mudança na coloração da solução coloidal de nanopartículas de ouro sintetizadas com a EGCG na concentração de 0,1 mg/mL. (A) tempo: 0 min; (B) tempo: 1 min; (C) tempo: 3 min; (D) tempo: 5 min; (E) tempo: 10 min.....	51
Figura 18. Espectroscopia de absorção no UV-Vis das 16 sínteses de nanopartículas de ouro a partir do planejamento fatorial fracionado utilizando a EGCG como agente redutor.....	52

Figura 19. Gráfico Normal de Efeitos Padronizados das 16 sínteses de nanopartículas de ouro a partir do planejamento fatorial fracionado utilizando a EGCG como agente redutor. A variável resposta utilizada foi o comprimento de onda máximo.....	55
Figura 20. Gráfico de Pareto identificando as variáveis que foram significativas nos experimentos que utilizaram o comprimento de onda máximo como resposta ($p < 0,1$).....	56
Figura 21. Gráfico de Probabilidade Normal das 16 sínteses de nanopartículas de ouro a partir do planejamento fatorial fracionado utilizando a EGCG como agente redutor. A variável resposta utilizada foi absorvância máxima.....	59
Figura 22. Gráfico de Pareto identificando as variáveis que foram significativas nos experimentos que utilizaram a absorvância máxima como resposta ($p < 0,1$).....	60
Figura 23. Espectroscopia de absorção no UV-Vis com a comparação dos diferentes pH (A – pH 3; B – pH 6,5; C – pH 10).....	62
Figura 24. Espectroscopia de absorção no UV/Vis. Comparação das diferentes concentrações de EGCG (A – 0,05 mg/mL; B – 0,1 mg/mL; C – 1,0 mg/mL).....	63
Figura 25. Gráfico de Superfície de Resposta apresentando a interação das variáveis pH e concentração da EGCG na absorvância máxima.....	64
Figura 26. Gráfico de Contorno apresentando a influência das variáveis pH e concentração de EGCG na absorvância máxima.....	65
Figura 27. Espectroscopia de absorção no UV-Vis das melhores três sínteses de nanopartículas de ouro com EGCG da otimização (preto, vermelho e azul) e da síntese nas condições ótimas (rosa).....	66
Figura 28. Espectro de Infravermelho da EGCG (preto) e das nanopartículas de ouro com EGCG (vermelho).....	68
Figura 29. Espectro Raman de nanopartículas de ouro sintetizadas com EGCG.....	69
Figura 30. Histograma de distribuição de tamanho.....	72
Figura 31. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de ouro sintetizadas com EGCG.....	73
Figura 32. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de ouro sintetizadas com EGCG.....	74
Figura 33. Espectroscopia de absorção no UV-Vis das AuNPs-EGCG, sintetizadas na condição ótima, em função do tempo de estocagem.....	75
Figura 34. Avaliação do efeito citotóxico das AuNPs-EGCG em macrófagos de camundongos da linhagem celular J774A.1. As células foram utilizadas a uma concentração de 5×10^4 células/mL e incubadas durante 48 horas a diferentes concentrações de NPs.....	77

Figura 35. Espectros de absorção UV-Vis de nanopartículas metálicas submetidas a diferentes condições de centrifugação: 1.000 rpm (A); 2.000 rpm (B); 5.000 rpm (C); 10.000 rpm (D) e 14.000 rpm (E). Linhas pontilhadas são referentes a fração superior (sobrenadante) após a centrifugação e linhas contínuas são referentes a fração inferior (pellet) ressuspensa em água ultrapura. Cores: preto (5 minutos), azul (10 minutos) e vermelho (20 minutos).....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores assumidos pelos níveis do planejamento fatorial fracionado.....	43
Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial fracionado das 16 sínteses de nanopartículas de ouro com EGCG.....	44
Tabela 3. Intervalos de estudo das variáveis do planejamento fatorial composto central.....	45
Tabela 4. Resultados do planejamento fatorial fracionado das 16 sínteses de nanopartículas de ouro com EGCG. A variável resposta utilizada foi o λ máximo.....	51
Tabela 5. ANOVA para síntese de nanopartículas de ouro com EGCG utilizando planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} e comprimento de onda máximo como resposta. Em vermelho, as variáveis consideradas estatisticamente significativas. SS – Soma dos quadrados; df – Graus de Liberdade; MS – Quadrados das Médias; F – teste F; p – valor de p.....	54
Tabela 6. Resultados do planejamento fatorial fracionado das 16 sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com a EGCG. A variável resposta utilizada foi a absorbância máxima.....	57
Tabela 7. ANOVA para síntese de nanopartículas de ouro com EGCG utilizando planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} e absorbância máxima como resposta. Em vermelho as variáveis consideradas estatisticamente significativas. SS – Soma dos quadrados; df – Graus de Liberdade; MS – Quadrados das Médias; F – teste F; p – valor de p.....	58
Tabela 8. Intervalos de estudo das variáveis do planejamento fatorial composto central.....	61
Tabela 9. Resultados do planejamento fatorial completo das sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com a EGCG. A variável resposta utilizada foi o λ máximo.....	61
Tabela 10. Condições ótimas e valor previsto da variável resposta fornecidas pelo programa Statistica Software versão 14.12.0 para o melhor rendimento de síntese de AuNPs-EGCG....	66
Tabela 11. Resultados obtidos para a carga de superfície obtida pelo potencial Zeta; para o diâmetro médio e razão de aspecto (Ra) das nanopartículas com EGCG; e para a concentração de Au ⁰ obtida por ICP-MS.....	71
Tabela 12. Valores obtidos pelo espectro de absorção UV-Vis para determinação do tempo e rotação ideal de centrifugação sem perda de material.....	90
Tabela 13. Valores correspondentes ao diâmetro (nm) de 500 nanopartículas de ouro com EGCG obtidos pelo Software Image J.....	92

Tabela 14. Valores correspondentes a razão de aspecto (Ra) de 500 nanopartículas de ouro com EGCG obtidos pelo Software Image J.....	93
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Akt quinase
ALA	Ácido α -lipóico
ANOVA	Análise de Variância
Au	ouro
AuCl_4^-	Ácido cloroáurico
Au^{3+}	ouro com número de oxidação +3
AuNP	Nanopartícula de Ouro
AuNPs	Nanopartículas de Ouro
AuNPs-EGCG	Nanopartículas de ouro com Epigallocatequina galato
CO_2	Dióxido de carbono
COO^-	Ácido carboxílico
DM	Diâmetro maior
Dm	Diâmetro menor
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOE	Planejamento de Experimentos (do inglês Design of Experiments)
EC	Epicatequina
ECG	Epicatequina Galato
EGC	Epigallocatequina
EGCG	Epigallocatequina-3-galato
EROs Species)	Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês Reactive Oxygen Species)

ERK1/2	Quinase regulada por sinal extracelular
FDA	Agência Federal de Administração de Comidas e Remédios dos Estados Unidos (do inglês U.S. Food & Drug Administration)
FT-IR	Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier (do inglês Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
g	gramas
HAuCl ₄	Ácido tetracloroáurico
HCl	Ácido clorídrico
HNO	Ácido nítrico
H ₀	Hipótese nula
ICP-MS	Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (do inglês Inductively coupled plasma mass spectrometry)
IC ₅₀	Média de inibição de uma substância
L	Litro
LabPetro	Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Metodologias para Análises de Petróleo
LUCCAR	Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mV	Milivolts
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia dos EUA (do inglês National Institute of Standards and Technology)
nm	Nanômetros

NNIN	Rede Nacional de Infra-estrutura de Nanotecnologia (do inglês National Nanotechnology Infrastructure Network)
NPs	Nanopartículas
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol-3-OH-quinase
PKA	Proteína quinase dependente de AMP cíclica
Ra	Razão de aspecto
rpm	Rotações por minuto
RPSL	Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada
Src	Src quinase
STM	Microscópio de varredura de tunelamento eletrônico (do inglês Scanning Tunneling Microscope)
UV-vis	Ultravioleta/visível
μL	Microlitro
λ máx	Comprimento de onda máximo
°C	Graus Celsius
%	Percentual

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Nanobiotecnologia	13
1.2	Nanopartículas de ouro.....	16
1.3	Síntese de Nanopartículas de ouro.....	24
1.4	Aplicações biomédicas das Nanopartículas de ouro.....	28
1.5	Epigallocatequina-3-galato	29
1.6	O estado da arte para Nanopartículas de Ouro com Epigallocatequina-3-galato.....	34
1.7	Planejamento Experimental	37
2	OBJETIVOS	41
2.1	Objetivo geral.....	41
2.2	Objetivos específicos	41
3	METODOLOGIA.....	42
3.1	Materiais	42
3.2	Síntese das Nanopartículas de Ouro	42
3.3	Planejamento Experimental	42
3.3.1	Planejamento Fatorial Fracionado	43
3.3.2	Planejamento Fatorial Composto Central	45
3.4	Caracterização estrutural e físico-química das nanopartículas de ouro.....	45
3.4.1	Espectroscopia de absorção no UV-vis	45
3.4.2	Espectroscopia no Infravermelho.....	46
3.4.3	Espectroscopia Raman.....	46
3.4.4	Potencial Zeta	46
3.4.5	Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma (ICP-MS).....	47
3.4.6	Microscopia eletrônica de transmissão	47
3.5	Avaliação da citotoxicidade celular	48

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1 Planejamento Fatorial Fracionado	50
4.2 Planejamento Fatorial Composto Central	60
4.3 Caracterização estrutural e físico-química das nanopartículas de ouro.....	66
4.3.1 Ressonância plasmônica de superfície localizada	66
4.3.2 Detecção de grupamentos químicos.....	67
4.3.3 Análise de estabilidade.....	70
4.3.4 Determinação de rendimento da síntese.....	70
4.3.5 Determinação da forma, tamanho e dispersão.....	71
4.4 Avaliação da citotoxicidade celular	75
5 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	80
ANEXO I.....	90
ANEXO II.....	92
ANEXO III.....	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nanobiotecnologia

O prefixo nano, derivado do grego, significa anão ou de tamanho reduzido, e colocado junto a uma unidade de medida, a divide por 10^9 . Dessa forma, um nanômetro significa a bilionésima parte de um metro, ou seja, 10^{-9} metros. Ou, um metro é igual a um bilhão de nanômetros. Apesar de não haver consenso científico, a escala nanométrica ou nanoescala é normalmente aplicada a estruturas com dimensões entre 1 e 100 nanômetros (nm) (GHOSH; PAL, 2007; DE JONG et al., 2008; DREADEN et al., 2012; ETHERIDGE et al., 2013).

Podemos dizer que a nanotecnologia é o ramo da ciência que estuda o desenvolvimento de tecnologias e a pesquisa da matéria em escala nanométrica. A nanotecnologia tem aplicações nas mais diversas áreas da sociedade, como informática, medicina, engenharia, entre outras (GATOO ET AL., 2014; NICOL; DIXON; COULTER, 2015). A integração da nanotecnologia e da biologia gerou uma nova área interdisciplinar - nanobiotecnologia. Nos últimos anos, o rápido desenvolvimento da nanotecnologia e dos nanomateriais aceleraram muito o avanço da nanobiotecnologia (NIE et al., 2014). Muitos estudos baseados em vários nanomateriais, tais como nanotubos de carbono, nanofios de sílica, pontos quânticos, nanopartículas magnéticas e nanopartículas de ouro (AuNPs) têm como objetivo criar uma nova era nas áreas de biomarcadores, biossensores, diagnósticos precoces e tratamento de doenças (ZHOU et al., 2015).

Sabe-se que a distância típica entre dois átomos de carbono em uma molécula é de 0,12 a 0,15 nm, o diâmetro de uma dupla hélice de DNA é de cerca de 2 nm, uma proteína tem, aproximadamente, 50 nm e o vírus da gripe possui cerca de 100 nm. A semelhança em tamanho entre essas biomoléculas naturais e os nanomateriais produzidos se traduz em um aumento potencial de materiais fabricados para interagir com processos biológicos (ETHERIDGE et al., 2013). A Figura 1 apresenta um esquema mostrando a comparação do tamanho de algumas biomoléculas em relação a alguns nanomateriais.

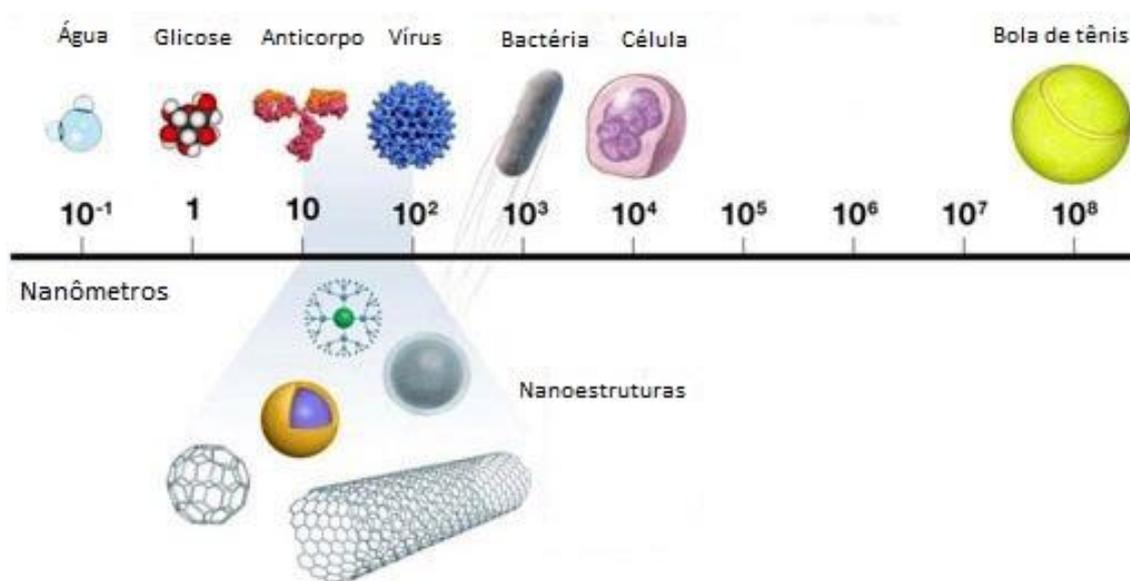


Figura 1. Esquema detalhado mostrando a relação da escala de tamanho de alguns nanomateriais em comparação com outros materiais (parte superior). Adaptado de NATARIO, 2011.

A edição de agosto de 2015 de um relatório norte-americano frequentemente atualizado sobre nanobiotecnologia menciona 40 produtos em comercialização, cerca de 300 produtos em desenvolvimento (entre eles, produtos farmacêuticos, para diagnóstico e dispositivos médicos), 250 empresas envolvidas nesta área e valor atual de mercado de US\$ 12 bilhões. O site do governo dos EUA para ensaios clínicos listava mais de 200 ensaios clínicos envolvendo nanopartículas em 2015 (JAIN, 2015; JAIN, 2017).

A partir do mapa representado pela Figura 2 observamos que de todas as áreas abrangidas pela nanotecnologia, a maior concentração de publicações está na área de ciências biomédicas.

Essa realidade atual foi profetizada há 58 anos atrás, pelo físico Richard Feynman em sua palestra intitulada "*There's plenty of room at the bottom*" ("Há mais espaço lá embaixo") na reunião anual da Sociedade Americana de Física. Feynman discutiu a ideia que ainda havia muito espaço para ser explorado no interior dos átomos, apontando claramente para um novo caminho no desenvolvimento da ciência e tecnologia da época (FEYNMAN, 1960; FREITAS, 2005). O pai da nanotecnologia, como é conhecido hoje devido a sua ampla visão futurística, afirmou que "Os princípios da física não falam contra a

possibilidade de se manipular as coisas átomo por átomo”. Apontou, também, para o que seria, a seu ver, a principal barreira para a manipulação na escala nanométrica: a impossibilidade de vê-la (CADIOLI; SALLA, 2006). Em 10 de agosto de 1982, 23 anos após a palestra de Feynman, a IBM conseguiu a patente do denominado microscópio de varredura de tunelamento eletrônico (Scanning Tunneling Microscope – STM), que permite a visualização de imagens em tamanho nano (MARTINS, 2016).

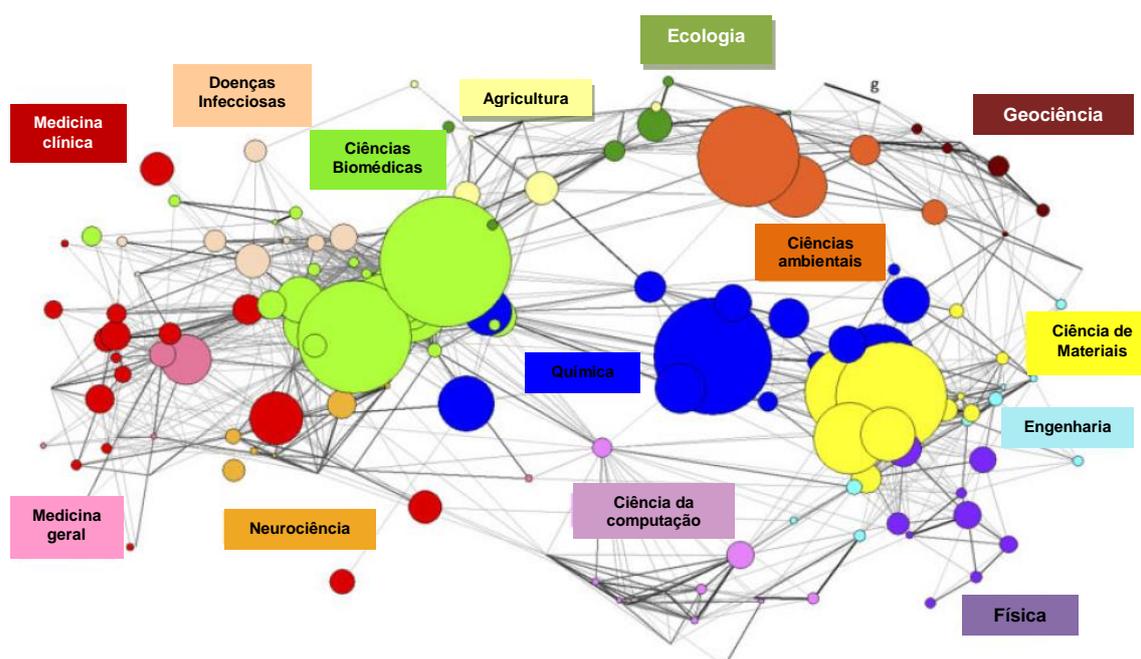


Figura 2. Mapa representativo dos campos científicos envolvidos na pesquisa nano. Os tamanhos das esferas são proporcionais à porcentagem de publicações desse campo científico particular. Fonte: Adaptado de KLAINE et al., 2012.

As nanoestruturas, apesar de possuírem o mesmo elemento químico da macroestrutura, apresentam características distintas. O grande interesse no estudo destes nanomateriais se deve ao fato de apresentarem propriedades físico-químicas e biológicas distintas dos materiais base já conhecidos, o que permite inúmeras novas possibilidades de aplicações (ZHANG, 2015). Dentre os nanomateriais mais estudados atualmente estão as nanopartículas de ouro, que devido a suas propriedades únicas, são excelentes candidatos para aplicações biomédicas (JINHAO; HONGWEI; BING, 2009; MODY et al., 2010).

1.2 Nanopartículas de ouro

O ouro coloidal, também conhecido como nanopartículas de ouro, é uma suspensão (ou coloide) de partículas de ouro que variam entre 1 e 100 nanômetros, sejam elas dispersas em gases, líquidos, ou meio sólido (SCHRÖFEL et al., 2014). As AuNPs são uma série de átomos ligados entre si (essas partículas geralmente contêm entre 3 e 106 átomos) e são de tamanho intermediário entre átomos individuais e agregados suficientemente grandes para serem chamados de material a granel (GHOSH; PAL, 2007; SCHRÖFEL et al., 2014). As propriedades resultantes não são nem do metal a granel nem do átomo, e dependem fortemente do tamanho da partícula, da distância interpartícula, da natureza dos componentes da superfície e da forma das nanopartículas (DANIEL; ASTRUC, 2004).

As nanopartículas metálicas são as mais estáveis e altamente versáteis (ZHANG, 2015). Especialmente as AuNPs possuem numerosas vantagens, como baixa citotoxicidade, fácil modificação de suas superfícies, processo de síntese controlado e simples, excelente desempenho óptico, atividade catalítica e excelente biocompatibilidade (GHOSH; PAL, 2007; NIE et al., 2014; ZHANG, 2015; KIM et al., 2016). Podem ser sintetizadas em diferentes tamanhos, formas e estruturas, dependendo da aplicação desejada (Figura 3).

Embora a nanotecnologia de partículas de ouro seja uma ciência bastante nova, já se tem empregado esse nanomaterial há mais de mil anos. Um dos exemplos mais documentados de nanotecnologia conhecidos na história é dos artesãos medievais, que inconscientemente se tornaram nanotecnólogos quando fabricaram vitrais coloridos misturando cloreto de ouro em vidro derretido. Isso criou minúsculas esferas de ouro (de aproximadamente 25 nm de diâmetro) que absorveu e refletiu a luz solar produzindo uma cor vermelha rubi intensa nas janelas (Figura 4). Outras cores poderiam ser obtidas mudando-se o material usado e/ou o tamanho da partícula. Nanopartículas de ouro de 50 nm, por exemplo, dão o tom verde. Se dobrarmos seu tamanho (ou seja, se atingirmos 100 nm), a cor espalhada passa a ser a laranja. Já nanopartículas de prata de 100 nm espalham luz amarela. O azul poderia ser obtido com nanopartículas de prata de 40 nm. É claro que não se sabia na época que é o tamanho das

nanopartículas (NPs) de metal que definem as variações de cor, mas cabe observar como a nanotecnologia é antiga. Este exemplo de mudança de cor é um testemunho da mudança dramática nas propriedades do material em nanoescala (CHANG, 2005; GHOSH; PAL, 2007).

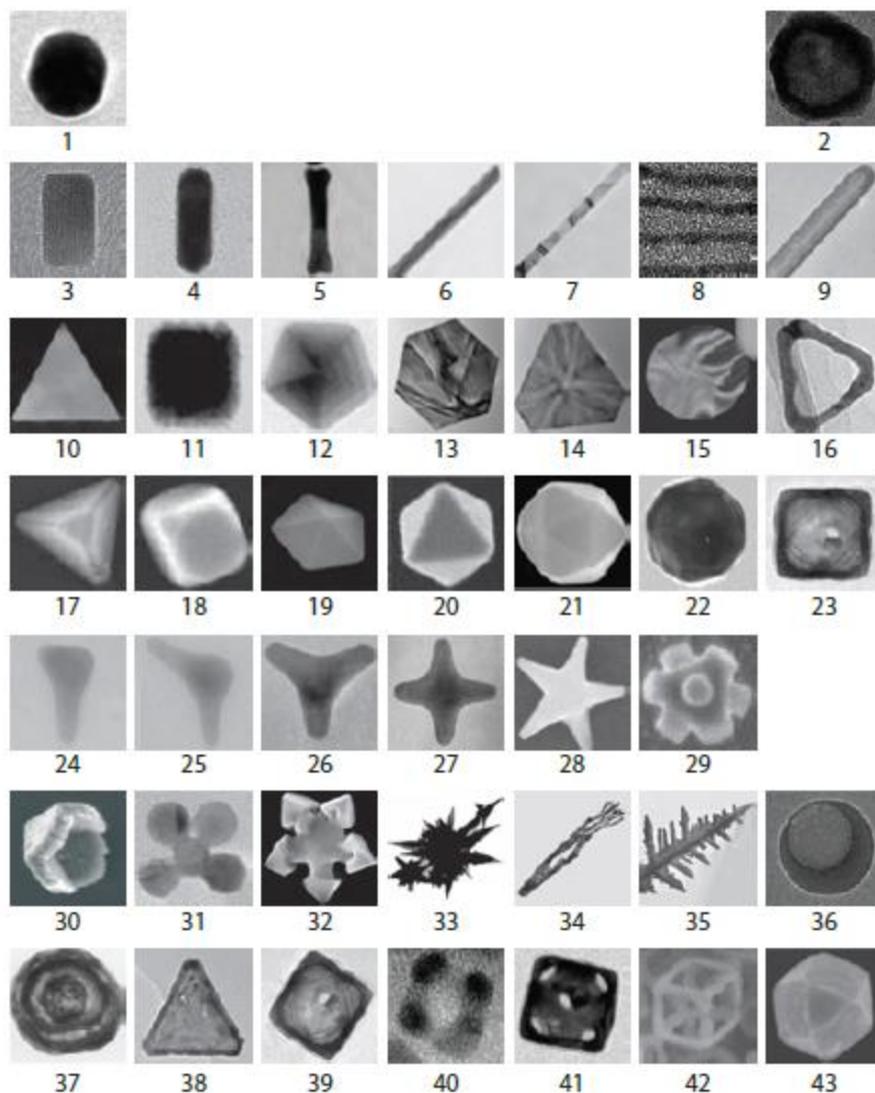


Figura 3. Tabela Periódica das nanopartículas plasmônicas. Tabela de classificação de nanopartículas com base em parâmetros geométricos. Cada linha representa um nível diferente de dimensionalidade e complexidade, tais como esféricas (1, 2), semelhante a haste (3 a 9), poligonais (10 a 16), poliédricas (17 a 23), ramificadas (24 a 29), estruturas mais complexas (30 a 36) e estruturas ocas (37 a 43). Fonte: Adaptado de (TAN et al., 2011).



Figura 4. Vitrais medievais multicoloridos. Nanopartículas metálicas são responsáveis pelos efeitos coloridos. Fonte: Adaptado de CHANG, 2005.

Ao longo da história a reputação do ouro solúvel foi revelar fabulosos poderes curativos para várias doenças, como problemas cardíacos, artrite-reumatóide, tuberculose, problemas venéreos, disenteria, epilepsia, tumores e para o diagnóstico de sífilis. Por exemplo, em 1583, o alquimista David de Planis-Campy, cirurgião do rei da França - Louis XIII, o recomendou seu "elixir de longevidade" – uma solução aquosa de ouro coloidal - como prolongador da vida. O primeiro livro sobre o ouro coloidal foi publicado pelo filósofo e médico Francisco Antonii em 1618. Contém informações sobre a preparação de ouro coloidal e suas aplicações médicas, incluindo sugestões práticas. Em 1880, foi proposto um método para tratar o alcoolismo com injeção intravenosa de uma solução de ouro coloidal. Em 1927, o uso de ouro coloidal foi proposto para aliviar o sofrimento de pacientes com câncer inoperáveis (DANIEL; ASTRUC, 2004). As nanopartículas sempre existiram. A novidade está no entendimento a respeito das suas propriedades e como manipulá-las.

O grande interesse na pesquisa de nanopartículas de ouro se deve as suas propriedades únicas. Uma característica física importante é sua elevada relação superfície-volume. A Figura 5 mostra que há uma mudança de três ordens de

magnitude no diâmetro da partícula para este modelo conceitual alcançar um nanomaterial (de 46.265 nm para 46 nm). No entanto, o número total de partículas que representam esta diminuição no diâmetro das partículas aumenta nove ordens de grandeza (de 1 para 1.000.000.000 de partículas). Como resultado, o total da área superficial da massa representada de partículas aumenta três ordens de grandeza (de $6,72 \times 10^9$ para $6,72 \times 10^{12}$). A medida que diminuimos o tamanho dos materiais há um aumento exponencial da área superficial em relação ao volume (Figura 6) (KLAINÉ et al., 2012; SCHRÖFEL et al., 2014). Essa propriedade é de grande importância para otimizar o acoplamento de medicamentos ou outras substâncias (DOANE; BURDA, 2012).

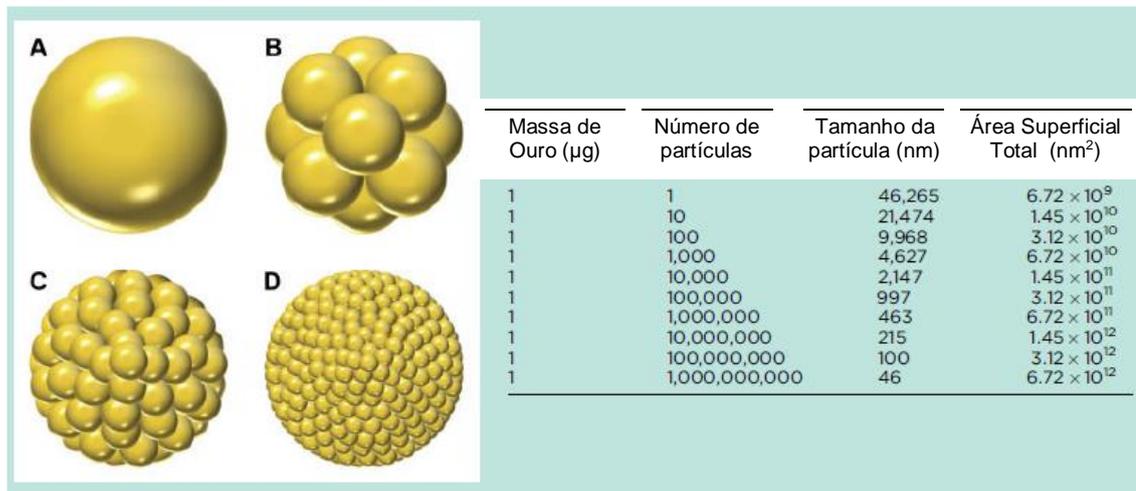


Figura 5. Tamanho da partícula x área superficial. Esta ilustração e tabela descrevem as mudanças nas características físicas das partículas de ouro em uma massa constante de 1 micrograma. (A) 1 partícula, (B) 10 partículas, (C) 100 partículas e (D) 1.000 partículas. Fonte: Adaptado de KLAINÉ et al., 2012.

As propriedades ópticas das nanopartículas de ouro decorrem da sua interação única com a luz e são atribuídas a um fenômeno associado à interação de uma onda eletromagnética e a banda de elétrons de condução do metal. Quando as AuNPs são irradiadas com luz, os elétrons na nanoestrutura são conduzidos pelo campo elétrico para oscilar coletivamente em uma frequência de ressonância, liberando fótons em um processo conhecido como espalhamento. Uma fração desses fótons será convertida em fonões ou vibrações da rede e este processo é conhecido como absorção. A interação entre esses processos, espalhamento e absorção, é conhecido como o espectro de Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (RPSL) (Figura 7). Seus

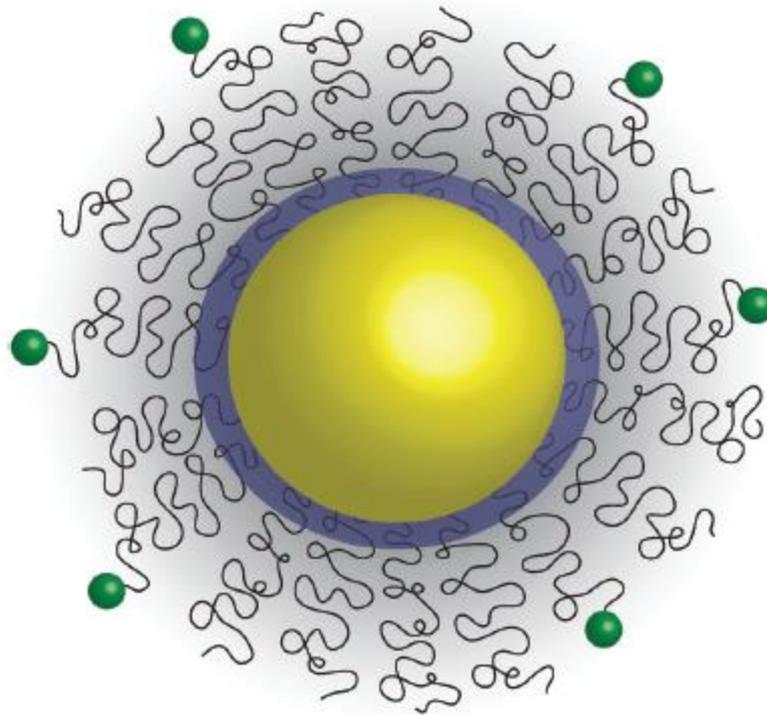


Figura 6. Ilustração de uma nanopartículas esférica de ouro típica, demonstrando a elevada relação superfície-volume. Em destaque, o núcleo sólido (amarelo); a grande área de superfície (azul) e a representação de ligantes de superfície (preto e verde). Fonte: DOANE; BURDA, 2012.

picos podem ser observados da região visível para o infravermelho próximo. Além disso, com um aumento no tamanho e variações de forma das AuNPs, a quantidade de dispersão de luz aumenta levando a uma dispersão única. A frequência desta RPSL é fortemente dependente do tamanho, da forma, das interações inter-partículas e do meio local da nanopartícula. Essa frequência de oscilação é determinada por três fatores: a densidade de elétrons, a massa efetiva de elétrons e o tamanho da distribuição de carga (GHOSH; PAL, 2007; FADEEL; GARCIA-BENNETT, 2010; MODY et al., 2010; DOANE; BURDA, 2012).

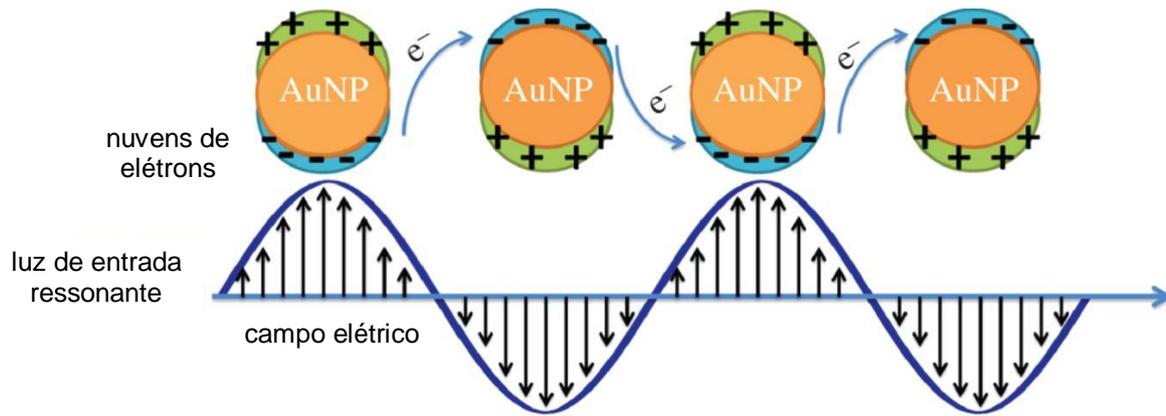


Figura 7. Ilustração das oscilações de plasmons de superfície em nanopartículas de ouro esféricas. O campo elétrico de uma onda de luz induz uma polarização dos elétrons de superfície em relação ao núcleo de uma nanopartícula esférica (muito mais pesado). As cargas positivas das nanopartículas são assumidas como imobilizadas e as cargas negativas, isto é, os elétrons de condução, movem-se sob a influência de campos externos. Fonte: Adaptado de YASUN et al., 2013.

Desse modo também, a cor das nanopartículas depende da densidade de estados eletrônicos e do tamanho das nanopartículas (Figura 8). Com dimensões entre 2 e 10 nm, as nanopartículas de ouro apresentam intensa coloração vermelha, devido a transições entre bandas de plasmons superficiais. Entretanto, a medida que aumentam de tamanho, as nanopartículas passam a exibir uma coloração do rosa ao violeta, devido ao aumento na densidade dos estados eletrônicos e consequente diminuição da energia de transição entre as bandas. (TOMA; ANAISSI, 2005; FIGUEIRA; SANTOS, 2017).

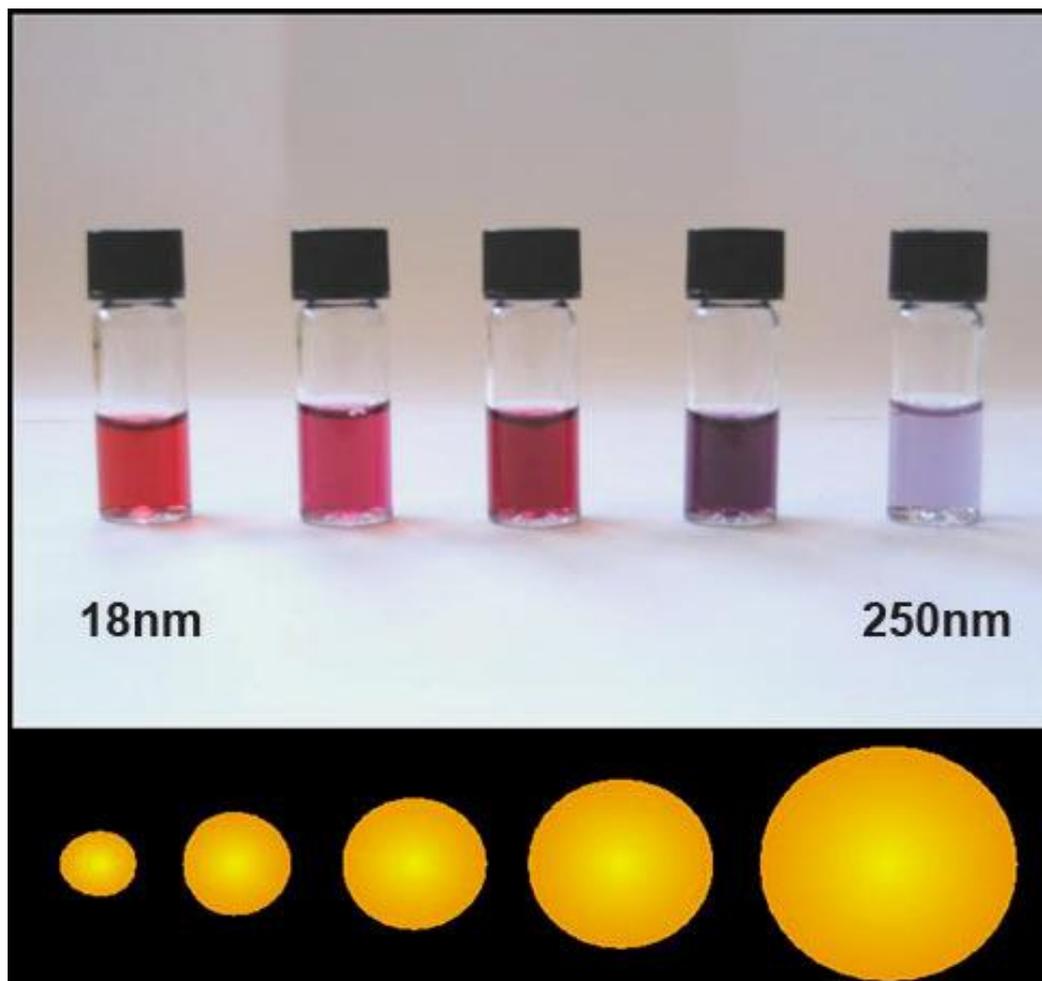


Figura 8. Escala de cores das nanopartículas de ouro em função do tamanho. Fonte: Adaptado de FIGUEIRA; SANTOS, 2017.

A biocompatibilidade da AuNP é uma propriedade que a levou a ser recomendada pelo Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) dos EUA como "padrão-ouro" (literalmente) para laboratórios que estudam as respostas biológicas para nanopartículas (FADEEL; GARCIA-BENNETT, 2010). Enquanto a toxicidade dos macromateriais é afetada, principalmente, por sua composição, para os nanomateriais, fatores adicionais como suas propriedades físico-químicas, tamanho, área superficial, química da superfície, rugosidade da superfície, meio de dispersão e a capacidade de aglomerar desempenham um papel determinante na sua toxicidade (GATOO et al., 2014). Muitos estudos já relataram que as células humanas podem absorver nanopartículas de ouro sem efeitos citotóxicos (DE JONG et al., 2008; LASAGNA-REEVES et al., 2010; KHLEBTSOV; DYKMAN, 2011; LOVE; THOMPSON; HAYNES, 2012).

As publicações anuais na área de nanomedicina aumentaram drasticamente após o Prêmio Nobel de Química de 1996 para Kroto, Curl e Smalley pela descoberta do fulereno (Figura 9A). Muitas outras aplicações biomédicas foram adicionadas a esse crescimento após o presidente dos EUA, Bill Clinton, criar o National Nanotechnology Infrastructure Network (NNIN) em 2000 e, posteriormente, em 2003, o então presidente dos EUA, George H. W. Bush expandir o programa com a Lei de Pesquisa e Desenvolvimento de Nanotecnologia do século XXI. A participação do número de países nesta área de pesquisa também aumentou significativamente entre as décadas de 2000 e 2010. Em 2000 as publicações eram limitadas a apenas 5 países - EUA, Coreia do Sul, China, Áustria e México - já em 2010 incluíam mais de 50 países (Figura 9B) (DREADEN et al., 2012).

(Figura 10). As técnicas “top-down” têm a vantagem de permitir a produção de nanomateriais com tamanhos e dispersão de tamanhos bem definidos. Contudo, são necessárias grandes quantidades de material, apresentando baixos rendimentos e elevados consumos energéticos. Por outro lado, as técnicas de “bottom-up” são mais simples de implementar, apresentam rendimentos mais elevados e custos menores. Contudo, devido à necessidade de parar o crescimento de todos os nanomateriais ao mesmo tempo, podem apresentar uma grande dispersão de tamanhos. A escolha da técnica de redução, tempo e material de cobertura determina o tamanho e a forma das nanopartículas geradas (EUSTIS; EL-SAYED, 2006; GHOSH; PAL, 2007; THAKKAR; MHATRE; PARIKH, 2010; MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013).

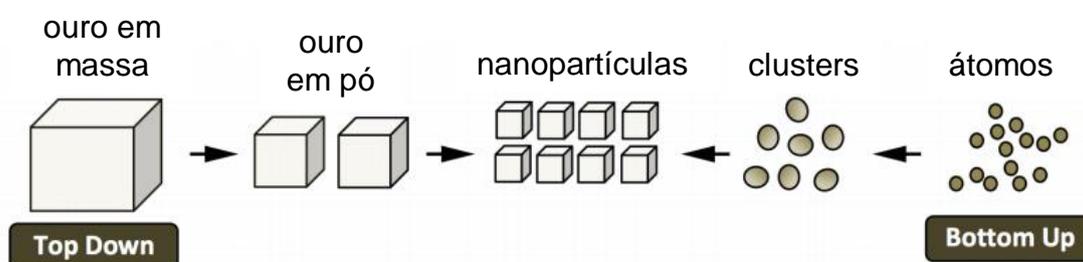


Figura 10. Representação esquemática da formação de nanoestruturas de ouro pelas técnicas "top down" e "bottom-up". Fonte: Adaptado de ROSA; FERNANDEZ; ZEGARRA, 2012.

As AuNPs podem ser sintetizadas por diversos métodos: síntese química (por exemplo, redução por citrato, método de Brust-Schiffrin, utilização de surfactantes), síntese física (como fotoquímica por raios ultravioletas e infra-vermelhos, radiólise e termólise) ou síntese verde (técnicas biológicas limpas, atóxicas e ecologicamente corretas). Uma estratégia comumente utilizada para gerar partículas monodispersas é usar métodos químicos, como por exemplo, a redução do sal metálico em solução. Mas muitas vezes necessitam da adição de substâncias químicas para uma melhor estabilização. Um dos principais métodos químicos foi desenvolvido por Turkevitch e colaboradores em 1951 e mais tarde refinado por Frens e colaboradores em 1973. Baseia-se na redução química de sais de ouro, utilizando citrato como agente redutor, que também estabiliza as NPs através de repulsão eletrostática. Para que as nanopartículas de ouro se mantenham estáveis e dispersas em uma suspensão é essencial a presença de uma camada estabilizante, que evite a aglomeração, seja por

repulsão eletrostática ou por impedimento estérico (SCHMID, 1992; DANIEL; ASTRUC, 2004; TOMA; BONIFÁCIO; ANAISSI, 2005; MODY et al., 2010; AUSTIN et al., 2014; NICOL; DIXON; COULTER, 2015).

O desenvolvimento de tecnologias para síntese de nanomateriais é uma área que tem crescido bastante nos últimos anos. O interesse é pelo desenvolvimento de métodos sustentáveis e ambientalmente adequados, ou seja, que utilizem solventes não tóxicos e produzam resíduos com baixo impacto ambiental. Outro interesse é que sejam possíveis de serem reproduzidos em escala industrial, ou seja, métodos simples e rápidos, com precursor barato e facilmente escalonável (IRAVANI, 2011; MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013; GURUNATHAN et al., 2014; KIM et al., 2016). Nesse sentido, a síntese verde tem se destacado. Segundo Silva e colaboradores (2017), síntese verde é a designação comum dada às rotas de síntese que utilizam produtos químicos relativamente atóxicos, biodegradáveis e de custo baixo para sintetizar nanomateriais, tendo como fonte primária ou iniciador da rota um organismo biológico ou partes dele (órgãos, tecidos, células, biomoléculas ou metabólitos). Os agentes redutores verdes incluem um grande número de produtos naturais, como por exemplo: extratos de plantas (GOPINATH et al., 2016; SATHISHKUMAR et al., 2016), algas (SINGARAVELU et al., 2007; LUANGPIPAT et al., 2011; RAJESHKUMAR et al., 2013), bactérias (ABD EL-AZIZ; BADR; MAHMOUD, 2007; SINGH et al., 2015), leveduras (K et al., 2011; MOURATO et al., 2011), fungos (AHMAD et al., 2013; LEE et al., 2015) e materiais residuais (KANCHI et al., 2018).

Foi demonstrado que as nanopartículas metálicas produzidas por plantas ou parte dela são mais estáveis em comparação com as produzidas por outros organismos. Os microorganismos (principalmente bactérias e fungos) apresentam uma taxa de síntese lenta e apenas um número limitado de tamanhos e formas são possíveis em comparação com rotas envolvendo plantas (especialmente os extratos de plantas) e não é necessário preocupar-se com contaminações cruzadas. Acredita-se que a capacidade de redução de íons pelas plantas depende da presença de polifenóis, presentes, por exemplo, no chá, vinho e seus resíduos, como o bagaço de uva vermelha. À medida que a pesquisa se concentra na síntese ecológica de nanopartículas, é sempre preferível usar solvente aquoso (água), evitando assim o uso de produtos químicos tóxicos. A síntese verde de nanopartículas proporciona avanços em relação a outros

métodos, pois é simples, econômica, reprodutível e muitas vezes resulta em materiais mais estáveis. Os resíduos são inócuos e fáceis de descartar já que são, principalmente, compostos de extratos de plantas (IRAVANI, 2011; KHARISSOVA et al., 2013; CHANDRAN; SONG; YUN, 2014; SHARMA; KANCHI; BISETTY, 2015).

A síntese controlada de nanomateriais metálicos (ou seja, nanomateriais com estreita distribuição de tamanho e forma) compreende duas etapas principais: nucleação e crescimento. A nucleação é o processo pelo qual os átomos do metal organizam-se de acordo com a sua estrutura cristalina para formar um núcleo (clusters). Na nucleação de explosão (teoria mais aceita) ocorre à formação de um grande número de núcleos em um curto período de tempo, seguido de crescimento sem nucleação adicional. Isso permite aos núcleos terem histórias de crescimento similares e, portanto, produzir nanopartículas com os mesmos tamanhos. Se a nucleação e o crescimento pudessem ocorrer simultaneamente, as distribuições de tamanho obtidas seriam heterogêneas. A supersaturação das espécies de crescimento compreende o primeiro requisito para a ocorrência de nucleação homogênea. A supersaturação pode ser conseguida através da geração *in situ* das espécies de crescimento de soluto (átomos de metal) através da conversão de precursores solúveis em átomos de metal por reações de redução ou de decomposição. Posteriormente, átomos adicionais podem se depositar e sofrer um crescimento. O processo de crescimento começa com uma redução rápida seguida por um processo de nucleação de clusters de ouro que sofrem processos de coalescência até atingir o tamanho final que é definido por uma estabilização (Figura 11) (POLTE et al., 2010a; POLTE et al., 2010b; THANH; MACLEAN; MAHIDDINE, 2014; CAMARGO et al., 2015). Os parâmetros de crescimento importantes incluem o potencial de redução do agente redutor, a temperatura, a concentração de precursores e a presença de surfactantes. O fator limitante é a completa redução dos íons de ouro (MODY et al., 2010; LIAO; NIU; ZHENG, 2016).

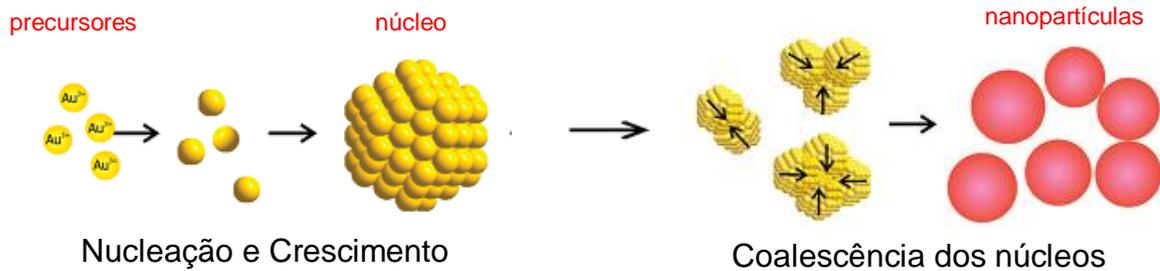


Figura 11. Ilustração esquemática do processo de formação de nanopartículas de ouro. Fonte: Adaptado de THANH; MACLEAN; MAHIDDINE, 2014.

1.4 Aplicações biomédicas das Nanopartículas de ouro

Pesquisas com AuNPs são realizadas praticamente para todas as aplicações médicas, incluindo diagnósticos, terapia, profilaxia e higiene (por exemplo, na purificação de água) (DYKMAN; KHLEBTSOV, 2012). A dispersão óptica de AuNPs pode ser aproveitada para detectá-las por uma variedade de métodos de microscopia. Devido a sua multivalência, nanopartículas de ouro podem proteger drogas instáveis ou pouco solúveis e facilitar sua entrega em regiões inacessíveis do corpo. Devido ao seu tamanho, as nanopartículas de ouro podem perturbar e modificar seletivamente os processos celulares, ao contrário do que ocorre com as proteínas, permitindo-lhes agir como agentes intrínsecos. A conversão eficiente de luz em calor por nanopartículas de ouro pode permitir a ablação térmica altamente específica de tecidos doentes ou infectados. Além disso, podem ser usadas em contraste para imagens fotoacústicas ou para terapias fototérmicas. Sua capacidade de absorver fortemente radiação de raios-X pode ser usada como adjuvantes para radioterapia ou como agentes de contraste para técnicas de imagem baseadas em raios-X, como na tomografia computadorizada (DREADEN et al., 2012; ETHERIDGE et al., 2013; MIESZAWSKA et al., 2013). Os sucessos nessas pesquisas levaram à aprovação pela FDA (U.S. Food & Drug Administration) de sistemas de diagnóstico *in vitro* baseados em AuNP e ensaios clínicos de AuNPs para tratamentos de câncer e de problemas cardiovasculares.

1.5 Epigallocatequina-3-galato

O chá é a segunda bebida mais consumida em todo o mundo, atrás apenas da água (KIM; QUON; KIM, 2014). Beber chá é considerado um hábito de promoção da saúde desde a antiguidade (CABRERA et al., 2006). A pesquisa medicinal moderna proporciona um conhecimento científico para essa crença. As evidências que apoiam os benefícios para a saúde de beber chá cresce com cada novo estudo que é publicado na literatura científica (HAYAKAWA et al., 2016). *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Figura 12) é a planta que dá origem a uma variedade de chás. É um arbusto ou árvore de pequeno porte, de origem asiática, pertencente à família Theaceae. Apresenta folhas simples, alternas, inteiras, com margem serrada e textura coriácea (DUARTE; MENARIM, 2006; NAPONELLI et al., 2017). É o grau de fermentação das folhas e brotos que resulta na classificação dos chás em: chá verde (não fermentado), chá preto (totalmente fermentado) ou chá oolong (parcialmente fermentado). O chá verde é produzido a partir de folhas frescas de forma a prevenir a oxidação de componentes polifenólicos, no chá oolong os polifenóis são parcialmente oxidados, enquanto os polifenóis do chá preto sofrem um alto grau de oxidação (SINGHAL et al., 2017). Cerca de 78% do chá consumido em todo o mundo é preto, apenas cerca de 20% é verde e 2% é chá oolong (SCHANTZ; ERK; RICHLING, 2010). Normalmente, o chá preto é mais consumido na Europa, América do Norte e África do Norte (exceto Marrocos), o chá oolong é mais popular na China e Taiwan e o chá verde é mais popular na China, no Japão, na Coreia e no Marrocos. A Índia é o maior produtor mundial de chá, produzindo cerca de 30% do todo chá do mundo. A China é o segundo maior produtor e o segundo maior exportador de chá depois do Sri Lanka (CROCKER, 2012).

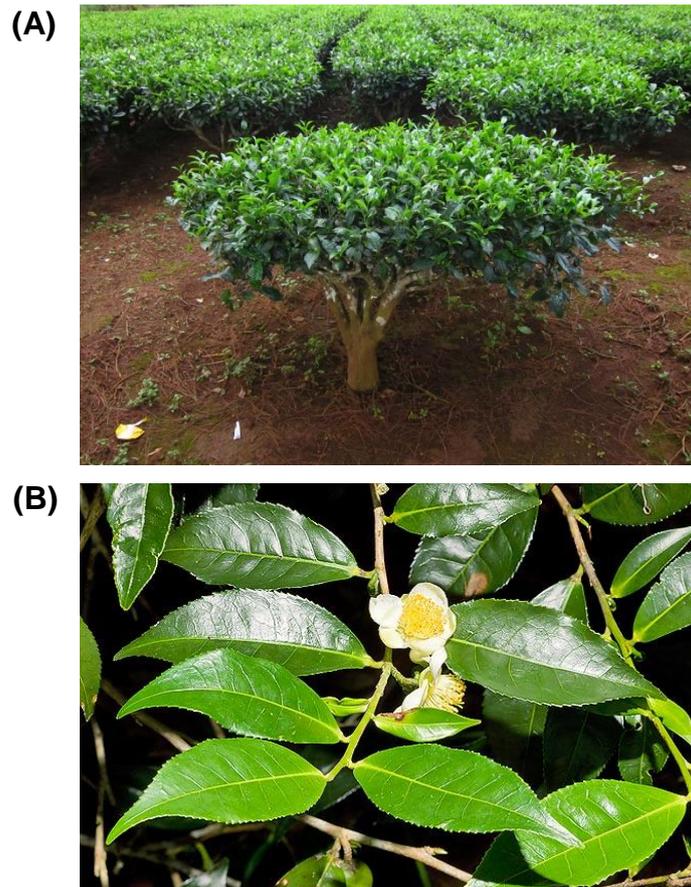


Figura 12. Imagens de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae: (A) arbusto com aproximadamente 1,5m de altura; (B) detalhe das folhas e flor. Fonte: Retirado de <<http://chasbrasil.com/camellia-sinensis-planta-de-origem-chinesa-e-a-base-de-varios-chas/>> e <<http://www.photomazza.com/?Camellia-sinensis&lang=en>> - Autor: Giuseppe Mazza.

Devido ao papel profilático, o chá verde tem se tornado uma bebida cada vez mais popular. Além disso, ao longo das últimas décadas, houve intenso interesse nos seus efeitos benéficos para a saúde e no combate a doenças (AHMAD et al., 2015). O chá verde é uma mistura complexa de compostos incluindo polifenóis, aminoácidos, ácidos orgânicos, lipídios, vitaminas e polissacarídeos (SINGHAL et al., 2017). Os principais componentes do chá verde são os polifenóis (substâncias caracterizadas por possuírem uma ou mais hidroxilas ligadas a anéis aromáticos) e os principais polifenóis são as catequinas que representam de 30-42% da composição química do extrato da planta (SARIC; NOTAY; SIVAMANI, 2016). Devido à técnica de processamento que não envolve fermentação, no chá verde todos os seus componentes são bem preservados, especialmente os polifenóis. Sendo assim, o chá verde

contém mais catequinas em comparação aos outros tipos de chás e seus efeitos mais favoráveis são credenciados aos polifenóis, mais particularmente a subclasse das catequinas (CABRERA et al., 2006; GOPAL et al., 2016).

As quatro catequinas mais encontradas no chá verde são classificadas em: Epigallocatequina-3-galato (EGCG), que representa cerca de 59% do total de catequinas; epigallocatequina (EGC), com aproximadamente 19%; epicatequina galato (ECG) com aproximadamente 13,6%; e epicatequina (EC), com aproximadamente 6,4% (SINGHAL et al., 2017). As catequinas demonstraram ser antioxidantes mais eficazes do que Vitaminas C e E (GOPAL et al., 2016). A Figura 13 mostra a estrutura química das quatro principais catequinas presentes no chá verde. Dentre as catequinas, a EGCG ($C_{22}H_{18}O_{11}$) é a mais abundante e o composto do chá verde biologicamente mais ativo no nível celular *in vitro*, conseqüentemente o mais estudado. O esqueleto da EGCG caracteriza-se pela presença de dois anéis de benzeno (anel A e B) com dois ou mais grupos hidroxilas anexados e um heterociclo de di-hidropirano (anel C). A conjugação de grupos hidroxilo no anel C com ácido gálico (anel D) conduz à formação de EGCG e ECG. EGCG tem grupos hidroxilo nos carbonos 3', 4' e 5' do anel B (3'4'5'-OH) e uma porção galato esterificado no carbono 3 do anel C (Figura 13). As propriedades antioxidantes da EGCG se devem à presença de grupos fenólicos e da porção galato que permitem o deslocamento de elétrons e a capacidade de extinção de radicais livres. A atividade antioxidante da EGCG não envolve apenas a captura direta de espécies reativas de oxigênio (ERO), mas também inibição da produção de ERO através da interação com anti-prooxidante e proteínas, redução nos níveis de citocinas de inflamação, aumento da expressão de enzimas de eliminação de radicais livres intracelulares e quelação de íons metálicos potencialmente pró-oxidantes (LORENZ, 2013; SINGHAL et al., 2017). Um estudo mostrou que a capacidade de eliminação de ERO da EGCG e ECG foi maior que o EGC, GC, EC e C devido ao seu grupo galato em 3' (ANANINGSIH; SHARMA; ZHOU, 2013). Sendo assim, as catequinas que contêm um grupo galato na sua posição 3' (EGCG e ECG) provaram ser os compostos mais potentes fisiologicamente. À EGCG também é creditada a maioria dos benefícios a saúde associados ao consumo de chá verde (STUART; SCANDLYN; ROSENGREN, 2006; FORESTER; LAMBERT, 2011; GOPAL et

al., 2016; HAYAKAWA et al., 2016; NAPONELLI et al., 2017). Uma xícara de chá verde (2,5 g de folhas de chá verde / 200 mL de água) pode conter 90 mg de EGCG (CABRERA et al., 2006). Esta é, principalmente, absorvida no intestino delgado e metabolizada pela microbiota no intestino grosso (SARIC; NOTAY; SIVAMANI, 2016; SCHANTZ; ERK; RICHLING, 2010).

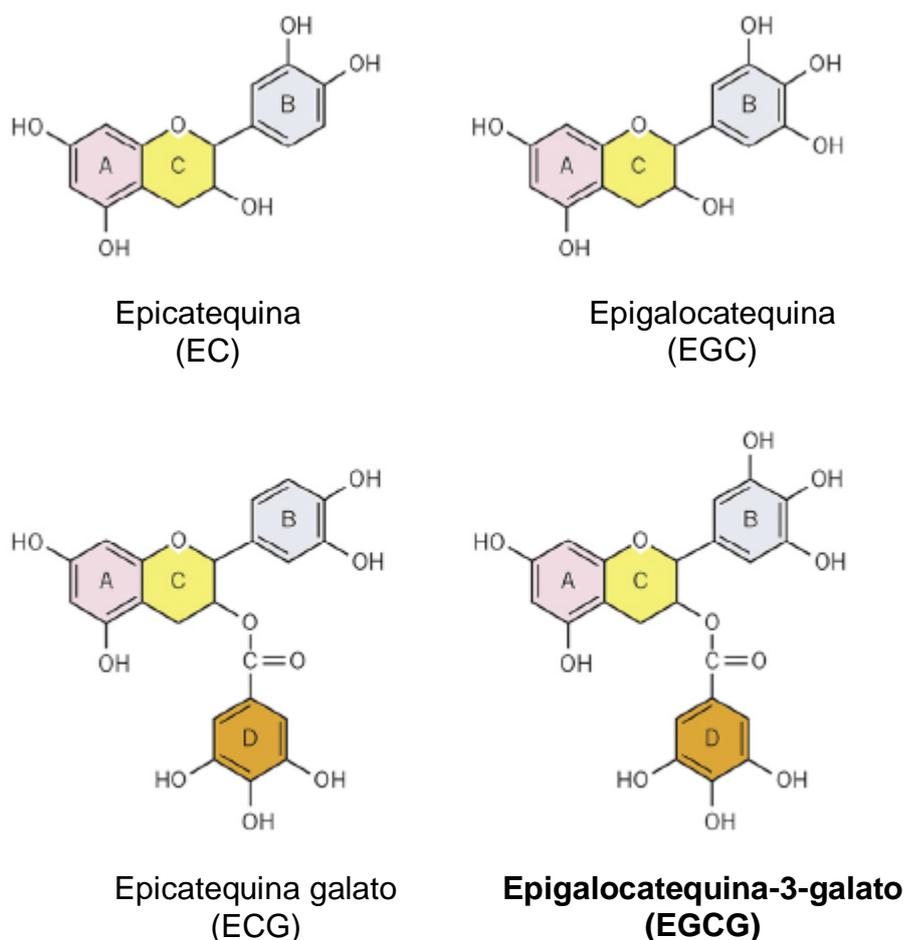


Figura 13. Principais catequinas do chá verde. A maioria das propriedades medicinais do chá verde estão associadas a essas quatro catequinas polifenólicas: epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG) e Epigalocatequina-3-galato (EGCG). As propriedades antioxidantes destas catequinas são atribuídas à presença dos grupos fenólicos hidroxilo no anel B em EC e EGC, e nos anéis B e D de ECG e EGCG. Fonte: Adaptado de ROYCHOUDHURY et al., 2017.

Estudos demonstraram que a EGCG pode oferecer efeitos benéficos contra vários tipos de câncer, como de mama e de próstata (STUART; SCANDLYN; ROSENGREN, 2006; ALBRECHT et al., 2008; NAPONELLI et al., 2017). Assim como demonstrou ser anti-angiogênico (RASHIDI et al., 2017) e anti-alérgico

(TACHIBANA; FUJIMURA; YAMADA, 2004). Também mostrou-se efetivo no controle da obesidade (JURGENS et al., 2012), da acne (YOON et al., 2013) e em doenças renais (BAO; PENG, 2016). Entre doenças associadas à idade e neurodegenerativas, a EGCG mostrou oferecer uma proteção significativa contra as doenças de Parkinson e Alzheimer (SINGH; MANDAL; KHAN, 2015). A EGCG também mostrou efeitos hipocolesterolêmicos (MOMOSE; MAEDA-YAMAMOTO; NABETANI, 2016) e no resgate de déficits cognitivos em portadores de Síndrome de Down (DE LA TORRE et al., 2014). Outros atributos benéficos para a saúde incluem: atividade anti-bacteriana e anti-viral (CIESEK et al., 2011; REYGAERT, 2014; STEINMANN et al., 2013; WEBER et al., 2015), anti-HIV (LI; HATTORI; KODAMA, 2011), anti-fúngica (HIRASAWA; TAKADA, 2004; CHEN; ZHAI; ARENDRUP, 2015) e anti-protozoário (INACIO; CANTO-CAVALHEIRO; ALMEIDA-AMARAL, 2013). Também diminuiu o risco de diabetes mellitus tipo 2 pela redução da resistência à insulina (KIM; KIM, 2013).

Uma visão global das ações gerais da EGCG em nível celular é mostrado na Figura 14. Mudanças nas atividades de várias proteínas quinases, de fatores de crescimento e de fatores de transcrição representam um mecanismo comum envolvido nos efeitos celulares da EGCG. Além da modificação da sinalização intracelular por ativação de receptores de membrana, mostrou-se que a EGCG pode entrar nas células e interagir diretamente com seus alvos moleculares dentro das mesmas. Essa substância também é capaz de modificar a acetilação e glicação de proteínas, contribuindo ainda mais para mudanças nas atividades enzimáticas. No núcleo, induz ou reprime transcrição de genes, interferindo em diferentes níveis de regulação transcricional. Recentemente, mudanças epigenéticas induzidas por EGCG tornou-se um foco de pesquisa. Todas essas ações celulares podem ocorrer a curto prazo (em poucos minutos ou sendo transitória) ou a longo prazo (persistente por horas ou dias). Surpreendentemente, a ação da EGCG frequentemente resulta em efeitos opostos. Em células proliferantes (células tumorais, por exemplo) a EGCG inibe a atividade das cascatas de sinalização intracelular (levando a paralisação do ciclo celular e apoptose), contudo, nas células primárias em repouso, estas vias são muitas vezes ativadas. Essas ações celulares aparentemente contraditórias

forneem a justificativa para o uso potencial da EGCG contra o câncer e contra doenças sem proliferação celular descontrolada (HAYAKAWA et al., 2016)

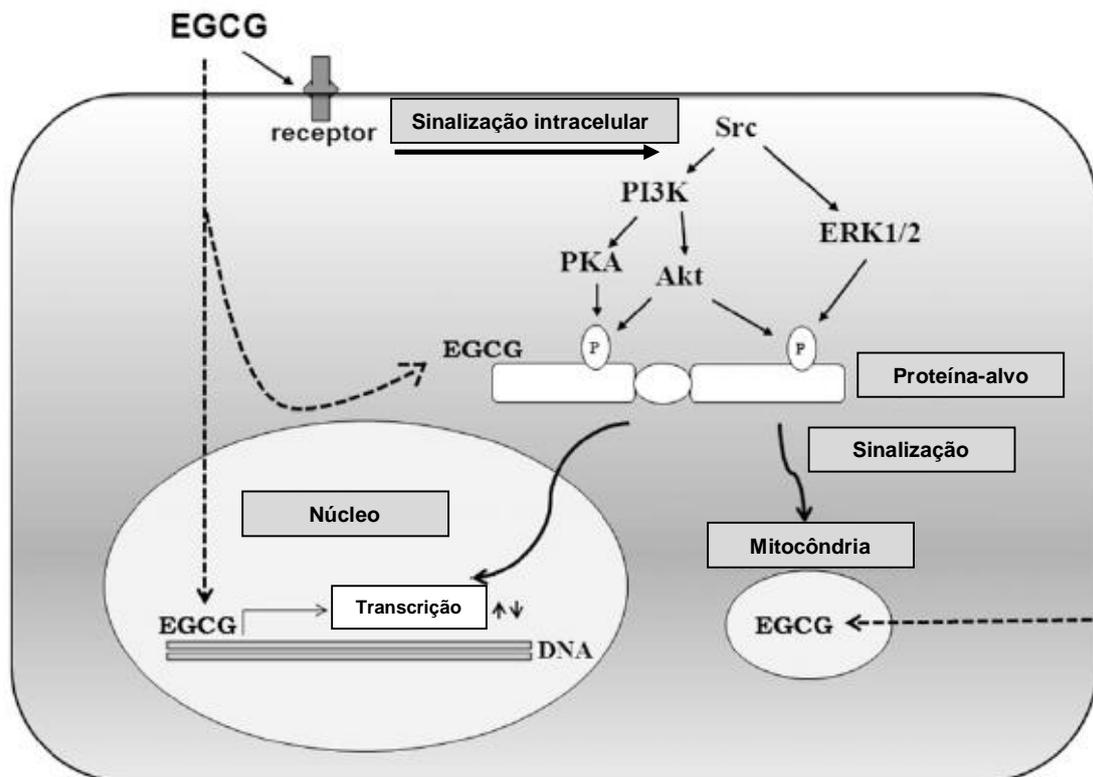


Figura 14. Modelo proposto para ações celulares da EGCG. A EGCG pode iniciar a sinalização intracelular ligando e ativando receptores de membrana celular sem entrar nas células (linha sólida). Várias quinases podem fosforilar proteínas no citoplasma. Se a proteína alvo é um fator de transcrição, pode translocar para o núcleo e modificar a transcrição do gene. Alternativamente, a EGCG pode se translocar dentro das células onde pode ligar e interagir com seus alvos moleculares no citoplasma, mitocôndria ou núcleo (linhas tracejadas). Dependendo do tipo de célula e quantidades de EGCG usados, processos celulares podem ser ativados ou suprimidos. Akt (Akt quinase); ERK1/2 (quinase regulada por sinal extracelular); P (locais de fosforilação); PI3K (fosfatidilinositol-3-OH-quinase); PKA (proteína quinase dependente de AMP cíclica); Src (Src quinase). Fonte: Adaptado de LORENZ, 2013.

1.6 O estado da arte para Nanopartículas de Ouro com Epigallocatequina-3-galato

O ouro nanoestruturado já é amplamente utilizado em várias aplicações biomédicas devido às suas características específicas descritas anteriormente. AuNPs são estáveis na circulação sistêmica e podem ser funcionalizadas com uma variedade de moléculas, podendo ser anexadas por meio de adsorção iônica ou ligação covalente (HSIEH et al., 2011; CHEN et al., 2014; MUKHERJEE et al., 2015). Além disso, modificações nas AuNPs com moléculas específicas

podem ser uma estratégia eficaz para tornar as AuNPs um sistema de entrega de medicamentos controlável com segmentação específica (para células-alvo, tecidos ou órgãos) ou de diagnóstico. Nanocarreadores permitem segmentação passiva através da permeabilidade reforçada e efeito de retenção. Além disso, a segmentação ativa pode ser alcançada pela conjugação com moléculas que se ligam a antígenos ou receptores hiper expressos na superfície das células cancerosas, facilitando assim o acúmulo seletivo de medicamentos anticancerígenos para os tecidos pretendidos sem reações adversas (TSAI et al., 2016). A entrega mediada por nanopartículas é útil por minimizar a toxicidade e melhorar a biodisponibilidade das moléculas conjugadas em suas superfícies (como por exemplo, agentes quimiopreventivos ou quimioterápicos), que são fatores considerados fundamentais para aumentar sua eficácia (SIDDIQUI et al., 2009).

Estudos já citados mostraram diversos benefícios da EGCG para a saúde. Tal composto possui muitas propriedades medicinais, assim como propriedades de redutibilidade e quelação de íons metálicos (ZHU et al., 2012). A EGCG juntamente com outras catequinas presentes no chá verde podem reduzir sais de ouro para produzir NPs de ouro (SHUKLA et al., 2012; MUKHERJEE et al., 2015). Os polifenóis são capazes de reduzir Au^{3+} a AuNPs pela ação antioxidante dos compostos fenólicos, que têm alta tendência para quelar metais (JIN et al., 2015). Estudos anteriores relataram que a EGCG pode efetivamente reduzir os íons de ácido tetracloroauríco (III) a AuNPs e também servem como um excelente estabilizador para prevenir que as AuNPs sintetizadas sofram aglomeração, fornecendo uma robusta blindagem (NUNE et al., 2009; TSAI et al., 2016).

O câncer continua sendo uma das doenças mais devastadoras do mundo, sugerindo que será a doença mais prevalente até 2020 (SIDDIQUI et al., 2009). Por essa razão, não surpreende que a EGCG tenha se tornado um dos fitoquímicos mais populares no estudo do tratamento de cânceres (SANNA et al., 2014). Uma nova maneira de aprimorar seus efeitos quimiopreventivos são as nanoformulações de nanopartículas de ouro com Epigallocatequina-3-galato (AuNPs-EGCG) (MUKHERJEE et al., 2015). Até a presente data, alguns exemplos de AuNPs sintetizadas com EGCG foram relatados. Em um trabalho

pioneiro, Nune e colaboradores (2009) investigaram o papel dos fitoquímicos presentes nas folhas de chá preto e catequinas comercialmente disponíveis para fornecer as AuNPs potencial terapêutico para câncer de próstata e de mama. Mais recentemente, eles demonstraram que AuNPs radioativas biocompatíveis estabilizadas com EGCG se ligam com excelente afinidade aos receptores de laminina super expressos em células tumorais da próstata e reduzem os volumes tumorais da próstata *in vivo* (SHUKLA et al., 2012). Um estudo de 2011 relatou pela primeira vez a síntese de AuNPs utilizando a EGCG como agente redutor e estabilizador. Neste estudo, desenvolveram um conjugado capaz inibir o crescimento de células tumorais de bexiga através do mecanismo de apoptose celular (HSIEH et al., 2011). O mesmo grupo de pesquisadores em 2012 foi o primeiro a publicar um estudo de síntese, caracterização, atividade antioxidante, citotoxicidade *in vitro*, bem como a atividade anticancerígena *in vivo* de AuNPs conjugadas com EGCG (YEH et al., 2012). Outro estudo recente relatou que as AuNPs revestidas com EGCG são uma combinação capaz de inibir o crescimento de células de melanoma em murinos. A biocompatibilidade elevada de AuNPs-EGCG também foi estabelecida (YEH et al., 2014). Por último, uma pesquisa publicada em 2015 mostrou que AuNPs-EGCG levaram células tumorais a apoptose enquanto protegeram os hepatócitos normais do dano celular induzido pelo tumor em virtude de suas propriedades antioxidantes. Além disso, a absorção celular e retenção da EGCG foi muito melhor no formato das nanopartículas, que pode ser a base de suas propriedades tumoricidas e hepatoprotetoras melhoradas (MUKHERJEE et al., 2015).

Outras áreas médicas também tem estudado o uso de AuNPs-EGCG. Leu e colaboradores (2012) sintetizaram uma mistura de AuNPs, EGCG e ácido α -lipóico (ALA) e demonstraram que esta nanoformulação acelerou significativamente a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos através de efeitos antiinflamatórios e antioxidantes. Sanna e colaboradores (2014) sintetizaram e caracterizaram AUNPs-EGCG estáveis e detectaram propriedades antioxidantes aprimoradas. Sugeriram a aplicação promissora para o tratamento de distúrbios associados ao estresse oxidativo. Mais recentemente, uma pesquisa mostrou que AuNPs-EGCG é uma promissora opção no tratamento de várias doenças cardiovasculares, como alternativa aos stents

revestidos de drogas. Esta nanoformulação mostrou especificidade pelo receptor de laminina e internalizou-se em células de músculo liso e células endoteliais através de endocitose. Servindo como um veículo de entrega eficaz do agente terapêutico (EGCG) dentro de células vasculares (KHOOBCHANDANI et al., 2016).

1.7 Planejamento Experimental

Com base na pesquisa prévia da literatura, notou-se a inexistência de estudos planejados para síntese de AuNPs-EGCG onde diversas variáveis tenham sido testadas, assim como a interação entre elas. Sendo assim, utilizamos o planejamento e análises estatísticas de experimentos como ferramenta para encontrarmos as melhores condições operacionais de síntese. Porém a ausência de dados como estes na literatura torna difícil a análise comparativa dos nossos resultados.

A palavra “otimizar” significa fazer tão perfeito, efetivo ou funcional quanto possível, extrair o melhor resultado possível. Variadas técnicas de planejamento experimental e análise estatística de dados podem ser utilizadas na otimização de diversos sistemas (BRASIL et al., 2007). Um experimento planejado é um teste, ou série de testes, no qual são feitas mudanças propositais nas variáveis de entrada de um processo (fatores controláveis), de modo a observar e identificar mudanças correspondentes na resposta de saída (y) (Figura 15). Utilizando planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos, os pesquisadores podem extrair do sistema em estudo o máximo de informações úteis, fazendo um número mínimo de experimentos (sem prejuízo da qualidade da informação) quando comparado com o método univariado (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). A inclusão de métodos estatísticos, como o Planejamento de Experimentos (*Design of Experiments* - DOE), na rotina da pesquisa científica é um componente cada vez mais observado. Com tal inserção visa-se adquirir conhecimento através da coleta, análise e interpretação de informações, maximizando o potencial de geração de resultados por unidade monetária e tempo investidos (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006). É papel também das técnicas de planejamento de experimentos a diminuição do tempo

de desenvolvimento do projeto, minimizar a sensibilidade a fatores externos e reduzir custos do processo (SILVA, 2015). A introdução da metodologia do planejamento experimental nos estágios iniciais do desenvolvimento de um projeto é, em geral, a chave para o sucesso do mesmo (MONTGOMERY, 2005).

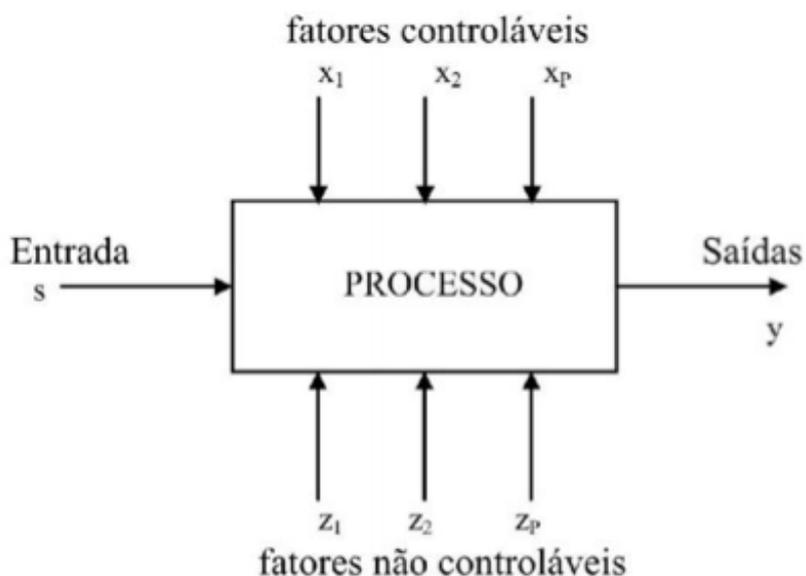


Figura 15. Modelo geral de um processo ou sistema. O sistema atua como uma função - desconhecida, em princípio, senão não precisaríamos de experimentos – que opera sobre as variáveis de entrada (os fatores) e produz como saída uma ou mais respostas observadas. Algumas das variáveis do processo são controláveis, sendo outras não-controláveis. O objetivo do planejamento de experimentos inclui a determinação de quais variáveis x mais influenciam a resposta y . Fonte: Adaptado de MONTGOMERY, 2005.

Para estudarmos o comportamento das variáveis que influenciam nossa pesquisa, realizamos experimentos. Para isto, escolhemos, de acordo com a conveniência do pesquisador e com pesquisa bibliográfica prévia, níveis (valores dos fatores) para as variáveis de interesse e executamos experimentos em combinações dos níveis destas variáveis. É importante ressaltar que esta técnica não substitui o conhecimento técnico do pesquisador sobre o assunto. É, portanto, uma técnica de extrema importância, pois seu correto emprego permite identificar conjuntamente o comportamento de diversos fatores e como podem estar influenciando os resultados (CAMARGO; MOREIRA; VACCARO, 2010). Segundo NETO e colaboradores (2006), o uso de experimentos estatísticos planejados cresceu rapidamente em vários campos de pesquisa, especialmente na química, na engenharia química, na engenharia de alimentos e na

biotecnologia. Um fator que tem impulsionado a aplicação do Planejamento de Experimentos são as ferramentas computacionais de análise estatística. Os planejamentos experimentais mais usados no Brasil são os fatoriais (completos e fracionados) e o Planejamento Composto Central.

Segundo BUTTON (2005), o planejamento fatorial fracionado é indicado para a fase inicial do procedimento experimental quando há muitas variáveis que interferem no sistema, ou seja, há a necessidade de realizar uma triagem e descartar os fatores não significativos. Este permite realizar um número menor de experimentos e é representado por 2^{k-1} . Onde, k é o número de fatores/variáveis e 2 níveis (isto é, valores de referência para teste e análise). Quando apenas dois níveis são utilizados, são comumente representados por alto (+) e baixo (-). O uso de gráficos para visualizar os efeitos principais e as interações auxilia na interpretação e comunicação dos resultados (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

A Análise de Variância (ANOVA) é a técnica estatística utilizada para validar os resultados de um experimento. O objetivo dessa técnica é analisar a variação média entre os resultados dos experimentos e inferir quais são os fatores que produzem efeitos significativos nas respostas de um sistema. Matematicamente, procura-se identificar se os coeficientes desse modelo são reflexos do erro experimental, erros gerados por fatores não controláveis e erros gerados pela falta de padronização na execução e medição dos experimentos, ou se realmente são efeitos significativos. Por se tratar de um teste de comparação de médias, a Análise de Variância é baseada no seguinte teste de hipóteses: A hipótese nula (H_0) afirma que não existe diferença entre as médias dos tratamentos. O teste de hipóteses é realizado com base na distribuição F (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

Tendo selecionado os fatores importantes, o próximo passo é avaliar quantitativamente sua influência sobre a resposta, bem como as interações de uns fatores com os outros e encontrar os níveis dos fatores importantes que otimizam a resposta, ou seja, os pontos ótimos. Nessa situação, uma técnica conveniente é a Metodologia de superfícies de respostas (BRASIL et al., 2007).

A Metodologia de Superfícies de Resposta, é uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas, úteis para modelagem e análise nas aplicações em que a resposta de interesse é influenciada por muitas variáveis e o objetivo é otimizar, estatisticamente, essa resposta. Assim, o primeiro passo é encontrar uma aproximação para o verdadeiro relacionamento entre a variável resposta (y) e as variáveis independentes (fatores). Geralmente, utiliza-se uma regressão polinomial de baixo grau em alguma região das variáveis independentes. Essencialmente, essa abordagem busca aproximar as repostas obtidas em um polinômio que descreve o comportamento dos fatores. Ao gerar o desenho desse modelo de regressão é possível identificar a região do ponto ótimo. Para implementação dessa estratégia de experimentação existem muitos delineamentos de superfície de resposta que podem ser utilizados. O caso mais utilizado é o Planejamento Composto Central. Este deve ser utilizado para verificar a curvatura de um plano, ou seja, para verificar a existência de termos quadráticos no modelo de regressão. De modo geral, este tipo de planejamento consiste de uma parte referente ao planejamento fatorial com 2^k ensaios fatoriais + 2^k ensaios em pontos axiais + um número arbitrário de repetições no ponto central (CAMARGO; MOREIRA; VACCARO, 2010; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o potencial redutor da Epigallocatequina-3-galato para a formação de nanopartículas de ouro estáveis.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar as AuNPs utilizando a EGCG como agente redutor, avaliando as variáveis - tempo, concentração do agente redutor, temperatura, agitação e pH - que mais interferem no processo;
- Caracterizar o nanomaterial sintetizado quanto:
 - A formação de nanopartículas;
 - Aos grupos funcionais presentes após a síntese;
 - A interação de grupos funcionais da EGCG com as nanopartículas;
 - A estabilidade;
 - A morfologia e tamanho;
 - A distribuição de tamanho;
 - A citotoxicidade.

3 METODOLOGIA

Este estudo foi realizado no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) na UFES.

3.1 Materiais

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de pureza analítica. Todas as vidrarias e materiais utilizados foram previamente lavados com solução de água régia, uma solução de ácido nítrico (HNO_3) e ácido clorídrico (HCl) na proporção volumétrica de 1:3 e, em seguida, lavadas 10 vezes com água destilada e secos em temperatura ambiente. A água ultrapura utilizada para todos os ensaios e preparos de solução foi obtida pelo sistema Milli-Q® da Millipore (Burlington, Massachusetts, EUA).

3.2 Síntese das Nanopartículas de Ouro

As nanopartículas de ouro foram sintetizadas pelo método de oxi-redução utilizando solução de $2,5 \times 10^{-4}$ mol/L de ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) da marca Sigma-Aldrich (Missouri, EUA) - concentração estabelecida a partir de estudos prévios do grupo. A Epigallocatequina-3 galato (EGCG) (>95% de pureza por HPLC) foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). A proporção utilizada de HAuCl_4 para EGCG foi de 3:1. As demais condições experimentais foram determinadas pelo planejamento experimental abaixo. Após cada etapa de síntese o material foi centrifugado a 14.000 rpm por 20 minutos (ANEXO I). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em água ultrapura.

3.3 Planejamento Experimental

Para a síntese das nanopartículas com a EGCG escolhemos utilizar o planejamento experimental que permite eficiência e economia no processo experimental e o uso de métodos estatísticos na análise dos dados obtidos resultando em objetividade científica nas conclusões. Para estudar a síntese de

nanopartículas de ouro utilizando a EGCG como agente redutor e estabilizador, a formação das nanopartículas pode depender da concentração de EGCG utilizada, do tempo da reação, da temperatura, do pH da solução de EGCG e da agitação empregada na síntese. Outras variáveis podem influenciar neste processo, mas estas foram as escolhidas por serem consideradas de maior relevância.

Visando otimizar a síntese de nanopartículas de ouro com a EGCG foi realizado um planejamento experimental utilizando um Planejamento Fatorial Fracionado para seleção das variáveis significativas (TRIAGEM) e em seguida foi realizado um Planejamento Composto Central (OTIMIZAÇÃO) com o objetivo de determinar os pontos ótimos para a síntese.

3.3.1 Planejamento Fatorial Fracionado

Como o número de variáveis que afetam a síntese dos nanomateriais são muitas, optou-se por selecionar as principais variáveis para otimização a partir de um planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} (16 experimentos). Sendo assim, cinco variáveis e os níveis foram selecionados com base em pesquisa prévia na literatura. A Tabela 1 abaixo apresenta as variáveis e os valores assumidos para cada uma delas.

Tabela 1. Valores assumidos pelos níveis do planejamento fatorial fracionado.

Variável	Intervalo de Estudo	
	Baixo (-)	Alto (+)
Tempo (min)	10	60
Temperatura (°C)	25	60
Concentração da EGCG (mg/mL)	0,1	3
Agitação (rpm)	100	600
pH	3	9

Para melhor compreender as etapas do planejamento fatorial fracionado, a Tabela 2 abaixo apresenta cada uma das 16 sínteses e suas respectivas condições.

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial fracionado das 16 sínteses de nanopartículas de ouro com EGCG.

Experimento	Tempo (min)	Concentração (mg/mL)	Tempertura (°C)	Agitação (rpm)	pH
1	10	0,1	25	100	9
2	60	0,1	25	100	3
3	10	3	25	100	3
4	60	3	25	100	9
5	10	0,1	60	100	3
6	60	0,1	60	100	9
7	10	3	60	100	9
8	60	3	60	100	3
9	10	0,1	25	600	3
10	60	0,1	25	600	9
11	10	3	25	600	9
12	60	3	25	600	3
13	10	0,1	60	600	9
14	60	0,1	60	600	3
15	10	3	60	600	3
16	60	3	60	600	9

O efeito de cada uma das variáveis foi analisado em relação à absorvância máxima e ao comprimento de onda máximo (λ máx) – VARIÁVEIS RESPOSTA. Os ensaios foram realizados em ordem aleatória. Foi realizada análise estatística para verificar quais variáveis foram significativas. Os dados experimentais foram processados empregando o programa Statistica Software versão 14.12.0. A significância dos efeitos das variáveis foi concluída pela aplicação da análise de variância (ANOVA). Foi considerado $p < 0,1$ como significância. Foram utilizados também gráficos de Distribuição Normal e de Pareto para análise dos resultados.

3.3.2 Planejamento Fatorial Composto Central

Após a definição das variáveis mais significativas no processo de síntese, duas delas foram escolhidas para a otimização. Assim, um planejamento experimental fatorial Composto Central com 3 níveis e 2 variáveis foi realizado, ou seja, um planejamento 3^2 (9 experimentos) com duas repetições do ponto central, totalizando 11 experimentos. Os níveis dos fatores foram codificados como -1 (baixo), 0 (ponto central) e 1 (alto). Para o tratamento dos dados, o programa estatístico Statistica Software versão 14.12.0 foi empregado para obtenção dos efeitos, coeficientes e desvio padrão dos coeficientes, gráfico de Pareto, as superfícies de respostas e de outros parâmetros estatísticos do modelo ajustado. A Tabela 3 apresenta os intervalos de estudo das variáveis.

Tabela 3. Intervalos de estudo das variáveis do planejamento fatorial composto central.

Variável	Intervalo de estudo		
	Baixo (-)	Central (0)	Alto (+)
Variável 1	-	0	+
Variável 2	-	0	+

3.4 Caracterização estrutural e físico-química das nanopartículas de ouro

3.4.1 Espectroscopia de absorção no UV-vis

Com o objetivo de confirmar a formação das AuNPs e analisar dispersão e tamanho relativo foi realizada a espectroscopia de absorção no UV-vis. Para obtenção dos dados de absorbância do material sintetizado foi utilizado o espectrofotômetro Varioskan® Flash do Laboratório de Imunopatologia da UFES. A leitura foi feita de 200 a 800 nm com intervalo de 1nm. O resultado foi expresso por meio de gráficos de absorbância por comprimento de onda (nm) obtidos pelo software OriginPro 8.5.0.

3.4.2 Espectroscopia no Infravermelho

Com o objetivo de detectar os grupamentos químicos e identificar as possíveis estruturas responsáveis pela redução dos íons Au⁺ e pelo capeamento das AuNPs, as medidas de Espectroscopia de Infravermelho foram realizadas no modo FT-IR (FT-MIR FTLA 2000 Bomem) no Laboratório de Instrumentação do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Metodologias para Análises de Petróleo (LabPetro) da UFES. Para esta análise o coloide metálico sintetizado foi desidratado e como controle foi utilizada uma amostra da EGCG pura. Todas as bandas foram analisadas pelo software Origin Pro 8.5.0.

3.4.3 Espectroscopia Raman

Com o objetivo de identificar a interação de grupos funcionais da EGCG com as nanopartículas, uma gota do coloide metálico foi seca sobre a superfície de uma lâmina de vidro e levados para análise em Espectroscopia Raman (ALPHA 300R *Confocal Raman Spectrometer*) utilizando fonte de laser de 532 nm e realizado varrimento na região do número de onda de 0-4000 cm⁻¹. A EGCG foi utilizado como controle. As medidas de Espectroscopia Raman foram realizadas no Laboratório de Instrumentação do LabPetro da UFES.

3.4.4 Potencial Zeta

Com o objetivo de verificar a estabilidade do coloide metálico, as medidas foram realizadas no instrumento analisador de partículas Microtac Zetatrac no Laboratório de Química do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES), de Aracruz/ES utilizando cerca de 2 mL do coloide. As medidas foram realizadas em triplicata e tirada a média dos valores obtidos. Os valores foram expressos em mV.

3.4.5 Espectrometria de Massa com Fonte de Plasma (ICP-MS)

Com o objetivo de conhecer a concentração de ouro do nanomaterial sintetizado, as nanopartículas foram destinadas à análise. Foi utilizado 1 mL do coloide metálico em um Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) modelo NEXION300D (PerkinElmer) pertencente ao Laboratório de Físico-Química da UFES. Os resultados foram expressos em mg/L.

3.4.6 Microscopia eletrônica de transmissão

A análise da forma, tamanho médio e dispersão das nanopartículas de ouro com EGCG foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para tal, alíquotas de 300 μ L do coloide metálico foram colocados em uma lâmina de vidro previamente limpa e seca. O material foi deixado em repouso até a formação de um alo na borda da gota (efeito anel de café). Grades de cobre de 400 *mesh* previamente cobertas com resina Formvar® (resina termoplástica a base de PVA) foram passadas lentamente sobre o anel de amostra formado. As grades foram deixadas secar a temperatura ambiente, sendo depois analisadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão JEM-1400, JEOL, USA inc. operando a 120 kv. As imagens foram obtidas em diferentes aumentos (50.000X, 300.000X, 1.000.000X) com o objetivo de obter informações sobre a forma, o tamanho e aglomerações. Para determinação do diâmetro médio das partículas, 500 partículas foram analisadas no software Image J. Todos os valores de diâmetro foram transferidos para o programa Microsoft® Excel®, onde foi montado o histograma de distribuição de tamanho e frequência das nanopartículas. Detalhes sobre este procedimento podem ser visualizados na Figura 16.

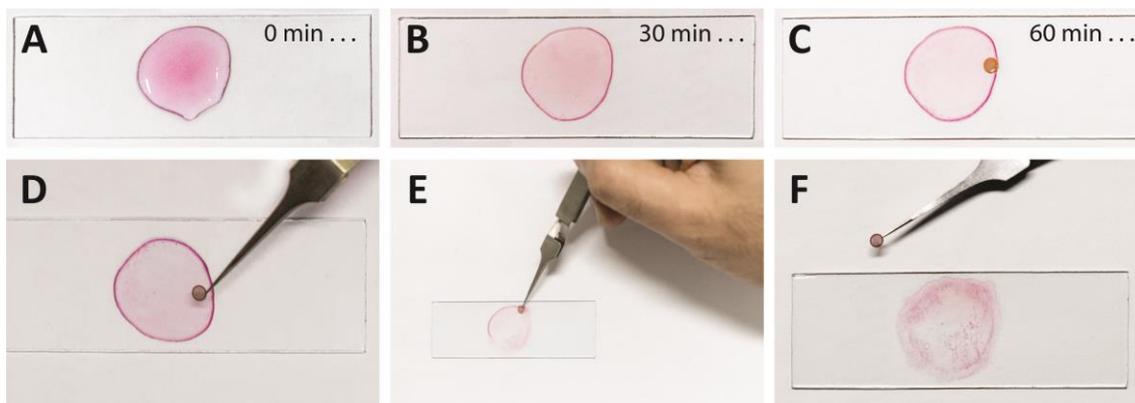


Figura 16. Imagens mostrando a sequência de preparo das grades. Primeiro passo é demonstrado em A, onde a suspensão coloidal de AuNPs foi gotejada no centro de uma lamina de vidro histológica; após um tempo de repouso, verifica-se a formação do anel de café nas bordas da gota (B-C); uma grade previamente coberta com polímero hidrofóbico formvar é colocada sobre a gota (D); a grade é arrastada cuidadosamente sobre todo o anel formado para recuperar o máximo possível de AuNPs (E); a grade preparada (F). Fonte: OLIVEIRA, 2016 (autorizado pelo autor).

3.5 Avaliação da citotoxicidade celular

Os testes de citotoxicidade foram realizados com a linhagem celular J774A.1 (ATCC® TIB-67™) de macrófagos de camundongos, conforme protocolo padronizado ISO 10993-5 (2009). As células foram cultivadas em garrafas de cultura, com meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, São Paulo, Brasil), L-glutamina (Sigma-Aldrich) e Na_2CO_3 (Dinâmica, São Paulo, Brasil). As células foram mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO_2 , para crescimento. A remoção das células para serem utilizadas no teste foi realizada com *cell scraper*, seguido da contagem das mesmas em câmara de Neubauer com corante azul de Trypan (LGC, São Paulo, Brasil). Para o ensaio, 100 μL de células, com a concentração de 5×10^4 células/mL por poço, foram colocados em uma placa de 96 poços. A placa foi incubada por 24 horas, para que as células pudessem aderir. Em seguida, foram acrescentadas as AuNPs-EGCG em diferentes concentrações (7,5; 15; 30; 60; 120; 240 mg/L), previamente diluídas em meio RPMI. Os testes foram feitos em triplicata, com três repetições biológicas. Após incubação por 48 horas, a viabilidade celular foi verificada através do corante AlamarBlue® (Sigma-Aldrich). A leitura foi realizada no aparelho espectrofotômetro Varioskan® Flash e os dados foram analisados através das fórmulas:

Intensidade = média da fluorescência *tratado* – média da fluorescência *branco*

$$\% \text{ inibição} = \left(\left(\frac{\text{intensidade}_{\text{tratamento}}}{\text{intensidade}_{\text{controle}}} \right) - 1 \right) \times 100$$

Após a obtenção das porcentagens de inibição, os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 7, por análise de regressão não-linear, onde foi possível chegar ao IC50 (concentração de um composto necessária para reduzir o crescimento populacional de organismos, incluindo células eucarióticas, em 50 por cento, *in vitro*) das AuNPs-EGCG testadas. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos de Nune e colaboradores (2009) mostraram que polifenóis são capazes de formar nanopartículas de ouro estáveis e com tamanho menor que 45 nm de diâmetro. Estes agem como agente redutor dos sais de ouro e também como agente estabilizador, evitando a aglomeração das nanopartículas. Sabe-se também que as fortes propriedades químicas de redução de EGCG são capazes de converter sais de ouro em nanopartículas de ouro sem a intervenção de quaisquer outras substâncias químicas (SANNA et al., 2014). O potencial redox do $\text{AuCl}_4^-/\text{Au}$ é significativamente positivo em comparação com o potencial redox da EGCG, resultando em uma dupla redox termodinamicamente viável, levando à redução do AuCl_4^- pela EGCG (SHUKLA et al., 2012). Sabendo-se disso, neste estudo, a síntese de AuNPs-EGCG foi explorada em uma ampla faixa de variáveis e níveis respectivos a fim de determinar as condições ótimas de uma síntese com monodispersividade, tamanho adequado e estabilidade.

4.1 Planejamento Fatorial Fracionado

Para a etapa de triagem, 16 ensaios foram realizados. As condições de síntese e as respostas obtidas encontram-se nas Tabelas 4 (comprimento de onda máximo como variável resposta, já que este parâmetro está relacionado ao tamanho das NPs) e 5 (absorbância máxima como variável resposta, já que o pico está relacionado ao volume de NPs sintetizadas) (HAISS et al., 2007). A cor das soluções mudaram do incolor para rosa claro, rosa, vermelho, vermelho rubi, roxo ou azulado, dependendo das condições de síntese. A coloração da solução coloidal é dependente do formato e do tamanho das nanopartículas sintetizadas (EUSTIS; EL-SAYED, 2006). Um exemplo de mudança de coloração das soluções e formação de nanopartículas de ouro pode ser visto na Figura 17.

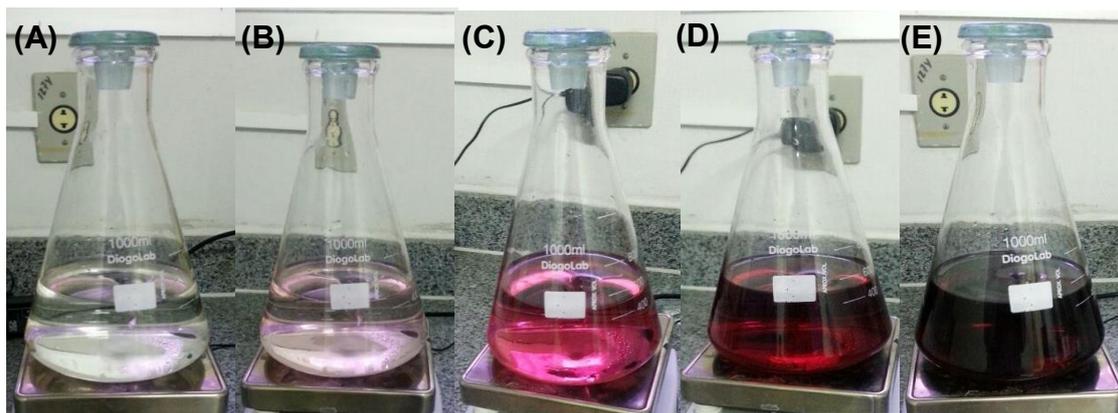


Figura 17. Mudança na coloração da solução coloidal de nanopartículas de ouro sintetizadas com a EGCG na concentração de 0,1 mg/mL. (A) tempo: 0 min; (B) tempo: 1 min; (C) tempo: 3 min; (D) tempo: 5 min; (E) tempo: 10 min.

Tabela 4. Resultados do planejamento fatorial fracionado das 16 sínteses de nanopartículas de ouro com EGCG. A variável resposta utilizada foi o λ máximo.

Experimento	Tempo (min)	Concentração (mg/mL)	Tempertura (°C)	Agitação (rpm)	pH	Comp. Onda (λ máx)
1	10	0,1	25	100	9	524
2	60	0,1	25	100	3	528
3	10	3	25	100	3	624
4	60	3	25	100	9	307
5	10	0,1	60	100	3	529
6	60	0,1	60	100	9	525
7	10	3	60	100	9	304
8	60	3	60	100	3	552
9	10	0,1	25	600	3	528
10	60	0,1	25	600	9	523
11	10	3	25	600	9	311
12	60	3	25	600	3	549
13	10	0,1	60	600	9	524
14	60	0,1	60	600	3	528
15	10	3	60	600	3	582
16	60	3	60	600	9	306

Em vermelho na Tabela 4 estão indicados os ensaios onde houve a formação de nanopartículas de ouro. A caracterização por espectrofotometria de UV-Vis é

uma ferramenta recorrente para a validação das sínteses e verificação da estabilidade coloidal das AuNPs sintetizadas (JATSCHKA et al., 2016). A caracterização das AuNPs por UV-Vis foi realizada imediatamente após a sua síntese. As dispersões coloidais de AuNPs desejadas devem apresentar um pico de absorção máxima por volta dos 520 nm sob a forma de uma banda plasmônica de ressonância bem definida. O deslocamento para direita ou para esquerda da posição da banda plasmônica significa mudança no tamanho das partículas ou formação de agregados. Já a largura da banda está relacionada com a mono ou poli dispersividade da amostra (PISSUWAN et al., 2010; PETRYAYEVA; KRULL, 2011).

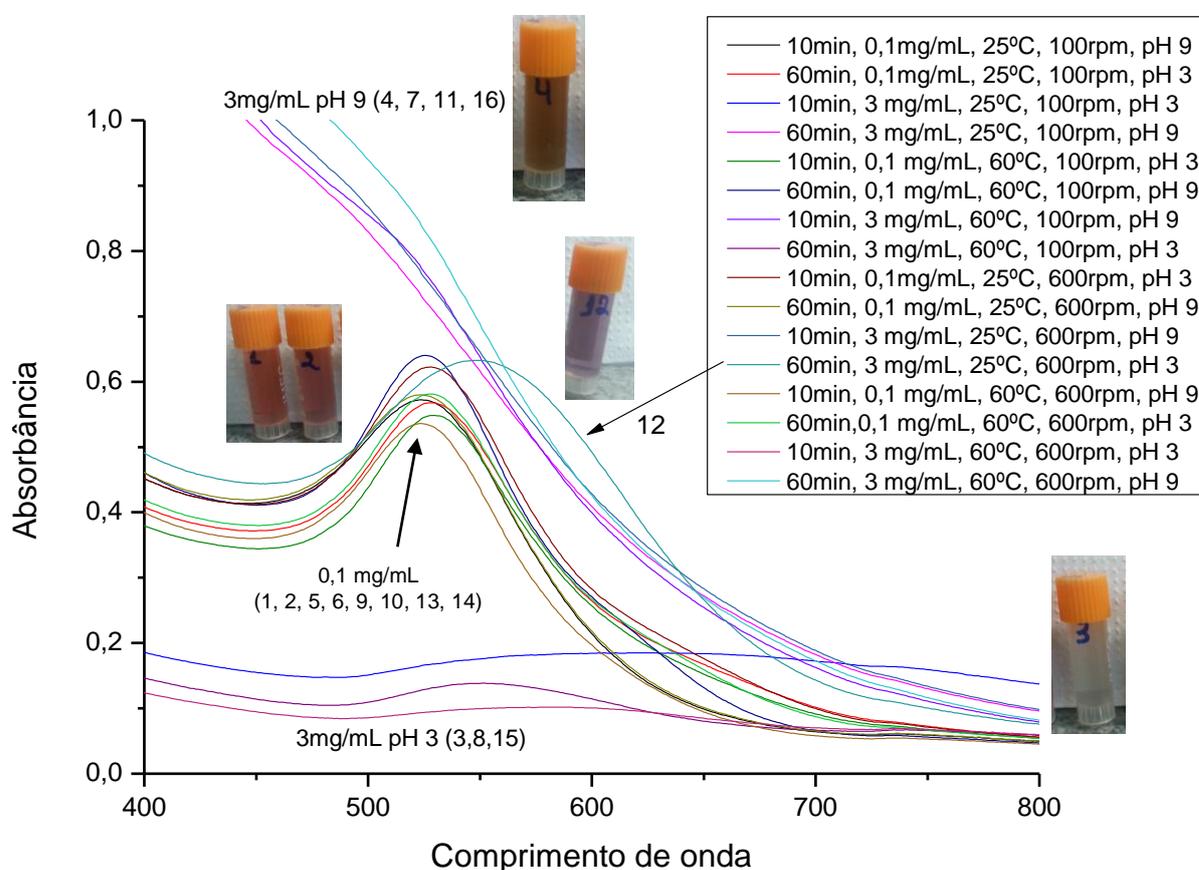


Figura 18. Espectroscopia de absorção no UV-Vis das 16 sínteses de nanopartículas de ouro a partir do planejamento fatorial fracionado utilizando a EGCG como agente redutor.

Por observação dos espectros de absorção no UV- Vis (Figura 18) obtidos constata-se que houve formação de AuNPs em todos os ensaios onde a concentração da solução de EGCG foi 0,1 mg/mL e apenas em três ensaios cuja

concentração era 3 mg/mL, uma vez que os espectros apresentaram as bandas plasmônicas entre 500 e 600 nm. Porém, as bandas plasmônicas de ressonância bem definidas foram encontradas apenas nos ensaios cuja concentração da EGCG foi 0,1 mg/mL. O máximo de absorção foi de 582 nm para as AuNPs sintetizadas pelo experimento 15 (10 min, 3 mg/mL, 60°C, 600 rpm e pH 3), e entre 523 e 529 nm para as AuNPs sintetizadas com a concentração da solução de EGCG a 0,1 mg/mL. Constata-se ainda, pela forma da banda, que os ensaios 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13 e 14 retratam amostras com dispersão bastante reduzida e bem estabilizadas pelo agente de revestimento, uma vez que apresentam a banda menos larga em comparação aos ensaios 8, 12 e 15. Um estudo recente de síntese verde de AuNPs utilizando ácido cafeico de plantas apresentou a banda de ressonância plasmática de superfície característica para AuNPs apenas nas faixas de concentrações intermediárias de ácido cafeico. Mostraram assim que a morfologia e o tamanho das AuNPs podem ser controlados através da concentração do agente redutor. Isto é atribuído à sua influência significativa na interface das nanopartículas, como na energia superficial e na energia de adsorção (KIM et al., 2016).

Foram realizadas análises estatísticas para verificar quais das variáveis envolvidas possuíam maior influência na variável resposta. A Tabela 5 apresenta os resultados da Análise de Variância (ANOVA).

Tabela 5. ANOVA para síntese de nanopartículas de ouro com EGCG utilizando planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} e comprimento de onda máximo como resposta. Em vermelho, as variáveis consideradas estatisticamente significativas. SS – Soma dos quadrados; df – Graus de Liberdade; MS – Quadrados das Médias; F – teste F; p – valor de p.

VARIÁVEL	SS	df	MS	F	p
TEMPO	729,0	1	729,0	0,09959	0,758812
CONCENTRAÇÃO	28392,2	1	28392,2	3,87864	0,077218
TEMPERATURA	121,0	1	121,0	0,01653	0,900249
AGITAÇÃO	110,2	1	110,2	0,01506	0,904757
pH	75076,0	1	75076,0	10,25607	0,009451
ERRO	73201,5	10	73201,5		
TOTAL SS	177630,0	15			

Pode-se verificar que com 90% de confiança as variáveis estatisticamente significativas foram a **concentração da EGCG** e o **pH**, para o nível de significância em que os efeitos são significantes ($p < 0,1$) ficando o tempo (min), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e a agitação (rpm) abaixo desse nível de confiança com relação a resposta comprimento de onda máximo (λ máx).

Na Figura 19 é apresentado o gráfico Normal de Efeitos Padronizados para a resposta comprimento de onda máximo. O gráfico de probabilidade normal dos efeitos mostra os efeitos padronizados em relação a uma linha de ajuste de distribuição no caso em que todos os efeitos são 0. Os efeitos padronizados são estatísticas t que testam a hipótese nula de que o efeito é 0. Os efeitos positivos aumentam a resposta quando as definições mudam do valor baixo da variável para o valor alto. Os efeitos negativos diminuem a resposta quando as definições mudam do valor baixo da variável para o valor alto da variável. Efeitos mais afastados de 0 são estatisticamente mais significativos. Além disso, o gráfico indica a direção do efeito. Concentração da EGCG e pH apresentaram efeitos mais afastados de 0 e negativos. Quando o processo muda de nível baixo para nível alto da variável, a resposta diminui. Ou seja, quando a concentração da EGCG e o pH aumentaram, o comprimento de onda máximo diminui.

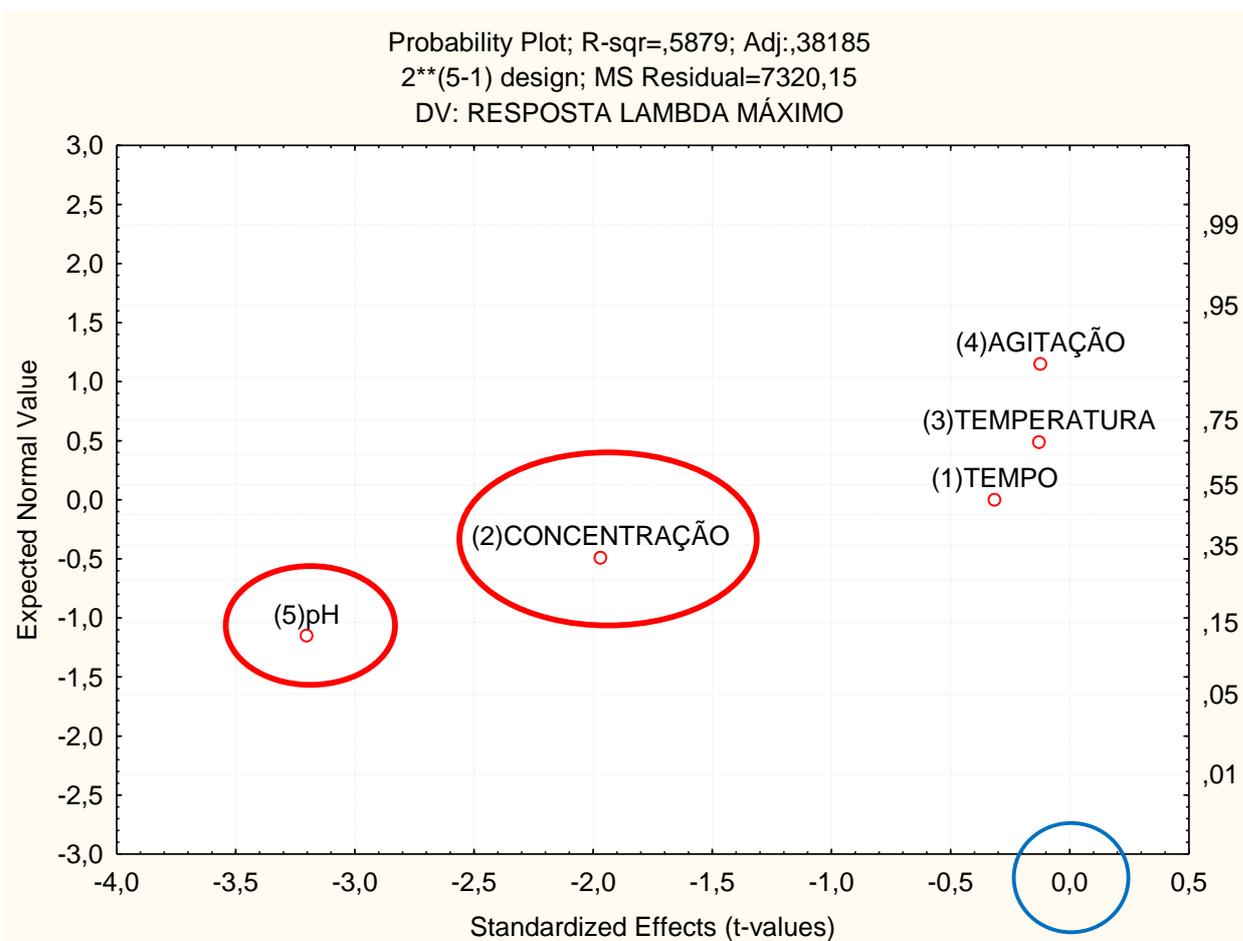


Figura 19. Gráfico Normal de Efeitos Padronizados das 16 sínteses de nanopartículas de ouro a partir do planejamento fatorial fracionado utilizando a EGCG como agente redutor. A variável resposta utilizada foi o comprimento de onda máximo.

O gráfico de Pareto dos efeitos padronizados em $p=0,1$ (Figura 20) é apresentado a fim de permitir uma fácil visualização e identificação das variáveis que mais afetaram a síntese de nanopartículas de ouro com EGCG utilizando o comprimento de onda máximo como resposta. A magnitude dos efeitos é representada pelas colunas enquanto que a linha transversal às colunas representa a magnitude dos efeitos com significado estatístico para $p=0,1$, ou seja, as variáveis que são estatisticamente significativas ao nível de confiança de 90%. As variáveis que ultrapassaram a linha vermelha, foram significativas ($p < 0,1$). As demais variáveis podem ser desprezadas, uma vez que o efeito calculado pode ser negligenciado com 90% de confiança. Os valores padronizados dos efeitos de cada variável aparecem à direita de cada barra.

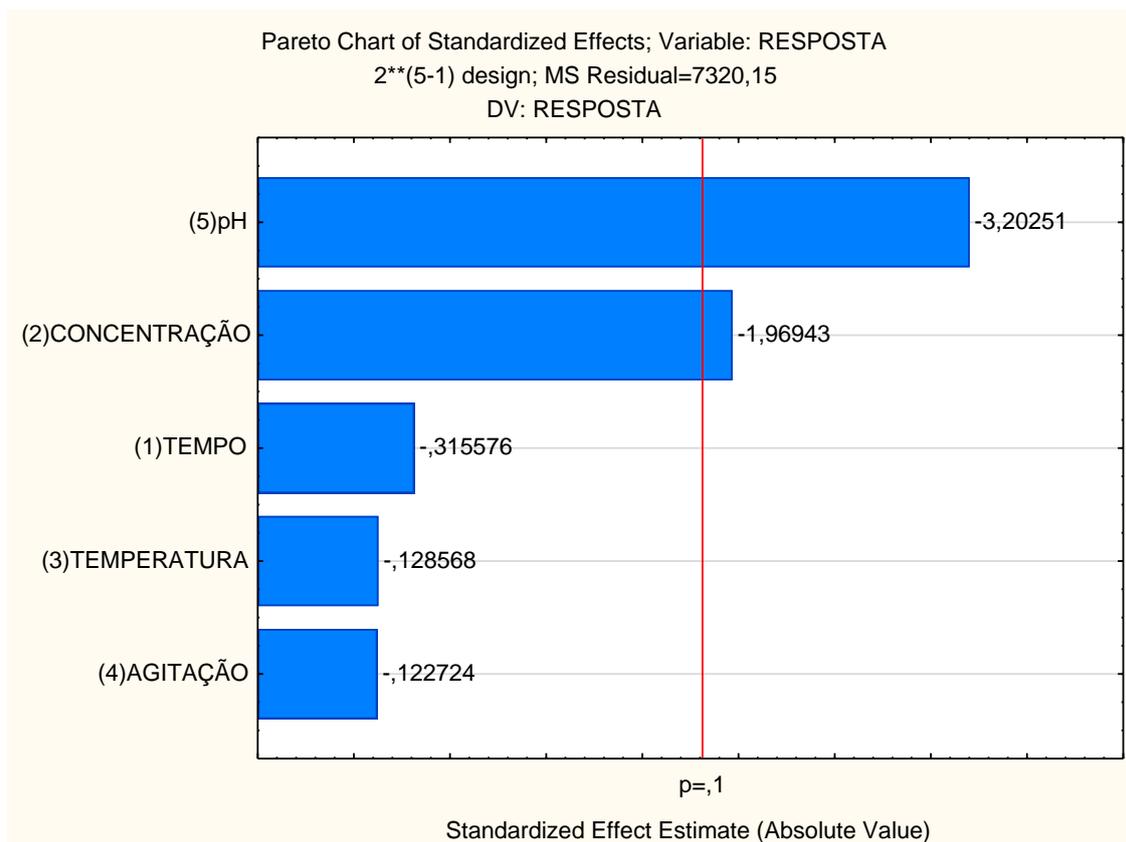


Figura 20. Gráfico de Pareto identificando as variáveis que foram significativas nos experimentos que utilizaram o comprimento de onda máximo como resposta ($p < 0,1$).

Analisando os gráficos das Figuras 19 e 20, podemos inferir que a **concentração da EGCG** e **pH** foram as variáveis mais importantes do processo global de síntese.

Visando complementar os resultados já obtidos, a análise estatística também foi realizada para a variável resposta absorvância máxima. A altura da banda plasmônica de ressonância está relacionada com a concentração de NPs no coloide (HAISS et al., 2007). A Tabela 6 mostra as condições de síntese e os resultados dos ensaios utilizando a absorvância máxima como variável resposta.

Tabela 6. Resultados do planejamento fatorial fracionado das 16 sínteses de nanopartículas de ouro com EGCG. A variável resposta utilizada foi a absorvância máxima.

Experimento	Tempo (min)	Concentração (mg/mL)	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	pH	Absorvância máxima
1	10	0,1	25	100	9	0,572222
2	60	0,1	25	100	3	0,567648
3	10	3	25	100	3	0,185122
4	60	3	25	100	9	0
5	10	0,1	60	100	3	0,548471
6	60	0,1	60	100	9	0,640122
7	10	3	60	100	9	0
8	60	3	60	100	3	0,138488
9	10	0,1	25	600	3	0,622304
10	60	0,1	25	600	9	0,579672
11	10	3	25	600	9	0
12	60	3	25	600	3	0,632608
13	10	0,1	60	600	9	0,53584
14	60	0,1	60	600	3	0,581246
15	10	3	60	600	3	0,101807
16	60	3	60	600	9	0

Em vermelho na Tabela 6 estão indicados os ensaios onde houve a formação de nanopartículas de ouro com volume desejável. A caracterização das AuNPs por UV-Vis foi realizada imediatamente após a sua síntese. Quanto maior o valor de absorvância maior a concentração de NPs sintetizadas. É possível observar que dos 9 ensaios realizados com sucesso, apenas um ensaio (experimento 12) possuía a concentração de EGCG de 3 mg/mL. Todos os demais foram ensaios com a concentração de EGCG de 0,1 mg/mL. Os espectros de absorção no UV-Vis obtidos para os experimentos 4, 7, 11 e 16 não demonstraram qualquer absorvância significativa.

A Tabela 7 apresenta os resultados da Análise de Variância (ANOVA) para a variável resposta absorvância máxima. Pode-se verificar que com 90% de

confiança as variáveis estatisticamente significativas também foram a **Concentração da EGCG** e o **pH**, para o nível de significância em que os efeitos são significantes ($p < 0,1$) ficando o tempo (min), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e a agitação (rpm) abaixo desse nível de confiança com relação a resposta absorvância máxima.

Tabela 7. ANOVA para síntese de nanopartículas de ouro com EGCG utilizando planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} e absorvância máxima como resposta. Em vermelho as variáveis consideradas estatisticamente significativas. SS – Soma dos quadrados; df – Graus de Liberdade; MS – Quadrados das Médias; F – teste F; p – valor de p.

VARIÁVEL	SS	df	MS	F	p
TEMPO	0,020594	1	0,020594	0,98273	0,344907
CONCENTRAÇÃO	0,805282	1	0,805282	38,42818	0,000102
TEMPERATURA	0,023532	1	0,023532	1,12294	0,314211
AGITAÇÃO	0,010070	1	0,010070	0,48056	0,503952
pH	0,068885	1	0,068885	3,28720	0,099902
ERRO	0,209555	10			
TOTAL SS	1,137918	15			

O gráfico Normal de Efeitos Padronizados para a resposta absorvância máxima é apresentado na Figura 21. Assim como nas análises anteriormente realizadas, a **Concentração da EGCG e o pH** apresentaram efeitos mais afastados de 0 e são estatisticamente os mais significativos. Estas variáveis apresentaram efeitos padronizados negativos, sendo assim, quando a concentração da EGCG e o pH aumentam, a absorvância máxima diminui.

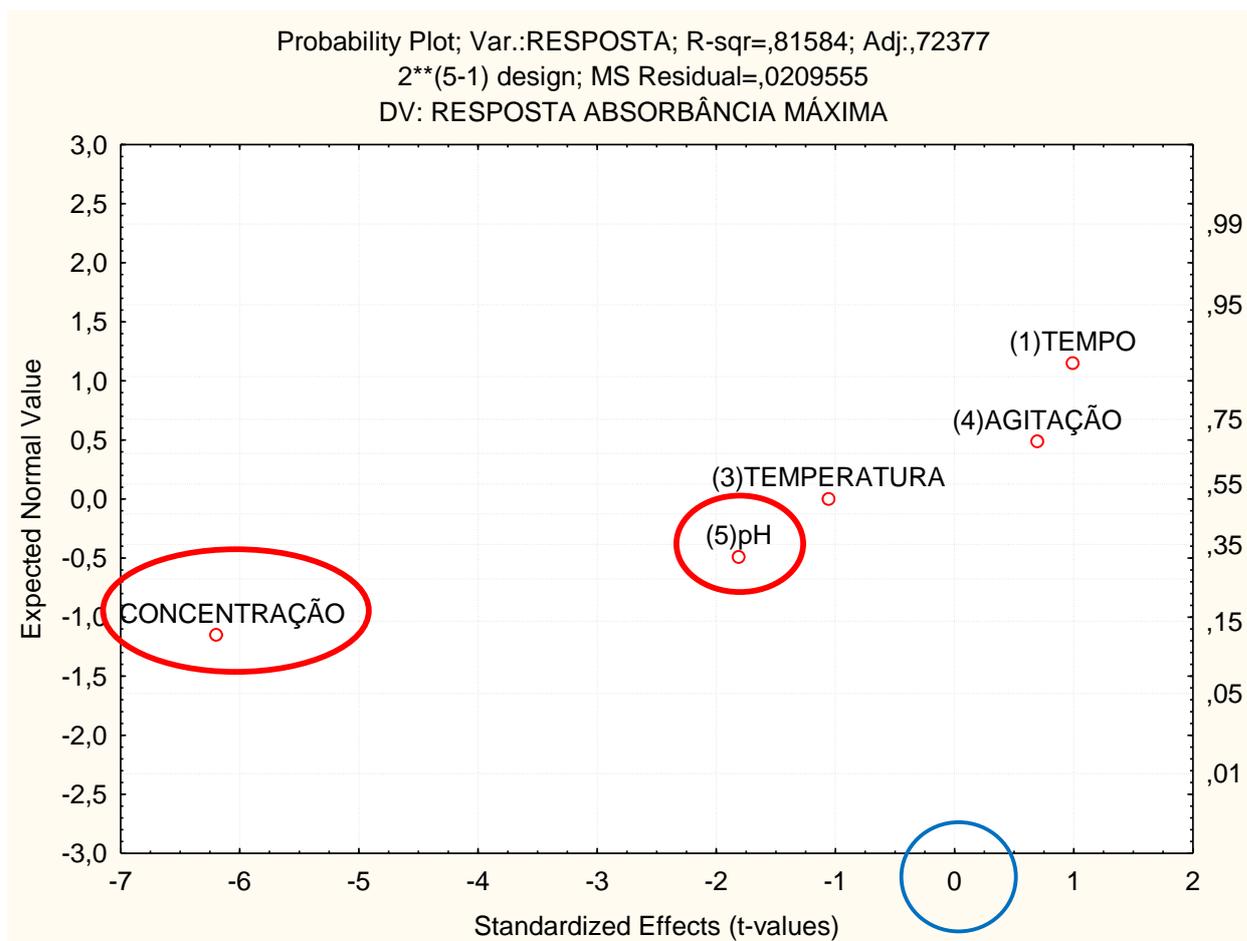


Figura 21. Gráfico de Probabilidade Normal das 16 sínteses de nanopartículas de ouro a partir do planejamento fatorial fracionado utilizando a EGCG como agente redutor. A variável resposta utilizada foi absorvância máxima.

A Figura 22 apresenta o gráfico de Pareto mostrando as variáveis que mais afetaram a síntese de nanopartículas de ouro com EGCG utilizando a absorvância máxima como resposta ($p < 0,1$). Assim como a primeira variável resposta analisada, as variáveis que ultrapassaram a linha vermelha e foram consideradas estatisticamente significativas são: **Concentração da EGCG e pH**. As demais variáveis podem ser desprezadas, uma vez que o efeito calculado pode ser negligenciado com 90% de confiança.

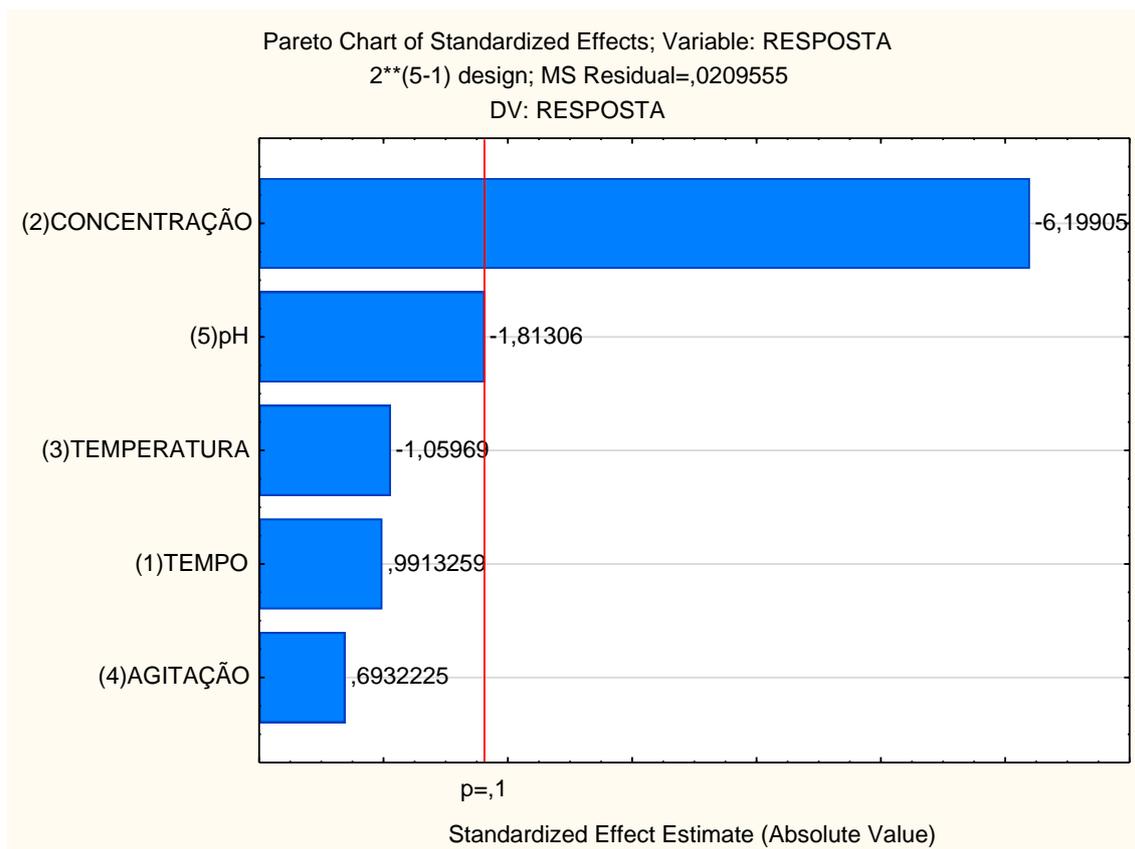


Figura 22. Gráfico de Pareto identificando as variáveis que foram significativas nos experimentos que utilizaram a absorbância máxima como resposta ($p < 0,1$).

4.2 Planejamento Fatorial Composto Central

Os parâmetros **concentração da EGCG e pH** foram significativos na etapa de triagem. Por conseguinte, foram selecionados para etapa de otimização utilizando o planejamento fatorial Composto Central.

Visando encontrar os valores ótimos de síntese para as duas variáveis selecionadas foi realizado um planejamento fatorial completo 3^2 com três pontos centrais. Pode-se verificar nas Tabelas 8 e 9, os níveis das variáveis estudadas, tendo como resposta o comprimento de onda máximo (lambda máximo), as condições experimentais e os resultados para cada ensaio.

Tabela 8. Intervalos de estudo das variáveis do planejamento fatorial composto central.

Variável	Intervalo de estudo		
	Baixo (-)	Central (0)	Alto (+)
EGCG (mg/mL)	0,05	0,1	1,0
pH	3	6,5	10

Tabela 9. Resultados do planejamento fatorial completo das sínteses de nanopartículas de ouro sintetizadas com a EGCG. A variável resposta utilizada foi o λ máximo.

Experimento	pH	Concentração (mg/mL)	λ máximo	
1	3	0,05	542	
2	3	0,1	527	
3	3	1,0	572	
4	6,5	0,05	533	
5	6,5	0,1	532	Ponto central
6	6,5	1,0	553	
7	10	0,05	536	
8	10	0,1	524	
9	10	1,0	548	
10	6,5	0,1	529	Ponto central
11	6,5	0,1	531	Ponto central

Pode-se observar que em todos os ensaios houve formação de nanopartículas de ouro com EGCG, já que o λ máximo variou entre 524 e 572 nm. A Figura 23 mostra os espectros de absorção no UV-Vis nos diferentes níveis de pH. Observa-se que no pH 3 a concentração da EGCG de 0,1 mg/mL foi a única que apresentou a banda plasmônica de ressonância bem definida e o maior volume de nanopartículas sintetizadas (Figura 23A). Já no pH 6,5 as concentrações de EGCG de 0,05 e 0,1 mg/mL apresentaram λ máximo muito parecidos, porém na concentração de EGCG de 0,05 mg/mL o volume de nanopartículas sintetizadas foi bem menor. Nota-se ainda que na concentração de 1,0 mg/mL ocorreu mudança na forma da banda plasmônica de ressonância e houve um sutil deslocamento da curva para direita o que indica alteração no tamanho das

nanopartículas (Figura 23B). No pH 10 os resultados se mostraram bastante semelhantes ao pH 3 (Figura 23C).

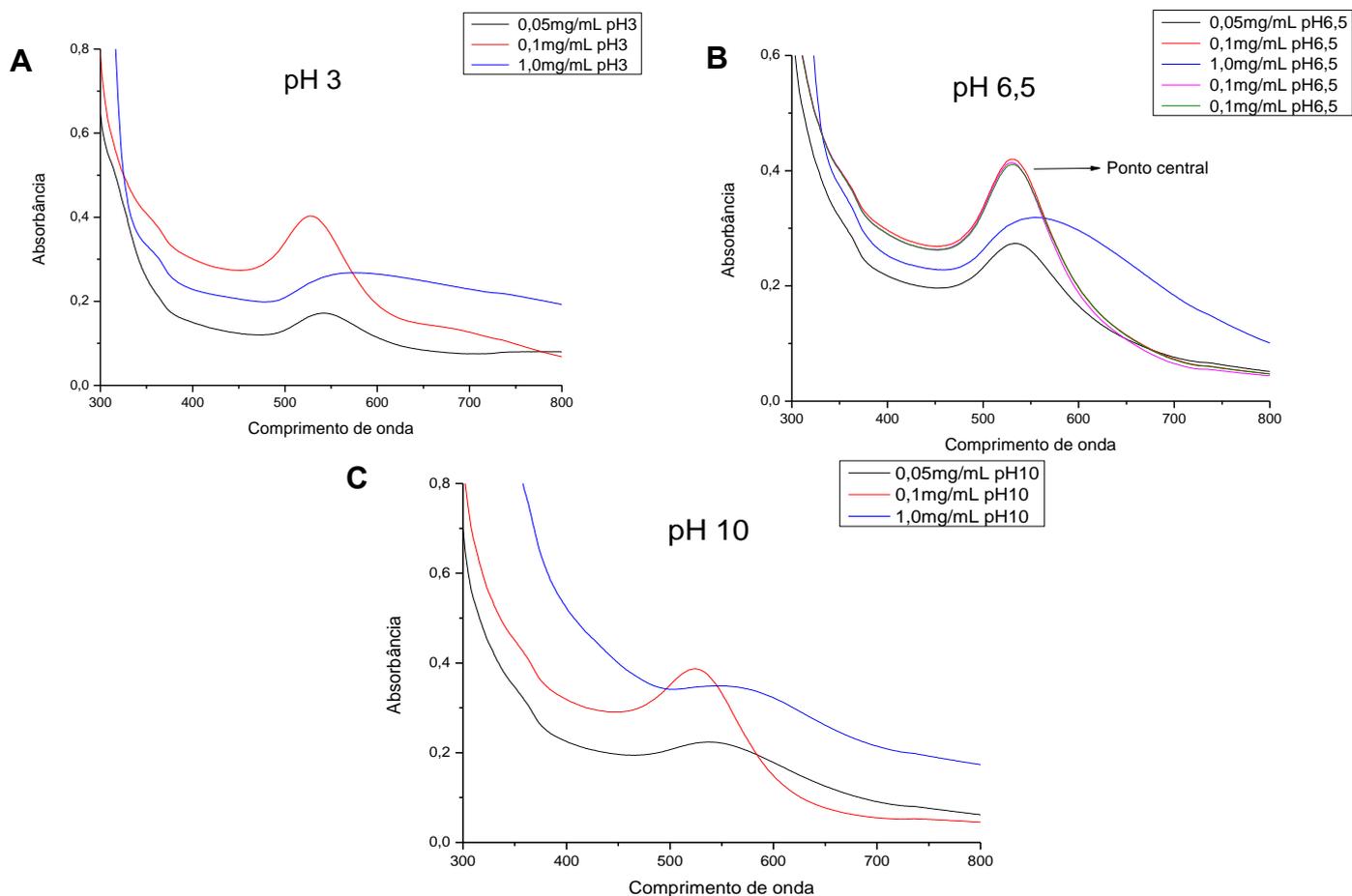


Figura 23. Espectroscopia de absorção no UV-Vis com a comparação dos diferentes pH (A – pH 3; B – pH 6,5; C – pH 10).

A comparação entre as diferentes concentrações de EGCG estão apresentadas na Figura 24. Ao analisar o gráfico da concentração de 0,05 mg/mL verifica-se que, à medida que o pH aumentou, ocorreu diminuição no volume de nanopartículas sintetizadas e alargamento das bandas de ressonância plasmônica (Figura 24A). Para a concentração de 0,1 mg/mL, os resultados foram parecidos em relação ao λ máximo, sendo o maior volume de nanopartículas encontrado no pH 6,5 (Figura 24B). Já na concentração de 1,0 mg/mL, nenhum dos valores de pH apresentou banda de ressonância plasmônica bem definida (Figura 24C).

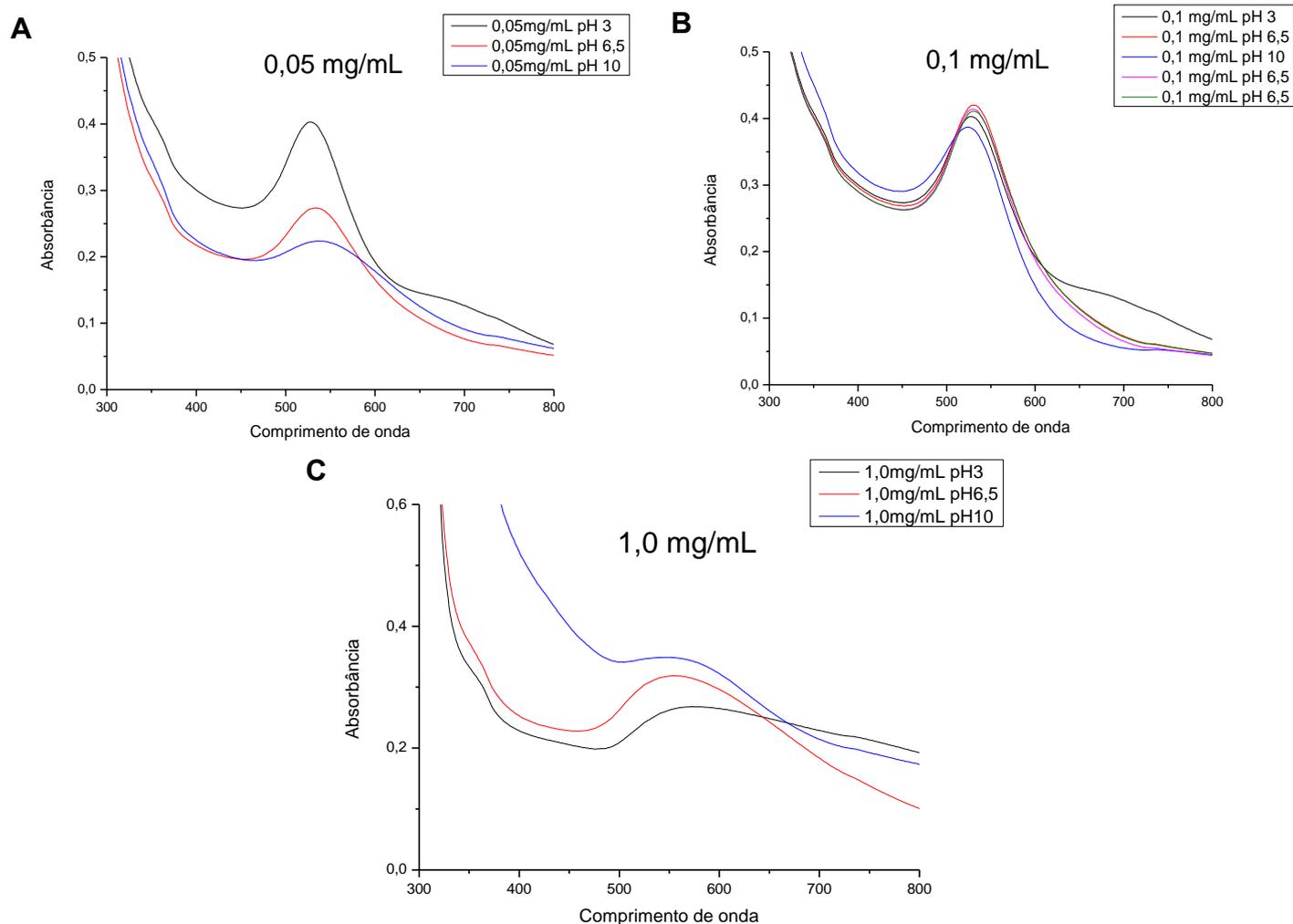


Figura 24. Espectroscopia de absorção no UV/Vis. Comparação das diferentes concentrações de EGCG (A – 0,05 mg/mL; B – 0,1 mg/mL; C – 1,0 mg/mL).

Estes resultados mostram que variações no pH interferem na concentração de nanopartículas sintetizadas; apenas na concentração de 0,1 mg/mL a diferença não é muito considerável. E variações na concentração da EGCG modificam o tamanho da partícula, principalmente na concentração de 1,0 mg/mL onde essas mudanças foram mais evidentes.

Outra forma de se observar as condições ideais de síntese e seus efeitos é a partir do gráfico de Superfície de Resposta tridimensional gerado a partir do modelo ajustado da Figura 25 e do gráfico de Contorno bidimensional gerado a partir do modelo ajustado da Figura 26. No gráfico de contorno é possível ver qual a combinação adequada dos níveis das variáveis para obtenção da faixa

ideal, tanto da concentração da EGCG quanto do pH. No gráfico de Superfície de Resposta percebe-se a influência mais predominante de cada variável na resposta. É possível observar que em valores de pH mais altos tem-se os menores valores de absorvância máxima. Já em valores de pH baixos, uma absorvância máxima intermediária é observada. Os maiores valores de absorvância máxima ocorrem com valores de pH intermediários e valores de concentração da EGCG baixos. É possível notar que a melhor condição de operação para a resposta estudada encontra-se entre 6 e 8 para o pH e entre 0 e 0,6 mg/mL para a concentração da EGCG.

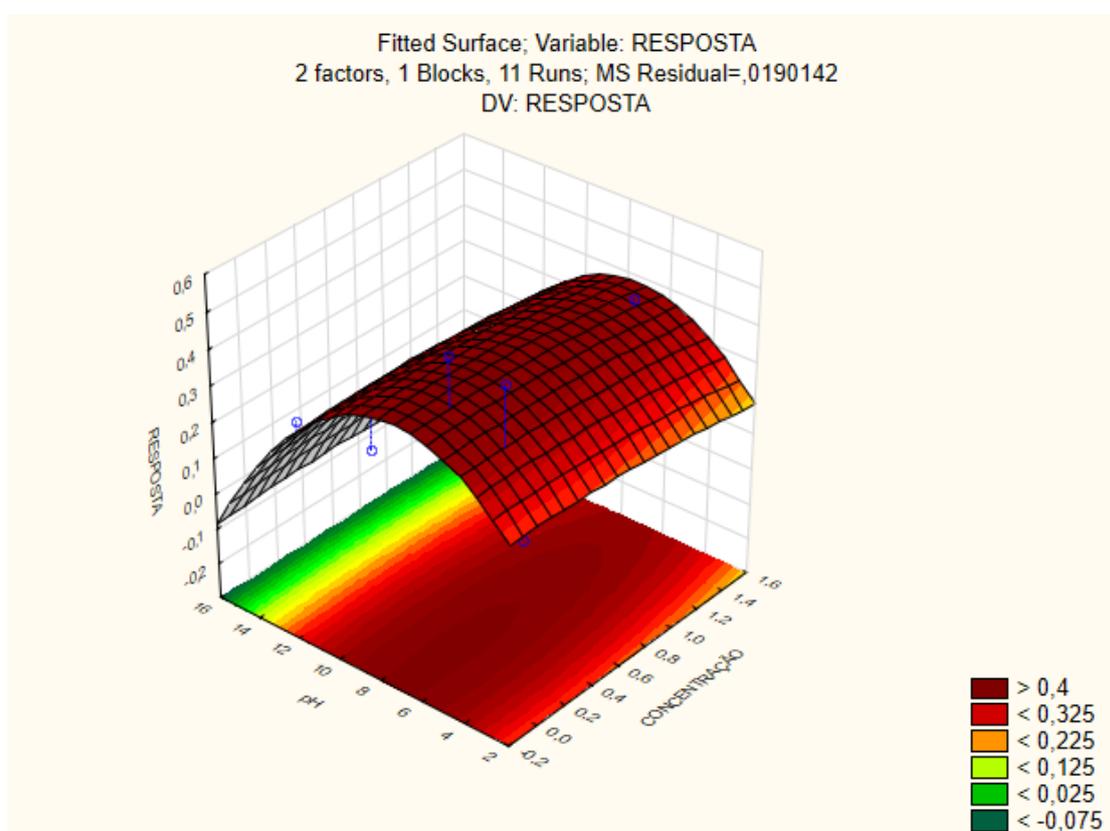


Figura 25. Gráfico de Superfície de Resposta apresentando a interação das variáveis pH e concentração da EGCG na absorvância máxima.

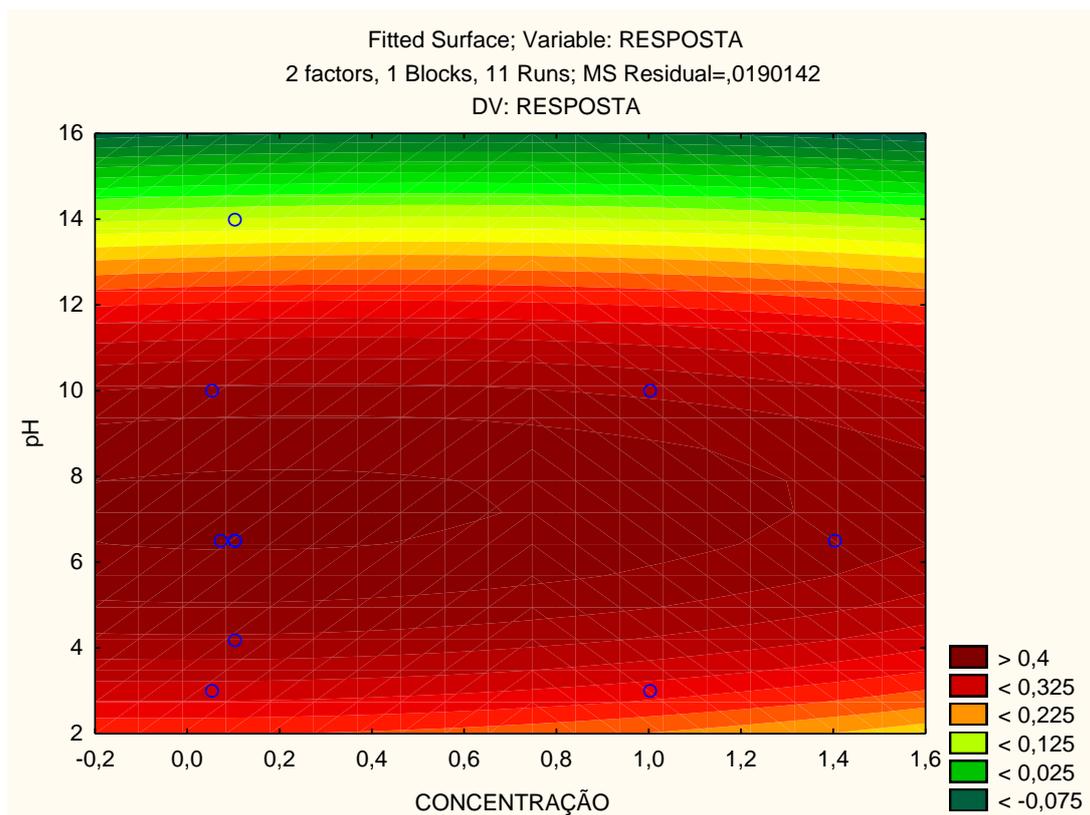


Figura 26. Gráfico de Contorno apresentando a influência das variáveis pH e concentração de EGCG na absorbância máxima.

Sendo assim, utilizando-se o método de mínimos quadrados e a soma quadrática das respostas dos ensaios, foi construído o modelo quadrático ajustado para a superfície de resposta dos parâmetros estudados, conforme a equação:

$$z = 0,08744 - 0,00943*x - 0,0238*x^2 + 0,09536*y - 0,00662*y^2 + 0,00241*x*y$$

Onde: z= absorbância máxima (variável dependente);

x= concentração da EGCG e

y = pH (variáveis independentes).

Com base em todas as análises estatísticas, o software nos forneceu as condições ideais de síntese para obter o melhor resultado de absorbância máxima. A Tabela 10 mostra os valores ótimos para concentração da EGCG e pH e o valor previsto da variável resposta absorbância máxima.

Tabela 10. Condições ótimas e valor previsto da variável resposta fornecidas pelo programa Statistica Software versão 14.12.0 para o melhor rendimento de síntese de AuNPs-EGCG.

VARIÁVEL	VALORES ÓTIMOS
CONCENTRAÇÃO	0,168739
pH	7,231858
ABSORBÂNCIA MÁXIMA	0,4314627

4.3 Caracterização estrutural e físico-química das nanopartículas de ouro

4.3.1 Ressonância plasmônica de superfície localizada

A partir dos valores ótimos para cada variável oferecidos pelo programa estatístico, realizou-se o ensaio nestas exatas condições: pH 7,23; concentração da EGCG 0,17 mg/mL; tempo 10 min; agitação 600 rpm; temperatura 25 °C. Os resultados deste ensaio estão apresentados na Figura 27.

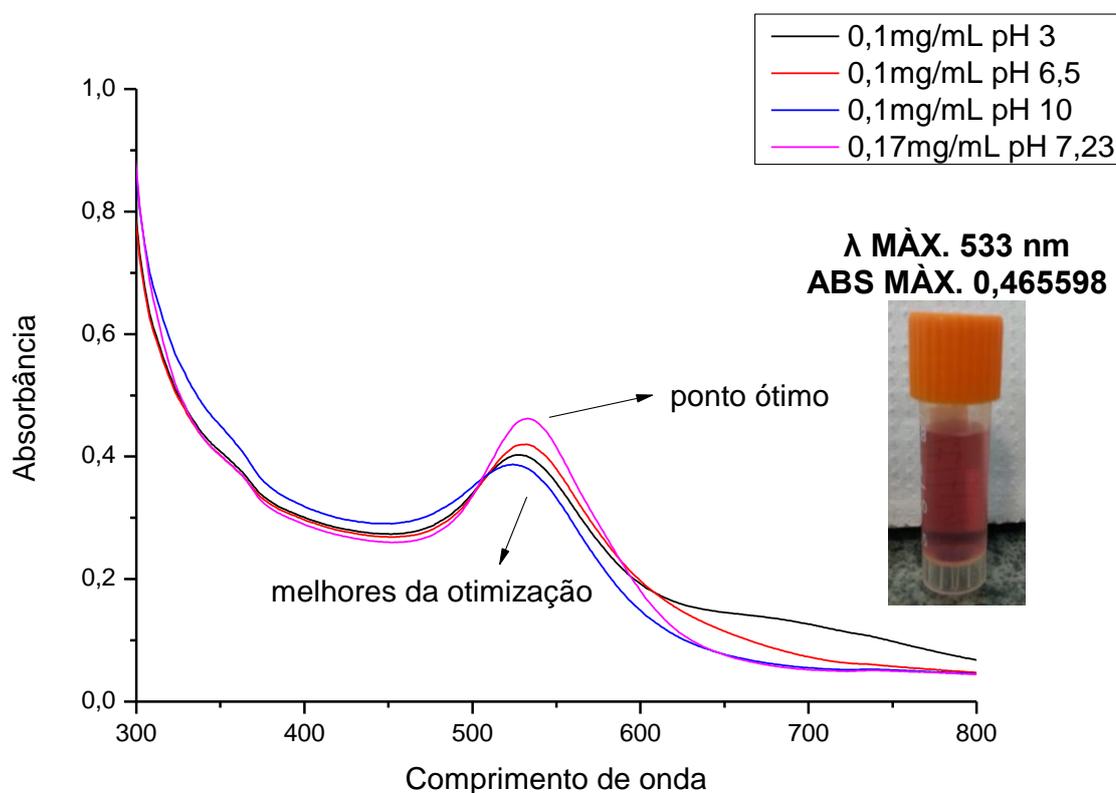


Figura 27. Espectroscopia de absorção no UV-Vis das melhores três sínteses de nanopartículas de ouro com EGCG da otimização (preto, vermelho e azul) e da síntese nas condições ótimas (rosa).

O espectro de absorção no UV-Vis mostrou que as nanopartículas de ouro sintetizadas com EGCG nas condições ótimas (pH 7,23; concentração da EGCG 0,17 mg/mL; tempo 10 min; agitação 600 rpm; temperatura 25 °C) apresentou pico de absorção de 533 nm, absorvância máxima de 0,465598 e banda plasmônica de ressonância bem definida. SEPÚLVEDA e colaboradores (2009) corroboraram com nossos resultados ao afirmar que a posição espectral LSPR é altamente dependente da composição, tamanho ou forma das nanopartículas.

Nota-se que estes resultados confirmaram serem estas as melhores condições de síntese de nanopartículas de ouro utilizando a EGCG como agente redutor e estabilizador. Considerando esta a melhor rota de síntese, a caracterização estrutural e físico-química dessas AuNPs-EGCG foi realizada.

4.3.2 Detecção de grupamentos químicos

A fim de investigar as possíveis interações entre as AuNPs e a EGCG foram realizadas análises de FT-IR. A Figura 28 apresenta os espectros de FT-IR de duas amostras, uma da EGCG pura e outra das nanopartículas metálicas reduzidas com a EGCG.

Uma análise comparativa entre os espectros na região do infravermelho indica a presença das principais bandas, com algumas pequenas distinções oriundas do processo de coordenação. Não é esperado que o efeito da temperatura de síntese possa ter influência sobre a variação dos espectros, já que a síntese foi realizada à temperatura ambiente. Uma banda característica referente à vibração de hidroxila é observada no espectro da EGCG perto de 3350 cm^{-1} (Figura 28). Essa banda alargou significativamente no espectro pós-síntese, resultante do envolvimento dos grupos O-H na redução dos íons Au, indicando a destruição parcial das ligações de hidrogênio das moléculas de EGCG (ZHU et al., 2012). Os espectros de EGCG e AuNPs-EGCG apresentaram faixa típica de ésteres C=O em cerca de 1700 cm^{-1} como foi relatado por RADHAKRISHNAN e colaboradores (2016). Além disso, existe um perfil de banda semelhante da banda centrada em 1610 cm^{-1} referente ao alongamento do quadrante do anel aromático (ROBB et al., 2002). Picos de vibração de flexão de O-H centrada com

absorção a 1.316 cm^{-1} também foram detectados em ambas as amostras. O pico de absorção de amortecimento em 1200 cm^{-1} (atribuído ao O-H aromático) indica que a redução dos íons Au pode ser acoplada a grupos ortoquinona conforme descrito por PARK e colaboradores (2010). Finalmente, perto de 1095 cm^{-1} observa-se outra faixa devido a um estiramento de anel aromático, que também é observado em outras catequinas (ROBB et al., 2002).

É válido lembrar que alguns deslocamentos encontrados em algumas bandas de absorção podem ser indicativo da coordenação da EGCG ao íon metálico via oxigênio carbonílico. Os dados acima confirmam a redutibilidade da EGCG e indica que as hidroxilas fenólicas foram oxidadas para ortoquinonas.

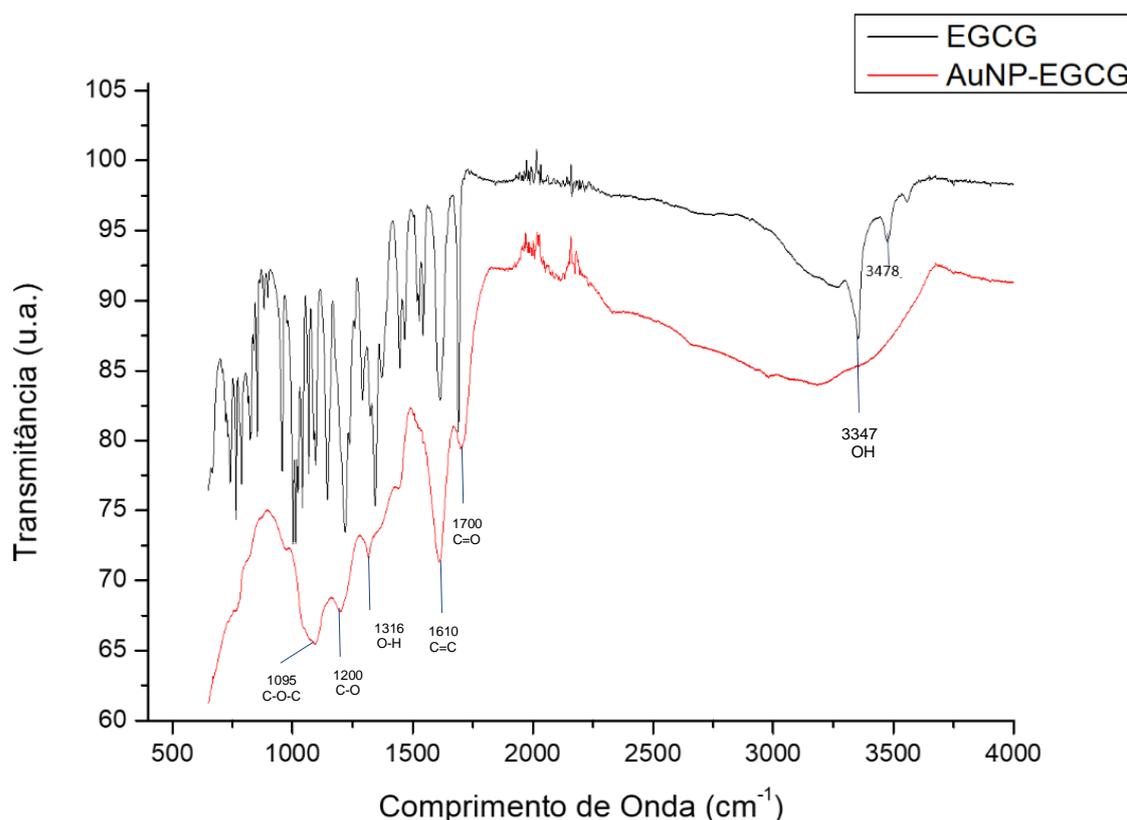


Figura 28. Espectro de Infravermelho da EGCG (preto) e das nanopartículas de ouro com EGCG (vermelho).

Diferentemente do espectro infravermelho, o espectro Raman pode identificar o grupo químico estabilizador sem captar os demais grupos presentes no meio. O

espectro Raman obtido para as AuNPs-EGCG apresentou intensos modos de estiramento com comprimentos de onda próximos a 1250 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} (Figura 29). Estes comprimentos de onda estão relacionados aos estiramentos de grupos simétricos e assimétricos dos carboxilatos, respectivamente (PRADO et al., 2015). Estes grupos de ácidos carboxílicos (COO^{-1}) são conhecidos por formar complexos com a superfície do ouro que estabilizam a nanopartícula após desprotonação (MAK et al., 2013). Isso sugere que a EGCG foi efetivamente ligada à superfície do ouro. A EGCG é constituída por abundantes hidroxilas ortofenólicas. Os complexos EGCG-Au(III) são estabilizados com o ligante bidentado que forma um anel de cinco membros com íons Au(III). Após a reação de quelação, os íons Au(III) são prontamente reduzidos a átomos de Au^0 , acompanhados de oxidação da EGCG. As AuNPs são estabilizadas pela interação entre a superfície do átomo de Au^0 e as hidroxilas e quinonas da EGCG, fornecendo um obstáculo estérico eficiente para evitar a agregação das partículas (TSAI et al., 2016).

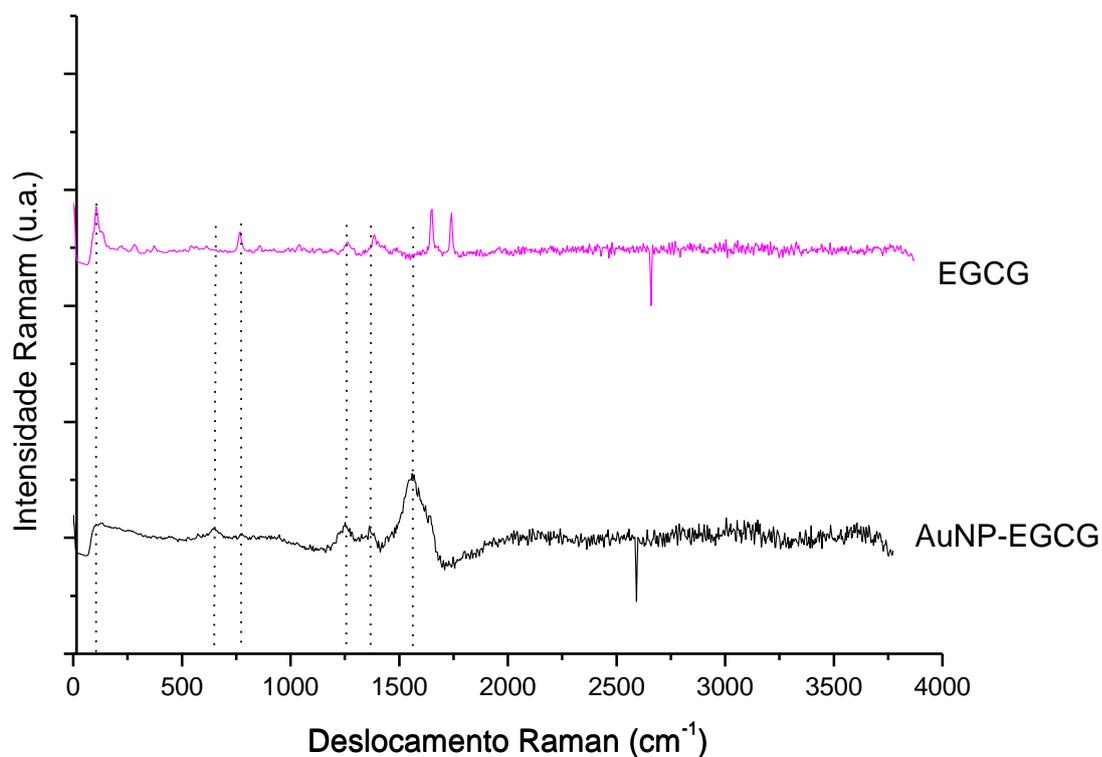


Figura 29. Espectro Raman de nanopartículas de ouro sintetizadas com EGCG.

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados obtidos para o potencial zeta; o diâmetro médio e razão de aspecto (Ra) das nanopartículas de ouro com EGCG obtidos pelas imagens de MET; e a concentração de Au⁰ da suspensão coloidal obtida por ICP-MS.

4.3.3 Análise da estabilidade

Para nanopartículas pequenas em líquido, a prática comum é determinar a carga superficial das partículas, em algum lugar na camada difusa. Esta localização, relacionada ao movimento das partículas em líquido, é chamada de plano de escorregamento ou cisalhamento. O potencial medido neste plano, o potencial zeta é um parâmetro muito importante para coloides (INC, 2008). Seu valor é intimamente relacionado com a estabilidade da suspensão e a morfologia da superfície das nanopartículas. Esta medida envolve não só as partículas, mas também o seu ambiente, por exemplo, pH, força iônica, e até mesmo os tipos de íons na suspensão (XU, 2008). O valor de potencial zeta obtido, -34,89 mV, fornece duas informações distintas: como a medida tem um valor negativo, pode-se afirmar que as nanopartículas de ouro sintetizadas, quando em solução aquosa, têm carga negativa; além disso como o valor apresentado é superior a 30 mV pode-se afirmar que a solução coloidal é bastante estável, não ocorrendo facilmente a agregação das partículas (CARREIRA, 2008). Vale lembrar que valores acima de ± 30 mV são indicativos de cargas bastante catiônicas ou aniônicas, cuja repulsão promove estabilidade. Conseqüentemente, a agregação de partículas é menos provável de ocorrer devido à repulsão eletrostática (YEH et al., 2012). O valor do potencial zeta indica que as moléculas presentes na superfície das AuNPs são compostas em sua maioria de grupos com carga negativa responsáveis pela boa estabilidade das nanopartículas. Isso pode ser atribuído à presença da catequina EGCG (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013).

4.3.4 Determinação de rendimento da síntese

A análise de ICP-MS mostrou que a concentração de ouro reduzida com a síntese verde foi de 29,05 mg/L. Quando se compara a eficiência da síntese verde com a redução pelo citrato de sódio, nota-se que uma maior concentração (mg/L) de nanopartículas foi formada utilizando o material vegetal. Em estudo

anterior do grupo, a síntese com citrato de sódio levou a formação de 20,6 mg/L de ouro metálico (MILANEZE et al., 2016).

Tabela 11. Resultados obtidos para a carga de superfície obtida pelo potencial Zeta; para o diâmetro médio e razão de aspecto (Ra) das nanopartículas com EGCG; e para a concentração de Au⁰ obtida por ICP-MS.

Amostra	Potencial Zeta (mV)	Diâmetro médio (nm)	Ra	Concentração de Au⁰ (mg/L)
0,17 mg/mL pH 7,23	-34,89 mV	14,54 nm ± 2,61	1,10	29,05 mg/L

4.3.5 Determinação da forma, tamanho e dispersão

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram capturadas em diferentes aumentos para estudar a distribuição de tamanho e forma das AuNPs-EGCG. Para adquirir uma boa estatística em relação ao valor médio do diâmetro das nanopartículas, foram contadas e medidas 500 nanopartículas, utilizando o software Image J (ANEXO II). O valor médio do diâmetro das nanopartículas foi 14,54 nm. A curva de distribuição Gaussiana mostrou um desvio padrão de $\pm 2,61$ nm (Figura 30). A menor nanopartícula apresentou 7,88 nm enquanto a maior nanopartícula apresentou 21,46 nm. A grande maioria (72,4%) das nanopartículas estavam na faixa entre 13 a 16 nm. A variação nos tamanhos das nanopartículas e as formas irregulares que por vezes adquiriram está relacionada com a proporção molar do Au:EGCG. A causa provável para essa dispersão de tamanhos das AuNPs pode estar relacionada com o fato da quantidade de EGCG não ser suficiente para revestir as partículas de ouro na totalidade, o que pode ter provocado o crescimento e/ou agregação de nanopartículas de ouro, surgindo algumas partículas com formas mais irregulares (Figuras 31 e 32). Através da MET obtém-se o diâmetro do núcleo metálico, visto que a EGCG, que estabiliza a nanopartículas, não tem a capacidade de refletir os elétrons, logo a imagem obtida não identifica a EGCG. BHATTACHARYA e colaboradores (2015) mostraram que a quantidade de internalização e a atividade das nanopartículas são inversamente proporcionais ao tamanho das partículas. Desta forma, o tamanho pequeno das nanopartículas

sintetizadas nesta pesquisa, facilita a internalização e, portanto, melhora seus efeitos. Estudos de síntese de AuNPs com EGCG apresentaram tamanho médio das partículas de 45 nm (MUKHERJEE et al., 2015); entre 64,7 e 127,4 nm (YEH et al., 2014); 40 nm (KHOOBCHANDANI et al., 2016); 25,5 nm (SANNA et al., 2014); e entre 50 e 500 nm (YEH et al., 2012). Outra questão a ser notada é que o tamanho das nanopartículas utilizadas em um sistema de entrega deve ser grande o suficiente para evitar o seu rápido vazamento pelos capilares de sangue, mas pequenas o suficiente para escapar da captura por macrófagos do fígado ou baço, por exemplo. O tamanho da sinusoide no baço e fenestra das células de Kupffer no fígado varia de 150 a 200 nm, e o tamanho das junções gap entre células endoteliais da vasculatura tumoral com vazamento pode variar de 50 a 600 nm. Consequentemente, nanopartículas de até 50 nm são ideais para atingir os tecidos passando por estas duas estruturas vasculares (YEH et al., 2012).

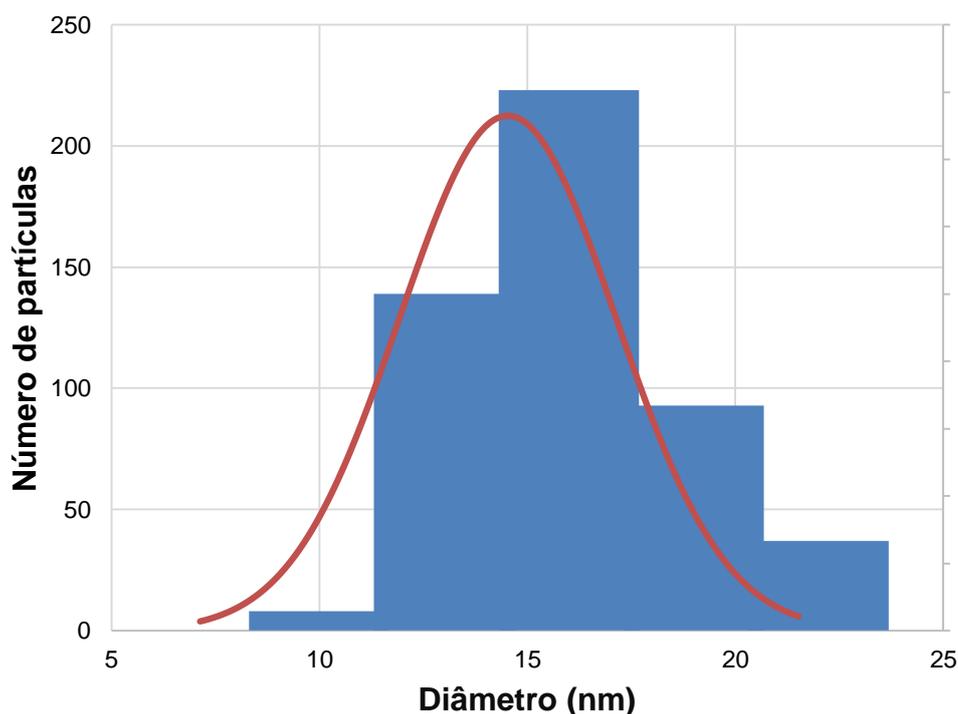


Figura 30. Histograma de distribuição de tamanho.

Como as AuNPs-EGCG não são totalmente esféricas, a razão de aspecto (R_a) foi determinada através da medição do diâmetro maior (DM) e do seu diâmetro perpendicular, sendo considerado como diâmetro menor (Dm) para cada

nanopartículas metálica (ANEXO III). A razão de aspecto é calculada pela seguinte equação:

$$Ra = \frac{DM}{Dm}$$

A razão de aspecto calculada para 500 AuNPs-EGCG foi de 1,10. Lembrando que $Ra=1$ equivale a NPs perfeitamente esféricas. Vale ressaltar que a mudança na proporção das medidas de DM e Dm está relacionada à proporção de tamanho de uma face do cristal. Um aumento da razão de aspecto desloca a banda de absorção máxima para comprimentos de onda mais longos (HORIKOSHI; SERPONE, 2013).

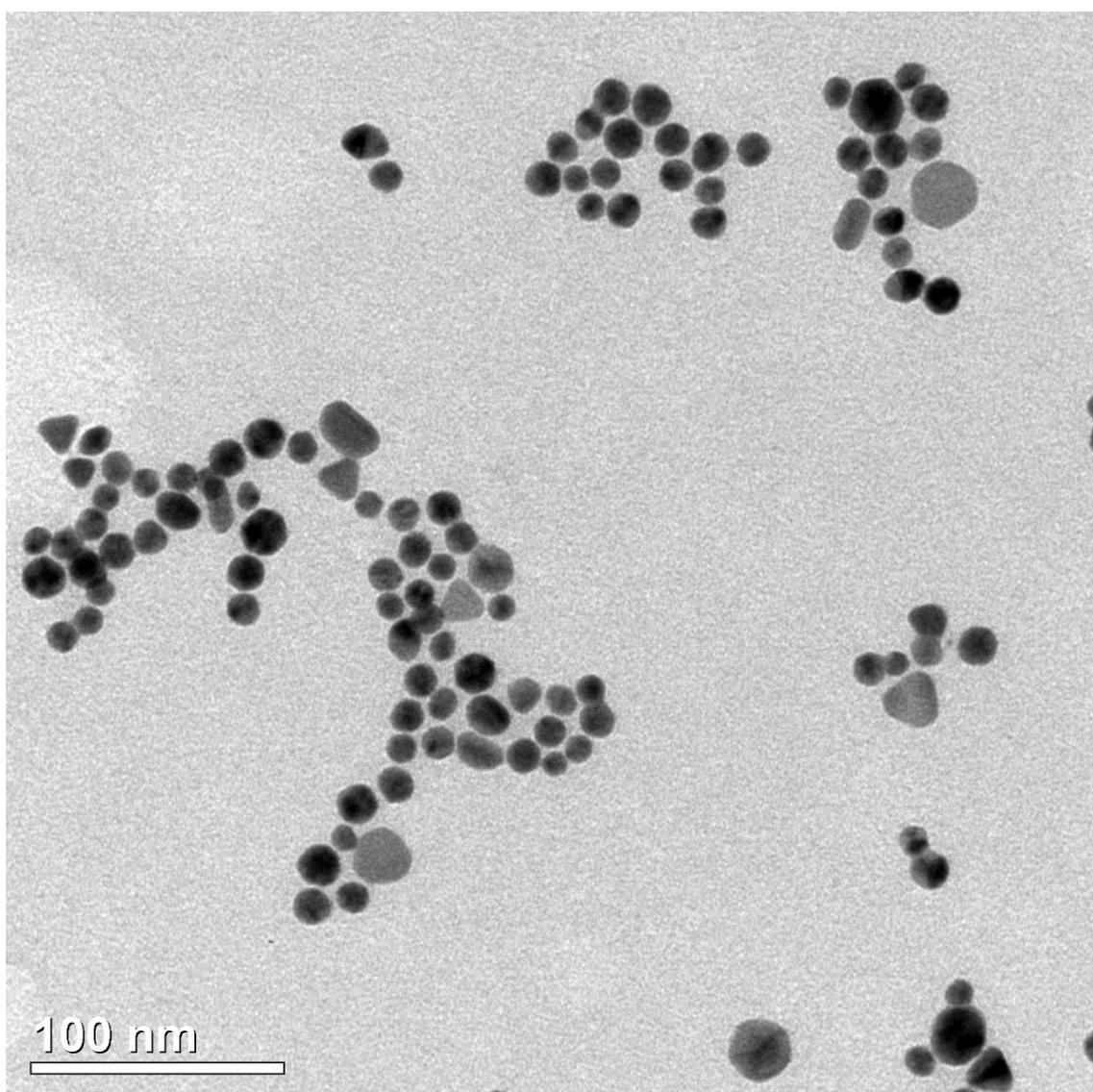


Figura 31. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de ouro sintetizadas com EGCG.

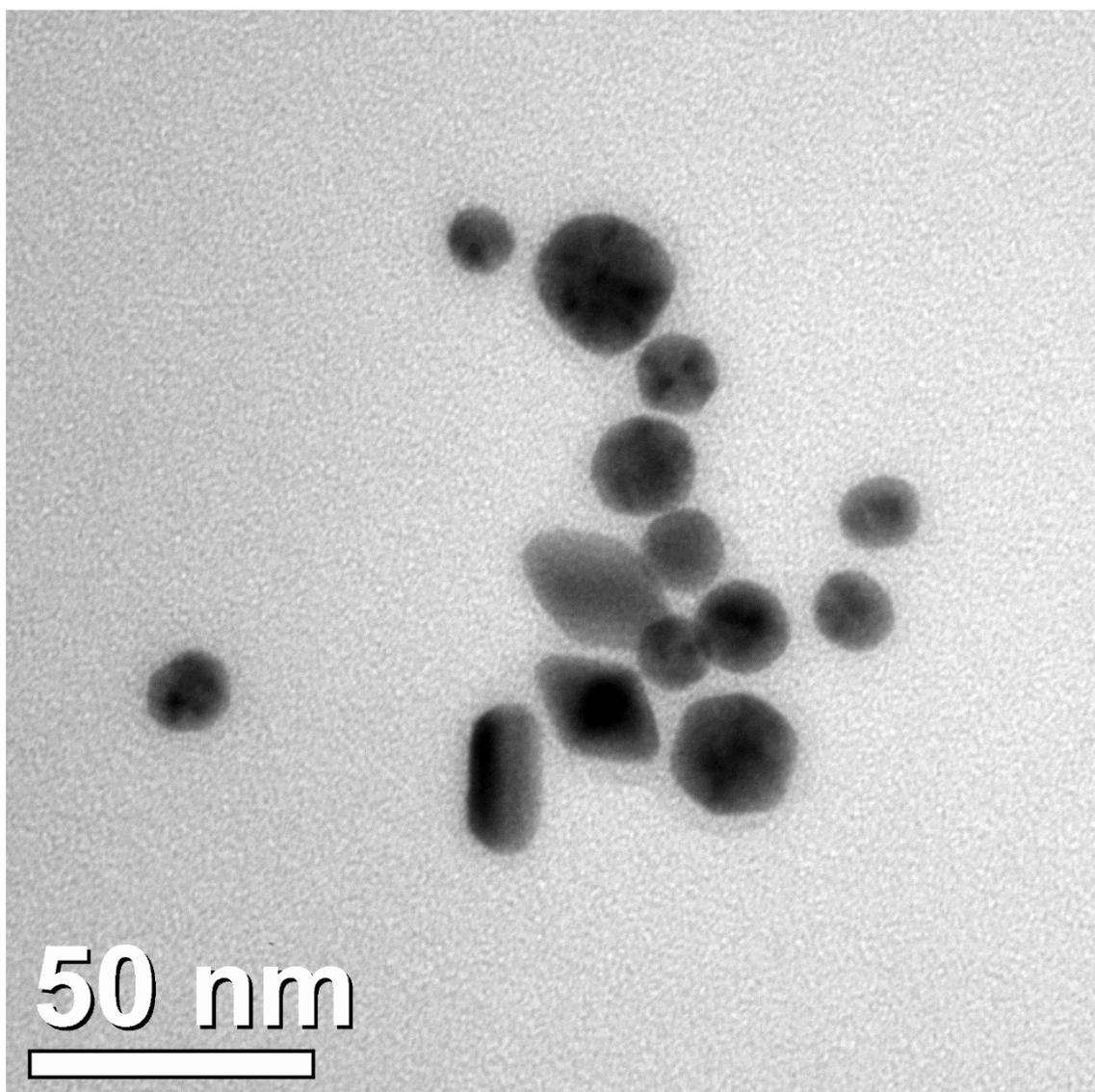


Figura 32. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão de nanopartículas de ouro sintetizadas com EGCG.

Para a formação de nanopartículas com distribuição de tamanho uniforme é necessário que todos os núcleos sejam formados ao mesmo tempo. Uma vez formados sob as mesmas condições os núcleos apresentam tamanhos muito próximos e crescem de maneira uniforme. Além disso, para preparar nanopartículas monodispersas, é imperativo que as nanopartículas cresçam muito devagar após a rápida geração dos clusters (CAMARGO et al., 2015). Neste estudo, conseguiu-se nanopartículas uniformes em tamanho. É evidenciado também o acoplamento da EGCG nas nanopartículas podendo ser confirmado com os dados de FT-IR e espectroscopia Raman.

As nanopartículas de ouro estabilizadas com EGCG apresentaram excelente estabilidade em 4°C, não havendo sinais de agregação após mais de seis meses estocadas. A análise do espectro no UV-Vis da Figura 33 comprova isso, onde os picos de absorção máxima permaneceram quase inalterados no período de 6 meses.

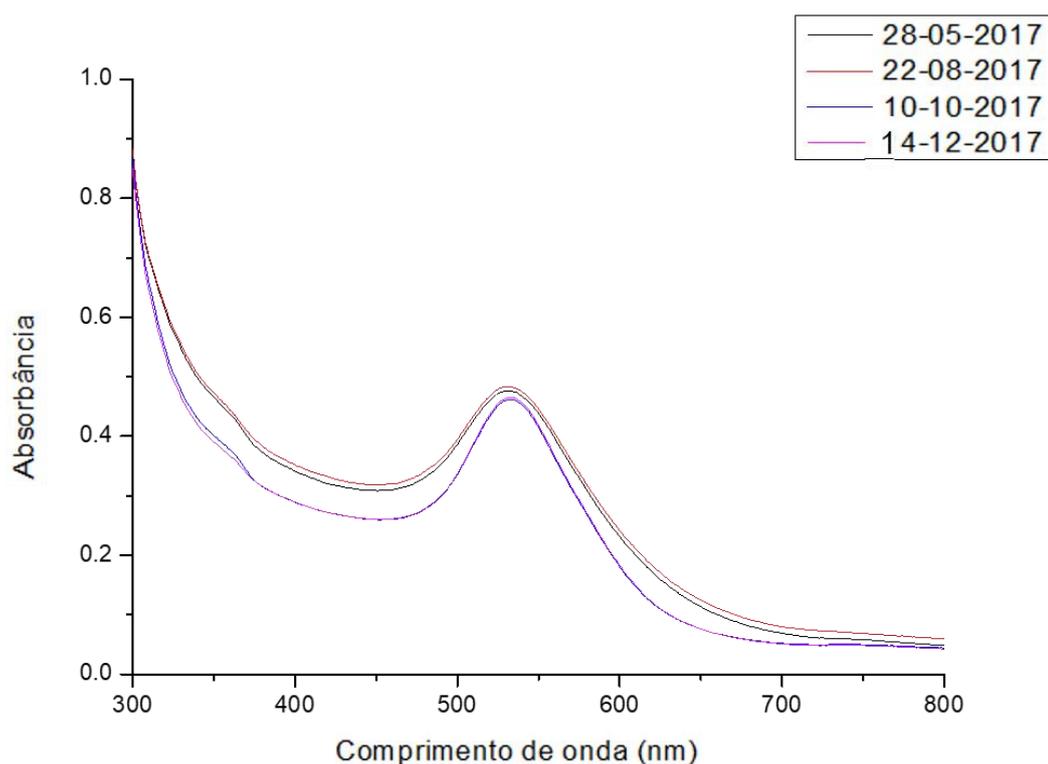


Figura 33. Espectroscopia de absorção no UV-Vis das AuNPs-EGCG, sintetizadas na condição ótima, em função do tempo de estocagem.

4.4 Avaliação da citotoxicidade celular

Os potenciais efeitos citotóxicos das AuNPs-EGCG foram avaliados em um modelo celular de macrófagos de camundongos, linhagem J774A.1. As células foram expostas a diversas concentrações das AuNPs-EGCG (0 a 240 mg/L) durante 48 horas. No final da exposição, a viabilidade foi avaliada.

O grau de citotoxicidade foi analisado considerando o protocolo padronizado ISO 10993-5 (2009), que considera uma substância citotóxica quando a viabilidade celular for <70% em relação ao controle não tratado, ou seja, o tratamento com

AuNP-EGCG poderia causar a morte de no máximo 30% das células para ser considerado não citotóxico.

As concentrações acima de 80 mg/L de AuNPs-EGCG contra macrófagos de camundongo foram citotóxicas para as células, sendo observada uma sobrevivência inferior a 70%. A concentração de 60 mg/L foi considerada não citotóxica, pois acima de 70% das células estavam viáveis (82,8%). Na concentração de 120 mg/L de AuNPs-EGCG obteve-se a taxa de 58% de sobrevivência das células. Enquanto que, a concentração inibitória a nível de efeito de 50% de sobrevivência das células (IC50) para AuNPs-EGCG foi de 156,9 mg/L. Os tratamentos das células com as concentrações 7,5; 15 e 30 mg/L de AuNPs-EGCG não apresentaram nenhuma citotoxicidade, pois, após o tratamento, foi observada a sobrevivência de 100% das células (Figura 34). Dessa forma, podemos concluir que nosso coloide não é citotóxico, já que sua concentração final é de 29,07 mg/L.

Através do teste de citotoxicidade foi possível observar que em doses mais altas (≥ 120 mg/L) as AuNPs-EGCG apresentaram atividade citotóxica, causando a morte de mais de 30% das células J774A.1. Contudo, em doses menores (≤ 30 mg/L), não apresentou efeito citotóxico. Estes resultados são concordantes com os obtidos por KHOOBCHANDANI e colaboradores (2016) com linhagens de células endoteliais humanas. Este estudo avaliou o efeito de AuNPs-EGCG de 40 nm na viabilidade celular, utilizando as concentrações de 20 e 40 mg/L de AuNPs-EGCG em 24 h de exposição. As AuNPs-EGCG mostraram 36% de inibição da proliferação das células endoteliais na concentração mais alta, mostrando que, independentemente do tamanho e do tempo de incubação, as AuNPs-EGCG também não foram tóxicas para as células.

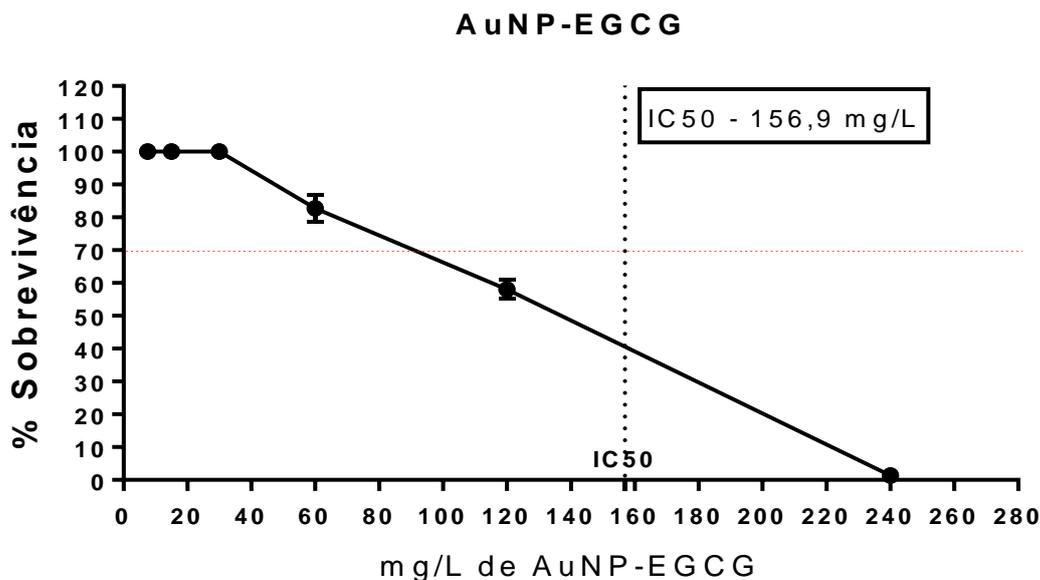


Figura 34. Avaliação do efeito citotóxico das AuNPs-EGCG em macrófagos de camundongos da linhagem celular J774A.1. As células foram utilizadas a uma concentração de 5×10^4 células/mL e incubadas durante 48 horas a diferentes concentrações de NPs.

Um estudo desenvolvido por CHEN e colaboradores (2014) pesquisou a citotoxicidade de AuNPs-EGCG com diâmetros que variaram de 64,7 a 127,4 nm em células de rim de macaco verde africano. Estas células foram expostas as concentrações de 1,25, 2,5, 5, 10 e 20 mg/L de NPs durante 24 horas e a viabilidade das células foi de 103.47%, 107.37%, 96.12%, 83.63% e 48.91% respectivamente, mostrando um efeito citotóxico relativamente fraco. Apesar do tamanho das AuNPs e da linhagem celular ser diferente, o revestimento de EGCG parece não estar associado a fenômenos de citotoxicidade.

MUKHERJEE e colaboradores (2015) avaliaram a citotoxicidade de AuNPs-EGCG (de 45 nm) em hepatócitos normais de ratos e em células tumorais (de ratos e de carcinoma epitelial mamário humano). Estas células foram incubadas em duas concentrações de NPs (2 e 20 mg/L) e os ensaios realizados após 24 horas de exposição. Os autores observaram que houve um diferencial claro do efeito citotóxico entre os hepatócitos normais e as células tumorais. Os resultados revelaram que houve uma diminuição acentuada na viabilidade das células tumorais em uma dose dependente. No entanto, no tratamento de

hepatócitos normais, com diferentes doses de NPs, não apresentou mudanças significativas prejudiciais na viabilidade celular em relação a controle.

Outro estudo avaliou a citotoxicidade de AuNPs-EGCG em células normais de rim de macaco verde africano após 48h de exposição. A taxa de sobrevivência das células permaneceu praticamente inalterada na presença das NPs nas concentrações de 0,5, 1 e 2 mg/L em relação ao controle. A concentração inibitória a nível de efeito de 50% de sobrevivência das células (IC50) foi de 13,67 mg/L (HSIEH et al., 2011).

Pode-se notar, com base na literatura, que nos estudos de citotoxicidade *in vitro* de AuNPs-EGCG são utilizadas diferentes linhagens celulares (humanas ou de modelos animais), diferentes tempos de incubação das células, concentrações e métodos de avaliação diferentes. Esta diversidade de condições experimentais torna difícil a análise comparativa dos resultados dos diferentes estudos já realizados.

5 CONCLUSÕES

- A síntese de nanopartículas de ouro utilizando o polifenol EGCG foi investigada com sucesso e proposto um método simples, otimizado, reprodutível, de baixo custo e não tóxico.
- AuNPs-EGCG foram produzidas, através de síntese verde por simples mistura de sal de ouro com solução aquosa de EGCG à temperatura ambiente.
- A EGCG desempenhou duplo papel de transformar o sal de ouro em nanopartículas correspondentes (através de redução química) e também como encapsulante efetivo em torno das nanopartículas fornecendo ótima estabilidade *in vitro*.
- AuNPs-EGCG apresentam grande potencial para aplicação médica, pois a sua estabilidade e baixa toxicidade oferecem possibilidades para mais estudos.

REFERÊNCIAS

ABD EL-AZIZ, M.; BADR, Y.; MAHMOUD, M. A. Biosynthesis of Gold Nanoparticles Using *Pseudomonas aeruginosa*. **AIP Conference Proceedings**, v. 888, p. 177–181, 2007.

AHMAD, R. et al. Preventive role of green tea catechins from obesity and related disorders especially hypercholesterolemia and hyperglycemia. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2015.

AHMAD, T. et al. Biosynthesis, structural characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 107, p. 227–234, 2013.

ALBRECHT, D. S. et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits PC-3 prostate cancer cell proliferation via MEK-independent ERK1/2 activation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, n. 1, p. 89–95, 2008.

ANANINGSIH, V. K.; SHARMA, A.; ZHOU, W. Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. **Food Research International**, v. 50, n. 2, p. 469–479, 2013.

AUSTIN, L. A. et al. The optical, photothermal, and facile surface chemical properties of gold and silver nanoparticles in biodiagnostics, therapy, and drug delivery. **Archives of Toxicology**, v. 88, n. 7, p. 1391–1417, 2014.

BAO, H.; PENG, A. The Green Tea Polyphenol(—)-epigallocatechin-3-gallate and its beneficial roles in chronic kidney disease. **Journal of Translational Internal Medicine**, v. 4, n. 3, p. 99–103, 2016.

BHATTACHARYA, S. et al. PEGylated-thymoquinone-nanoparticle mediated retardation of breast cancer cell migration by deregulation of cytoskeletal actin polymerization through miR-34a. **Biomaterials**, v. 51, p. 91–107, 2015.

BRASIL, J. L. et al. Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de bioadsorção de Cu(II) em batelada utilizando-se casca de nozes pecã como bioadsorvente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 548–553, 2007.

BUTTON, S. **Metodologia para planejamento experimental e análise de resultados** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2005. Disponível em: <<http://pessoal.utfpr.edu.br/lincolngusmao/arquivos/PlanejamentoExperimental.pdf>> Acesso em: 17 dez. 2017.

CABRERA, C. et al. Beneficial Effects of Green Tea—A Review. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 25, n. 2, p. 79–99, 2006.

CADIOLI, L. P.; SALLA, L. D. Nanotecnologia: um estudo sobre seu histórico, definição e principais aplicações desta inovadora tecnologia. **Revista de Ciências Exatas e Tecnologia**, v. 1, n. 1, p. 98–105, 2006.

CAMARGO, L. F.; MOREIRA, V.; VACCARO, G. Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos no desenvolvimento de novos produtos em uma empresa de saneantes. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 5, n. 3, p. 404–420, 2010.

- CAMARGO, P. H. C. et al. **Metallic Nanostructures**. Cham: Springer International Publishing, 2015.
- CARREIRA, C. A. DOS S. **Estudo da Interação entre Nanopartículas e Fosfolípidos**. Universidade do Porto, 2008.
- CHANDRAN, K.; SONG, S.; YUN, S.-I. Effect of size and shape controlled biogenic synthesis of gold nanoparticles and their mode of interactions against food borne bacterial pathogens. **Arabian Journal of Chemistry**, p.1-13, 2014.
- CHANG, K. Tiny Is Beautiful: Translating “Nano” Into Practical. **The New York Times**, 2005.
- CHEN, C. et al. Improving anticancer efficacy of (-)-epigallocatechin-3-gallate gold nanoparticles in murine B16F10 melanoma cells. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, p. 459–474, 2014.
- CHEN, M.; ZHAI, L.; ARENDRUP, M. C. In vitro activity of 23 tea extractions and epigallocatechin gallate against *Candida* species. **Medical Mycology**, v. 53, n. 2, p. 194–198, 2015.
- CHOI, C. W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, n. 6, p. 1161–1168, 2002.
- CIESEK, S. et al. The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, inhibits hepatitis C virus entry. **Hepatology**, v. 54, n. 6, p. 1947–1955, 2011.
- CROCKER, A. Tea. In: **Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p. 679–684, 2012.
- DANIEL, M.-C.; ASTRUC, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 1, p. 293–345, 2004.
- DE JONG, W. H. et al. Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. **Biomaterials**, v. 29, n. 12, p. 1912–1919, 2008.
- DE LA TORRE, R. et al. Epigallocatechin-3-gallate, a DYRK1A inhibitor, rescues cognitive deficits in Down syndrome mouse models and in humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 58, n. 2, p. 278–288, 2014.
- DOANE, T. L.; BURDA, C. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2885-2911, 2012.
- DREADEN, E. C. et al. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, n. 7, p. 2740–2779, 2012.
- DUARTE, M. R.; MENARIM, D. O. Morfodiagnose da anatomia foliar e caulinar de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 545–551, 2006.
- DYKMAN, L.; KHLEBTSOV, N. Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives. **Chem. Soc. Rev.**, v.41, p. 2256-2282, 2012.

ETHERIDGE, M. L. et al. The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2013.

EUSTIS, S.; EL-SAYED, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. **Chem. Soc. Rev.**, v. 35, n. 3, p. 209–217, 2006.

FADEEL, B.; GARCIA-BENNETT, A. E. Better safe than sorry: Understanding the toxicological properties of inorganic nanoparticles manufactured for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 3, p. 362–374, 2010.

FEYNMAN, R. P. There's (still) plenty of room at the bottom. **Engineering and Science**, 1960.

FIGUEIRA, C. S.; SANTOS, R. P. DOS. Biossíntese de nanopartículas de ouro utilizando vegetais. **Nanocell News**, v. 4, 2017.

FORESTER, S. C.; LAMBERT, J. D. The role of antioxidant versus pro-oxidant effects of green tea polyphenols in cancer prevention. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 6, p. 844–854, 2011.

FREITAS, R. A. What is nanomedicine? **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 1, n. 1, p. 2–9, 2005.

GATOO, M. A. et al. Physicochemical Properties of Nanomaterials: Implication in Associated Toxic Manifestations. **BioMed Research International**, p. 1–8, 2014.

GHOSH, S. K.; PAL, T. Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 11, p. 4797–4862, 2007.

GOPAL, J. et al. Bactericidal activity of green tea extracts: the importance of catechin containing nano particles. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016.

GOPINATH, V. et al. Anti-*Helicobacter pylori*, cytotoxicity and catalytic activity of biosynthesized gold nanoparticles: Multifaceted application. **Arabian Journal of Chemistry**, *in press*, 2016.

GURUNATHAN, S. et al. A green chemistry approach for synthesizing biocompatible gold nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, *in press*, 2014.

HAISS, W. et al. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from UV–Vis Spectra. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 11, p. 4215–4221, 2007.

HAYAKAWA, S. et al. Anti-Cancer Effects of Green Tea by Either Anti- or Pro-Oxidative Mechanisms. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 4, p. 1649–1654, 2016.

HIRASAWA, M. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 225–229, 2004.

HORIKOSHI, S.; SERPONE, N. Introduction to Nanoparticles. In: **Microwaves in Nanoparticle Synthesis**. 1. ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p. 1–24, 2013.

HSIEH, D.-S. et al. The treatment of bladder cancer in a mouse model by epigallocatechin-3-gallate-gold nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 30, p. 7633–7640, 2011.

INACIO, J. D. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. In Vitro and in Vivo Effects of (-)-Epigallocatechin 3- O -gallate on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 10, p. 1993–1996, 2013.

INC, Z. M. **Potencial Zeta: Un Curso Completo en 5 MinutosINC. Zeta-Meter**, p.1-11, 2008.

IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 2638-2650, 2011.

ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. **International Standard**, v. 3, p. 42, 2009.

JAIN, K. Future of nanomedicine: impact on healthcare & society. **Nanomedicine**, 2015.

JAIN, K. Research and Future of Nanomedicine. In: **The Handbook of Nanomedicine**. New York: Human Press, p. 621–636, 2017.

JATSCHKA, J. et al. Propagating and localized surface plasmon resonance sensing — A critical comparison based on measurements and theory. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 7, p. 62–70, 2016.

JIN, W. et al. Polyphenol–gelatin nanoparticles as reductant and stabilizer for one-step synthesis of gold nanoparticles and their interfacial behavior. **RSC Advances**, v. 5, n. 34, p. 26496–26503, 2015.

JINHAO, G. A. O.; HONGWEI, G. U.; BING, X. U. Multifunctional magnetic nanoparticles: design, synthesis, and biomedical applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 42, n. 8, p. 1097–1107, 2009.

JURGENS, T. M. et al. Green tea for weight loss and weight maintenance in overweight or obese adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 12, n. 12, p. 1-138, 2012.

K, S. K. et al. Synthesis of Gold Nanoparticles: An Ecofriendly Approach Using *Hansenula anomala*. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 3, n. 5, p. 1418–1425, 2011.

KANCHI, S. et al. Exploitation of de-oiled jatropha waste for gold nanoparticles synthesis: A green approach. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 247–255, 2018.

KHARISSOVA, O. V. et al. The greener synthesis of nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 240–248, 2013.

KHLEBTSOV, N.; DYKMAN, L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of *in vitro* and *in vivo* studies. **Chem. Soc. Rev.**, v. 40, n. 3, p. 1647–1671, 2011.

KHOOBCHANDANI, M. et al. Laminin Receptor-Avid Nanotherapeutic EGCg-AuNPs as a Potential Alternative Therapeutic Approach to Prevent Restenosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 316, 2016.

KIM, H. et al. Concentration Effect of Reducing Agents on Green Synthesis of Gold Nanoparticles: Size, Morphology, and Growth Mechanism. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 1, p. 230, 2016.

KIM, H.-S.; QUON, M. J.; KIM, J. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. **Redox Biology**, v. 2, p. 187–195, 2014.

KIM, H. M.; KIM, J. The Effects of Green Tea on Obesity and Type 2 Diabetes. **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 37, n. 3, p. 173-175, 2013.

KLAINÉ, S. J. et al. Paradigms to assess the environmental impact of manufactured nanomaterials. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 3–14, 2012.

LASAGNA-REEVES, C. et al. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 4, p. 649–655, 2010.

LEE, K. D. et al. Eco-friendly synthesis of gold nanoparticles (AuNPs) using *Inonotus obliquus* and their antibacterial, antioxidant and cytotoxic activities. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 26, p. 67–72, 2015.

LEU, J. et al. The effects of gold nanoparticles in wound healing with antioxidant epigallocatechin gallate and α -lipoic acid. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 5, p. 767-775, 2012.

LI, S.; HATTORI, T.; KODAMA, E. N. Epigallocatechin gallate inhibits the HIV reverse transcription step. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 21, n. 6, p. 239–243, 2011.

LIAO, H.-G.; NIU, K.-Y.; ZHENG, H. Nanostructure Growth, Interactions, and Assembly in the Liquid Phase. In: FRANCES M. ROSS (Ed.). **Liquid Cell Electron Microscopy**. New York: Cambridge University Press, p. 191–209, 2016.

LORENZ, M. Cellular targets for the beneficial actions of tea polyphenols. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 98, n. 6, p. 1642S–1650S, 2013.

LOVE, S. A.; THOMPSON, J. W.; HAYNES, C. L. Development of screening assays for nanoparticle toxicity assessment in human blood: preliminary studies with charged Au nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 7, n. 9, p. 1355–1364, 2012.

LUANGPIPAT, T. et al. Gold nanoparticles produced in a microalga. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 12, p. 6439–6445, 2011.

MAK, J. S. W. et al. Recent developments in optofluidic-assisted Raman spectroscopy. **Progress in Quantum Electronics**, v. 37, n. 1, p. 1–50, 2013.

MARTINS, P. R. Agricultura familiar, segurança e soberania alimentar e nanotecnologia: onde estamos, para onde vamos. **TOMO**, v. 29, p. 151–184, 2016.

- MIESZAWSKA, A. J. et al. Multifunctional Gold Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Disease. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 3, p. 831–847, 2013.
- MILANEZE, B. A. et al. Facile Synthesis of Monodisperse Gold Nanocrystals Using *Virola oleifera*. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 1, p. 465, 2016.
- MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 346–356, 2013.
- MODY, V. et al. Introduction to metallic nanoparticles. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 2, n. 4, p. 282, 2010.
- MOMOSE, Y.; MAEDA-YAMAMOTO, M.; NABETANI, H. Systematic review of green tea epigallocatechin gallate in reducing low-density lipoprotein cholesterol levels of humans. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 67, n. 6, p. 606–613, 2016.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 6^a ed. John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- MOURATO, A. et al. Biosynthesis of Crystalline Silver and Gold Nanoparticles by Extremophilic Yeasts. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2011, p. 1–8, 2011.
- MUKHERJEE, S. et al. Gold-conjugated green tea nanoparticles for enhanced anti-tumor activities and hepatoprotection — synthesis, characterization and in vitro evaluation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 11, p. 1283–1297, 2015.
- NAPONELLI, V. et al. Green Tea Catechins for Prostate Cancer Prevention: Present Achievements and Future Challenges. **Antioxidants**, v. 6, n. 4, p. 26, 2017.
- NATARIO, R. **Nanotecnologia**. Disponível em: <<http://redes-e-servidores.blogspot.com.br/2011/01/nanotecnologia.html>>. Acessado em 20 de out de 2017.
- NETO, B. D. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **25 Anos de quimiometria no Brasil**. **Quimica Nova**, v. 29, n.6, p. 1401-1406, 2006.
- NETO, B. D. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed Editora SA, p.414, 2010.
- NICOL, J. R.; DIXON, D.; COULTER, J. A. Gold nanoparticle surface functionalization: a necessary requirement in the development of novel nanotherapeutics. **Nanomedicine**, v. 10, n. 8, p. 1315–1326, 2015.
- NIE, L. et al. Applications of Gold Nanoparticles in Optical Biosensors. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 10, p. 2700–2721, 2014.
- NUNE, S. K. et al. Green nanotechnology from tea: phytochemicals in tea as building blocks for production of biocompatible gold nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 19, p. 2912, 2009.

OLIVEIRA, J. P. DE. **Estudo da síntese de nanopartículas de ouro e bioconjugação com proteínas para desenvolvimento de nanosensores.** Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, p. 150, 2016.

OSMAN, A. M.; WONG, K. K. Y.; FERNYHOUGH, A. ABTS radical-driven oxidation of polyphenols: Isolation and structural elucidation of covalent adducts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 346, n. 1, p. 321–329, 2006.

PARK, Y.-S. et al. Comparison of the Nutrient and Chemical Contents of Traditional Korean Chungtaejeon and Green Teas. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, n. 2, p. 186–191, 2010.

PETRYAYEVA, E.; KRULL, U. J. Analytica Chimica Acta Localized surface plasmon resonance : Nanostructures , bioassays and biosensing — A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 706, n. 1, p. 8–24, 2011.

PISSUWAN, D. et al. Functionalised gold nanoparticles for controlling pathogenic bacteria. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n.4, p. 207-213, 2010.

POLTE, J. et al. **Nucleation and Growth of Gold Nanoparticles Studied *via in situ* Small Angle X-ray Scattering at Millisecond Time Resolution.** ACS Nano, v.4, n. 2, p. 1076-1082, 2010a.

POLTE J. et al. Mechanism of Gold Nanoparticle Formation in the Classical Citrate Synthesis Method Derived from Coupled *In Situ* XANES and SAXS Evaluation. **JACS Articles**. v. 132, n. 4, p. 1296-1301, 2010b.

PRADO, A. R. et al. Surface-Enhanced Raman Plasmon in Self-Assembled Sulfide-Coated Gold Nanoparticle Arrays. **Plasmonics**, v. 10, p. 1097-1113, 2015.

RADHAKRISHNAN, R. et al. Encapsulation of biophenolic phytochemical EGCG within lipid nanoparticles enhances its stability and cytotoxicity against cancer. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 198, p. 51–60, 2016.

RAJESHKUMAR, S. et al. Seaweed-mediated synthesis of gold nanoparticles using *Turbinaria conoides* and its characterization. **Journal Of Nanostructure in Chemistry**, v. 44, n. 3, 2013.

RASHIDI, B. et al. Green tea and its anti-angiogenesis effects. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 949–956, 2017.

REYGAERT, W. C. The antimicrobial possibilities of green tea. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1–8, 2014.

ROBB, C. S. et al. Analysis of green tea constituents by HPLC-FTIR. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 25, n. 5, p. 787–801, 2002.

ROSA, A. H. LA; FERNANDEZ, R.; ZEGARRA, E. Proton-fountain Electric-field-assisted Nanolithography (PEN): Fabrication of polymer nanostructures that respond to chemical and electrical stimuli . An overview in the context of the top-down and bottom-up approaches to nanotechnology. **REVCIUNI**, v. 15, p. 87–129, 2012.

ROYCHOUDHURY, S. et al. Potential role of green tea catechins in the management of oxidative stress-associated infertility. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 34, n. 5, p. 487–498, 2017.

SANNA, V. et al. Single-step green synthesis and characterization of gold-conjugated polyphenol nanoparticles with antioxidant and biological activities. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 4935–4951, 2014.

SARIC, S.; NOTAY, M.; SIVAMANI, R. Green Tea and Other Tea Polyphenols: Effects on Sebum Production and Acne Vulgaris. **Antioxidants**, v. 6, n. 4, p. 2, 2016.

SATHISHKUMAR, G. et al. Cannonball fruit (*Couroupita guianensis*, Aubl.) extract mediated synthesis of gold nanoparticles and evaluation of its antioxidant activity. **Journal of Molecular Liquids**, v. 215, p. 229–236, 2016.

SCHANTZ, M.; ERK, T.; RICHLING, E. Metabolism of green tea catechins by the human small intestine. **Biotechnology Journal**, v. 5, n. 10, p. 1050–1059, 2010.

SCHMID, G. Large clusters and colloids. Metals in the embryonic state. **Chemical Reviews**, v. 92, n. 8, p. 1709–1727, 1992.

SCHRÖFEL, A. et al. Applications of biosynthesized metallic nanoparticles – A review. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 10, p. 4023–4042, 2014.

SEPÚLVEDA, B. et al. LSPR-based nanobiosensors. **Nano Today**, v. 4, n. 3, p. 244–251, 2009.

SHARMA, D.; KANCHI, S.; BISETTY, K. Biogenic synthesis of nanoparticles: A review. **Arabian Journal of Chemistry**, *in press*, 2015.

SHUKLA, R. et al. Laminin receptor specific therapeutic gold nanoparticles (198AuNP-EGCg) show efficacy in treating prostate cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 31, p. 12426–12431, 2012.

SIDDIQUI, I. A. et al. Introducing Nanochemoprevention as a Novel Approach for Cancer Control: Proof of Principle with Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate. **Cancer Research**, v. 69, n. 5, p. 1712–1716, 2009.

SILVA, L. et al. Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. 1ª ed., Blusher Publishing, cap. 26, p. 967-1011, 2015.

SILVA, T. S. J. Aplicação do planejamento experimental (DOE) no processo de desenvolvimento de fitoterápicos na Indústria farmacêutica. **Revista Especialize On-line IPOG**, v. 1, p. 1–16, 2015.

SINGARAVELU, G. et al. A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, *Sargassum wightii* Greville. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 57, n. 1, p. 97–101, 2007.

SINGH, N. A.; MANDAL, A. K. A.; KHAN, Z. A. Potential neuroprotective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG). **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 60, 2015.

SINGH, P. et al. Microbial synthesis of Flower-shaped gold nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, p. 1–6, 2015.

- SINGHAL, K. et al. Probable benefits of green tea with genetic implications. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 21, n. 1, p. 107–114, 2017.
- STEINMANN, J. et al. Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. **British Journal of Pharmacology**, v. 168, n. 5, p. 1059–1073, 2013.
- STUART, E. C.; SCANDLYN, M. J.; ROSENGREN, R. J. Role of epigallocatechin gallate (EGCG) in the treatment of breast and prostate cancer. **Life Sciences**, v. 79, n. 25, p. 2329–2336, 2006.
- TACHIBANA, H.; FUJIMURA, Y.; YAMADA, K. Tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate associates with plasma membrane lipid rafts: Lipid rafts mediate anti-allergic action of the catechin. **BioFactors**, v. 21, p. 383–385, 2004.
- TAN, S. J. et al. Building plasmonic nanostructures with DNA. **Nature Nanotechnology**, v. 6, n. 5, p. 268–276, 2011.
- THAKKAR, K. N.; MHATRE, S. S.; PARIKH, R. Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 2, p. 257–262, 2010.
- THANH, N. T. K.; MACLEAN, N.; MAHIDDINE, S. Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 15, p. 7610–7630, 2014.
- TOMA, H.; ANAISSI, F. Da cor à cor inexistente: uma reflexão sobre espectros eletrônicos e efeitos cromáticos. **Quim.Nova**, v. 28, n. 5, p. 897–900, 2005.
- TSAI, L.-C. et al. EGCG/gelatin-doxorubicin gold nanoparticles enhance therapeutic efficacy of doxorubicin for prostate cancer treatment. **Nanomedicine**, v. 11, n. 1, p. 9–30, 2016.
- WEBER, C. et al. The green tea catechin, epigallocatechin gallate inhibits chikungunya virus infection. **Antiviral Research**, v. 113, p. 1-3, 2015.
- XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, v. 6, n. 2, p. 112–115, 2008.
- YASUN, E. et al. Cancer cell sensing and therapy using affinity tag-conjugated gold nanorods. **Interface Focus**, v. 3, n. 3, p. 2013006, 2013.
- YEH, M.-K. et al. The preparation and characterization of gold-conjugated polyphenol nanoparticles as a novel delivery system. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 1623–1633, 2012.
- YOON, J. Y. et al. Epigallocatechin-3-Gallate Improves Acne in Humans by Modulating Intracellular Molecular Targets and Inhibiting P. acnes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 2, p. 429–440, 2013.
- ZHANG, X. Gold Nanoparticles: Recent Advances in the Biomedical Applications. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 72, n. 3, p. 771–775, 2015.
- ZHOU, W. et al. Gold Nanoparticles for *In Vitro* Diagnostics. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 19, p. 10575–10636, 2015.

ZHU, H. et al. Facile and green synthesis of well-dispersed Au nanoparticles in PAN nanofibers by tea polyphenols. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 18, p. 9301-9307, 2012.

ANEXO I

Padronização do tempo e rotação de centrifugação do coloide metálico

A fim de padronizar a velocidade e o tempo de rotação para certificar-se de que apenas as AuNP's estavam presentes na solução foram realizados testes para determinação dos parâmetros de centrifugação. O material sintetizado foi submetido a centrifugação em 1.000, 2.000, 5.000, 10.000 e 14.000 rpm por 5, 10 e 20 minutos, tendo sido coletadas as frações superior (sobrenadante) e inferior (pellet) dos tubos. Este material foi analisado por absorção óptica (UV-Vis). O comprimento de onda máximo (λ máx) e a absorbância máxima foram avaliados para a escolha da melhor condição. Os resultados são mostrados na Tabela 12 e Figura 35. A velocidade de 14.000 rpm e o tempo de 20 minutos foram selecionados para todas as etapas que envolvem a lavagem do nanomaterial sintetizado, visto que estas condições apresentaram menor absorbância para o sobrenadante e não apresentou agregação das partículas no pellet.

Tabela 12. Valores obtidos pelo espectro de absorção UV-Vis para determinação do tempo e rotação ideal de centrifugação sem perda de material.

Rotação (rpm)	Tempo (min)	λ máx Sobrenadante*	Absorbância Sobrenadante*	λ máx Pellet**	Absorbância Pellet**
1.000	5	532	0,1923	531	0,18637
1.000	10	532	0,17484	572	0,37742
1.000	20	532	0,11812	534	0,77835
2.000	5	532	0,19398	534	0,43941
2.000	10	529	0,13045	533	0,73874
2.000	20	532	0,06838	533	0,82424
5.000	5	529	0,08487	533	0,66835
5.000	10	527	0,06085	533	1,21883
5.000	20	529	0,03834	532	1,24728
10.000	5	529	0,05706	533	0,85498
10.000	10	525	0,04999	533	0,88646
10.000	20	524	0,0345	533	0,99277
14.000	5	532	0,05249	533	0,95335
14.000	10	527	0,03846	533	0,95423
14.000	20	527	0,0331	533	0,93112

*Fração superior – Fração coletada na superfície do eppendorf após a centrifugação;

**Fração inferior – Fração coletada no pellet formado no eppendorf após a centrifugação.

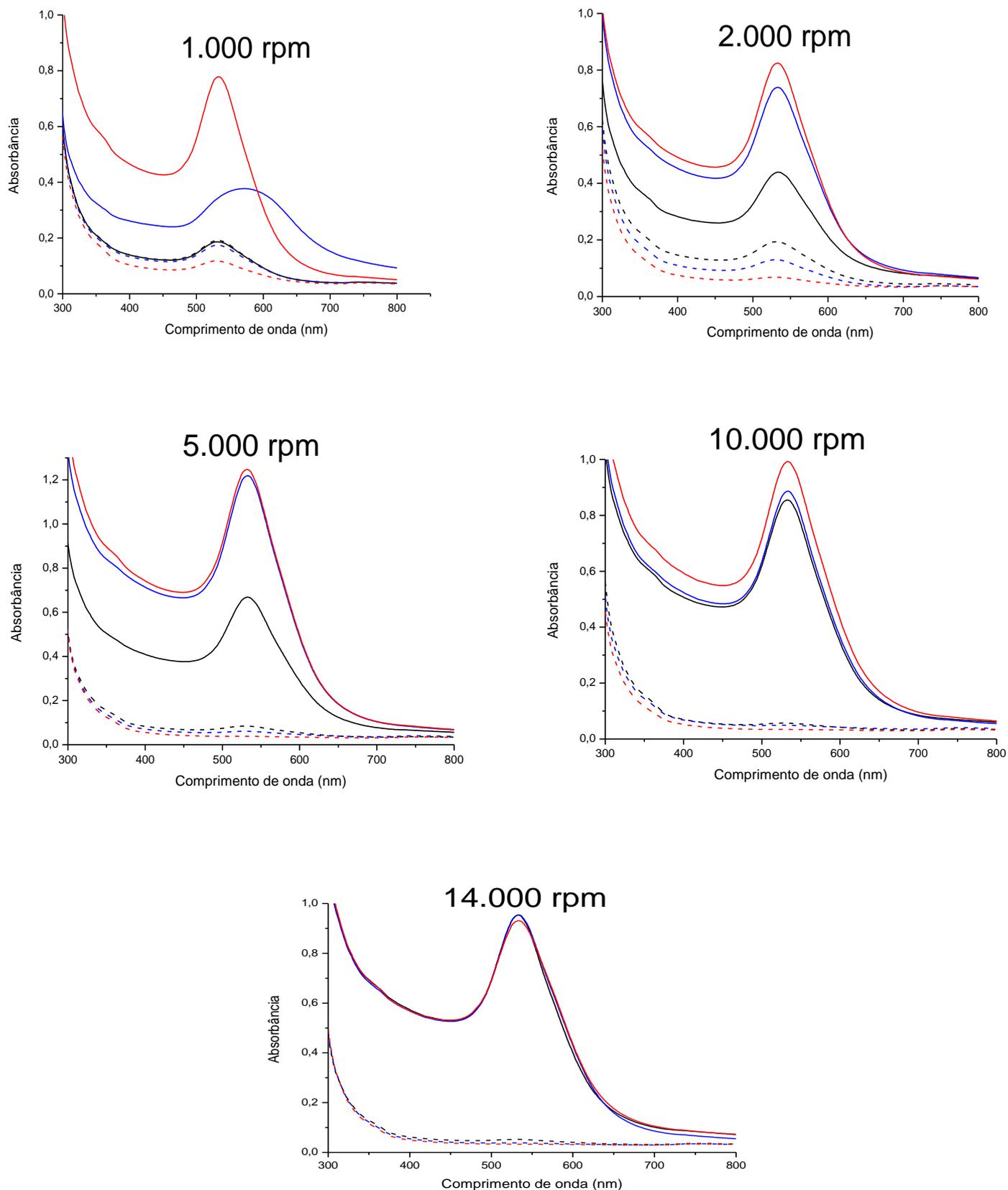


Figura 35. Espectros de absorção UV-Vis de nanopartículas metálicas submetidas a diferentes condições de centrifugação: 1.000 rpm (A); 2.000 rpm (B); 5.000 rpm (C); 10.000 rpm (D) e 14.000 rpm (E). Linhas pontilhadas são referentes a fração superior (sobrenadante) após a centrifugação e linhas contínuas são referentes a fração inferior (pellet) ressuspensa em água ultrapura. Cores: preto (5 minutos), azul (10 minutos) e vermelho (20 minutos).

ANEXO II

Determinação do tamanho médio das AuNPs-EGCG

Tabela 13. Valores correspondentes ao diâmetro (nm) de 500 nanopartículas de ouro com EGCG obtidos pelo Software Image J.

11,45	15,29	20,36	20,66	11,4	14,77	12,52	12,34	13,54	14,62	10,21	16,43	17,27	20,09	13,87	13,71	14,8	13,7	13,24	14,76
18,14	18,17	18,18	16,39	13,55	13,57	11,86	13,41	11,53	13,75	15,66	13,94	15,7	12,07	14,19	12,94	13,83	14,75	13,33	14,52
13,81	17,37	11,92	16,42	14	10,69	17,58	15,84	14,28	16,18	21,13	15,81	11,28	19,65	12,89	17,41	12,19	12,66	15,96	11,4
14,82	13,74	16,79	11,93	13,6	18,71	16,79	10,57	15,02	13,32	15,19	13,54	17,13	12,9	14,71	12,94	12,26	12,28	14,09	13,71
12,08	13,99	13,96	12,52	18,3	9,56	13,1	17,98	19,82	20,7	16,49	15,73	18,69	15,99	13,24	12,27	13,58	15,13	15,9	14,94
18,81	12,16	10,04	10,43	14,75	11,99	14,78	13,23	10,9	17,33	10,71	12,99	12,64	17,66	15,61	11,86	11,33	10,66	12,8	15,85
16,41	14,19	14,66	14	13,99	15,13	10,69	18,43	16,13	14,47	19,44	11,35	10,93	13,86	16,98	11,66	16,35	15,58	10,31	18,84
13,45	17,4	15,49	14,11	11,1	14,89	17,1	11,51	17,3	12,83	17,26	10,59	19,97	15,95	17,51	19,49	14,36	16,86	12,19	16,2
15,89	13,4	12,86	13,99	20,16	10,76	17,88	12,26	19,87	14,01	14,05	14,06	17,76	13,28	13,94	11,68	12,73	11,1	11,99	9,5
15,19	14,69	13,83	21,46	13,76	10,29	14,66	14,53	11,99	13,94	16,71	14,75	11,58	11,44	17,13	15,4	18,05	12,86	14,42	11,93
13,23	17,91	17,28	19,71	15,83	19,67	11,84	13,99	12,49	14	16,92	15,49	14,22	13,11	15,05	14	12,94	17,98	14,82	19,78
13,84	16,23	12,34	18,61	14,47	16,89	11,37	19,23	13,88	10,54	14,69	19,15	18,51	10,74	19,41	12,99	16,79	15,84	14,52	20,66
13,09	11,56	16,01	15,18	12,01	17,38	13,53	12,19	17,38	14,97	13,96	12,57	13,71	12,1	14,19	13,85	13,14	13,94	18,71	14,29
7,88	14,2	18,01	18,69	14,82	20,2	15,62	16,95	16,39	13,28	12,46	19,49	14,27	12,07	13,79	19,89	13,46	16,16	10,08	16,1
13,2	21,29	19,53	16,6	11,56	12,56	11,4	12,7	17,19	15,45	12,33	18,95	14,41	14,91	17,35	14,27	10,81	11,75	16,83	14
18,01	13,87	13,89	15,78	11,17	12,44	12,92	16,08	13,59	20,5	13,72	10,76	13,36	14,9	14,11	14,15	14,16	12,99	13,76	10,85
16,37	10,85	13,27	18,22	14,95	14,12	13,87	11,66	15,27	14,23	15,69	11,52	13,46	14,28	15,58	12,75	18,03	19,58	11,51	19,24
14,77	15,57	13,61	11,46	15,25	12,66	17,31	12,21	12,66	13,75	16,64	18,6	11,23	13,01	15,29	14,03	14,22	11,23	13,62	14,23
16,64	15,15	12,99	13,06	18,99	17,08	9,62	19,91	14,29	13,79	20,38	13,46	11,93	17,51	13,13	15,47	13,09	12,3	16,23	11,15
13,12	12,1	14,61	14,29	11,71	15,29	14,29	14,31	13,88	15,95	12,1	17,63	17,6	15,95	14,13	14,95	14,52	13,25	16,73	13,83
13,54	13,59	12,81	14,43	14,71	14,6	13,06	11,64	17,77	15,62	12,19	12,63	10,43	16,05	13,7	19,78	13,96	11,71	15,23	12,34
13,11	11,45	13,33	13,83	15,19	12,99	12,97	12,81	19,05	13,44	11,45	20,2	16,6	17,61	15,36	18,19	13,89	16,52	13,27	9,42
17,92	12,99	15,64	14,57	11,58	11,47	8,29	12,64	11,95	15,34	12,51	14,9	14,93	14,49	11,47	15,57	19,14	17,35	13,4	14,46
18,67	13,15	12,48	14,05	19,36	9,56	15,99	10,14	10,56	11,1	16,66	11,38	14,19	13,63	13,69	11,87	14,82	14,45	17,24	11,24
11,33	13,93	15,33	20,28	13,4	19,87	15,62	9,72	16,10	12,25	13,76	11,43	13,87	15,86	12,62	18,21	15,02	14,82	11,8	12,19

Média final = 14,54 nm

ANEXO III

Determinação da Razão de Aspecto das AuNPs-EGCG

Tabela 14. Valores correspondentes a razão de aspecto (Ra) de 500 nanopartículas de ouro com EGCG obtidos pelo Software Image J.

1,06	1,01	1,33	1,41	1,07	1,12	1,1	1,05	1,09	1,23	1,13	1,05	1,13	1,09	1,12	1,12	1,08	1,02	1,12	1,16
1,05	1,07	1,04	1,16	1,04	1,12	1,19	1,4	1,07	1,18	1,02	1,17	1,09	1,04	1,1	1,04	1,12	1,03	1,01	1,1
1,31	1,16	1,03	1,05	1,09	1,05	1,1	1,06	1,07	1,09	1,09	1,06	1,03	1,1	1,18	1,04	1,45	1,05	1,17	1,15
1,3	1,07	1,07	1,04	1,09	1,01	1,03	1,06	1,12	1,07	1,3	1,08	1,07	1,12	1,04	1,03	1,11	1,11	1,11	1,07
1,04	1,36	1,16	1,12	1,04	1,04	1,07	1,02	1,04	1,04	1,11	1,07	1,26	1,12	1,08	1,07	1,04	1,01	1,02	1,05
1,06	1,18	1,11	1,03	1,07	1,3	1,02	1,05	1,08	1,33	1,1	1,07	1,13	1,09	1,04	1,24	1,06	1,04	1,06	1,06
1,09	1,13	1,13	1,12	1,14	1,19	1,05	1,1	1,04	1,02	1,12	1,05	1,1	1,12	1,02	1,05	1,18	1,1	1,06	1,11
1,22	1,07	1,06	1,17	1,03	1,04	1,22	1,15	1,09	1,26	1,07	1,05	1,06	1,04	1,05	1,29	1,16	1,03	1,06	1,1
1,07	1,12	1,04	1,37	1,14	1,05	1,5	1,07	1,21	1,21	1,06	1,08	1,16	1,05	1,1	1,02	1,05	1,1	1,01	1,13
1,1	1,32	1,24	1,5	1,28	1,2	1,09	1,11	1,25	1,09	1,02	1,17	1,02	1,02	1,04	1,06	1,29	1,15	1,05	1,09
1,05	1,14	1,2	1,11	1,17	1,11	1,04	1,08	1,12	1,08	1,06	1,1	1,05	1,1	1,05	1,09	1,05	1,03	1,05	1,05
1,05	1,02	1,12	1,26	1,06	1,07	1,26	1,04	1,04	1,11	1,05	1,03	1,02	1,01	1,07	1,26	1,05	1,05	1,03	1,14
1,07	1,17	1,08	1,04	1,08	1,13	1,24	1,16	1,04	1,07	1,06	1,19	1,04	1,01	1,08	1,1	1,23	1,07	1,07	1,16
1,26	1,13	1,31	1,11	1,17	1,11	1,06	1,02	1,04	1,09	1,12	1,19	1,03	1,26	1,07	1,05	1,1	1,07	1,02	1,2
1,02	1,23	1,05	1,04	1,05	1,07	1,05	1,04	1,12	1,05	1,13	1,03	1,16	1,08	1,1	1,01	1,17	1,14	1,07	1,06
1,31	1,06	1,02	1,14	1,05	1,06	1,05	1,02	1,07	1,03	1,09	1,05	1,11	1,08	1,11	1,05	1,05	1,13	1,1	1,03
1,16	1,02	1,06	1,22	1,06	1,2	1,04	1,29	1,09	1,13	1,01	1,08	1,11	1	1,16	1,21	1,04	1,01	1,06	1,3
1,14	1,14	1,03	1,16	1,03	1,08	1,14	1,03	1,16	1,08	1,1	1,05	1,09	1,17	1,04	1,17	1,04	1,01	1,06	1,1
1,01	1,07	1,04	1,09	1,17	1,04	1,08	1,19	1,2	1,02	1,09	1,07	1,02	1,04	1,26	1,05	1,05	1,07	1,05	1,1
1,02	1,09	1,12	1,03	1,13	1,12	1,15	1,06	1,08	1,13	1,04	1,18	1,07	1,03	1,04	1,08	1,11	1,02	1,17	1,28
1,2	1,14	1,22	1,08	1,06	1,11	1,16	1,4	1,05	1,02	1,02	1,02	1,03	1,09	1,07	1,07	1,2	1,07	1,1	1,05
1,07	1,27	1,18	1,07	1,1	1,03	1,34	1,06	1,01	1,05	1,18	1,16	1,05	1,16	1,05	1,06	1,29	1,03	1,01	1,09
1,07	1,18	1,06	1,2	1,18	1,14	1,17	1,14	1,12	1,02	1,09	1,2	1,07	1,04	1,36	1,02	1,23	1,04	1,16	1,07
1,27	1,08	1,1	1,09	1,12	1,02	1,03	1,01	1,27	1,02	1,12	1,01	1,06	1,09	1,1	1,02	1,09	1,1	1,16	1,2
1,03	1,03	1,26	1,1	1,08	1,02	1,42	1,03	1,16	1,09	1,1	1,05	1,05	1,35	1,03	1,06	1,05	1,08	1,12	1,05

Ra média = 1,10