



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Bauru



**Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais**

**Estudos Biológicos de Nanopartículas de Óxido De Zinco: Interação com Proteínas e Avaliação de "Burst" Oxidativo de Leucócitos**

**Bruna Pastrello**

2016

Bruna Pastrello

ESTUDOS BIOLÓGICOS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO: Interação com Proteínas e Avaliação de “Burst” Oxidativo de Leucócitos

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, sob orientação do Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes

Bauru

2016

Pastrello, Bruna Pastrello.

Estudos Biológicos de Nanopartículas de Óxido de Zinco: Interação com Proteínas e Avaliação do "Burst" Oxidativo de Leucócitos/ Bruna Pastrello, 2016

147 f.

Orientador: Valdecir Farias Ximenes

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao Sr. Rubens, meu avô  
que partiu para o mundo espiritual durante  
a realização desse trabalho.  
Obrigado por tudo

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus, por ser sempre o norte e luz da minha vida, por me dar proteção e permissão para concluir mais uma etapa.

Aos meus pais Denise e Waldir, por estarem sempre presentes e nunca terem me deixado desanimar mesmo nos momentos mais difíceis, vocês como sempre deram ao máximo de vocês para mim.

À minha irmã Beatriz por simplesmente ter a paciência de me ouvir, por me dar atenção e um abraço quando mais precisei. Sei que você está mais longe do que gostaríamos, mas você sempre sabe me dar o apoio necessário.

Ao meu marido Rodrigo, por ser meu amor, meu companheiro, meu maior confidente, por estar ao meu lado quando eu menos merecia, por me dar seu ombro nos momentos de tristeza e sua melhor risada nos momentos de alegria, por me ajudar nos momentos que eu precisei, por ser sempre a melhor pessoa para mim.

Ao meu orientador, Professor Doutor Valdecir Farias Ximenes, por me ajudar a escrever e executar esse trabalho e que se dedicou ao máximo para que tudo saísse da melhor forma possível, pelos ensinamentos, pela paciência e pelas valiosas discussões científicas.

Aos professores que me auxiliaram nesse processo, principalmente o Professor Doutor Paulo Noronha Lisboa Filho (e alunos do laboratório) pelo auxílio na síntese e caracterização do material.

Aos colegas queridos que encontrei diariamente e que se tornaram quase uma outra família para mim durante esse tempo, principalmente a Luana pelo auxílio

nos testes biológicos (obrigado pela paciência), Debora, Carol, Luiza, Ziani e Mariana pela força.

Aos meus amigos que vêm desde antes desse trabalho e os que eu conheci durante essa jornada e sem os quais o caminho seria mais difícil Karla, Paula, Mayara, Fran, Regina, Kamila, Renata, Eliene, Nagila, Linkon, Gerson, Gustavo, Rose, Alex, Du, madrinhas da minha vida Leda e Cíntia, e tantos outros que não caberiam apenas nessa dedicatória.

Enfim, a todos os que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho (ou simplesmente por me dar apoio moral).

Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.

*Ayrton Senna*

## Resumo

O óxido de zinco (ZnO) é um semicondutor muito utilizado na área tecnológica, principalmente em dispositivos fotovoltaicos e, mais recentemente, vem sendo utilizado em aplicações biomédicas. Porém, os efeitos citotóxicos, principalmente quando em tamanho nanométrico, associados ao seu uso, não devem ser descartados. Assim, este trabalho teve por objetivo estudar o efeito tempo de sonicação na morfologia de nanopartículas de ZnO e como estas diferenças poderiam afetar a estrutura da albumina, provocar a hemólise de eritrócitos e a ativação de neutrófilos humanos, quando em contato com este material. Amostras de ZnO foi obtido através do método de síntese ultrassônica, caracterizada por métodos ópticos e suas morfologias observadas em microscópio de varredura eletrônica. Foram obtidas duas morfologias distintas: nanoflores e nanoagulhas. Em todos os testes biológicos a concentração final de ZnO foi 0,1mg/mL em todos os experimentos, onde incubou-se o mesmo com albumina humana e com células sanguíneas (eritrócitos e neutrófilos). Não se observou alterações significativas na estrutura da albumina quando incubada com ZnO, como evidenciado por estudos de fluorescência intrínseca e extrínseca. Uma exceção foi uma pequena agregação da proteína quando incubada com o ZnO (nanoflor) avaliado por espalhamento de luz (Rayleigh). Embora pouco efetiva, esta morfologia do ZnO também foi mais eficaz na indução de hemólise de eritrócitos (22%), se comparado às nanoagulhas (11%), após 48 horas de reação (controle negativo=3,7%). A mesma tendência foi observada para estimulação de neutrófilos avaliada por luminol (nanoflores 26,9%, nanoagulhas 8,9% e controle negativo=8,7%). Em conclusão, podemos afirmar que ZnO nanoestruturado



apresentou baixa toxicidade nos modelos aqui estudados, o que reforça a sua potencial aplicação *in vivo*.

## **Abstract**

Zinc oxide (ZnO) is a semiconductor that has been highly explored in multiple areas of science, especially in photovoltaic devices and, more recently, in biomedical applications. However, the cytotoxic effects, especially in nanosize, associated with its use cannot be ruled out. Therefore, this work aimed to study how the sonication time can influence the morphology obtained for the zinc oxide and how these differences could affect the structure of albumin, cause hemolysis of erythrocytes and activation of human neutrophils. ZnO was obtained by ultrasonic synthesis method and characterized by optical methods and their morphologies observed in scanning electron microscope. Two different morphologies were obtained: nanoflowers and nanoneedle. ZnO was incubated with human serum albumin and blood cells (erythrocytes and neutrophils) in final concentration of 0.1mg/ml. The results showed no significant modification in albumin structure when incubated with ZnO, evidenced by intrinsic and extrinsic fluorescence studies. One exception was a small protein aggregation observed in light scattering (Rayleigh). Although somewhat effective, this morphology of ZnO was also more effective at inducing hemolysis of erythrocytes (22%) compared to nanoagulhas (11%), after 48 hours of reaction (negative control = 3.7%). The same trend was observed for stimulation of neutrophils measured by luminol (nanoflowers 26.9% and nanoneedle 8.9%) (negative control = 8.7%). In conclusion, it can be said that ZnO nanostructured showed low toxicity in the models studied, which reinforces the *in vivo* applications.

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| 1. Introdução .....   | 1  |
| 2. Revisão bibliográfica .....  | 4  |
| 2.1. Nanopartículas .....   | 4  |
| 2.2. Óxido de zinco.....  | 5  |
| 2.3. Ultrassom e síntese de materiais pelo método sonoquímico .....             | 9  |
| 2.4. Caracterização de óxidos nanoparticulados.....                             | 13 |
| 2.4.1. Difração de raios x.....   | 13 |
| 2.4.2. Microscópio eletrônico de varredura.....                                 | 17 |
| 2.5. Métodos espectroscópicos.....  | 18 |
| 2.5.1. Radiação eletromagnética .....   | 18 |
| 2.5.2. Interação da radiação com a matéria .....                                | 19 |
| 2.5.3. Medidas espectroscópicas.....  | 20 |
| 2.5.4. Espectroscopia de absorção de luz na região do ultravioleta e visível .. | 21 |
| 2.5.5. Infravermelho.....   | 21 |
| 2.5.6. Fluorescência .....  | 22 |
| 2.5.7. Supressão da fluorescência.....  | 31 |
| 2.5.8. Dicroísmo circular .....   | 32 |
| 2.6. Albumina Sérica .....  | 34 |
| 2.7. Eritrócitos e sua estimulação (hemólise).....                              | 40 |
| 2.8. Neutrófilos e o “burst” oxidativo.....                                     | 42 |

|   |    |
|---|----|
| 3. Objetivos .....  | 47 |
| 4. Materiais e métodos .....  | 48 |
| 4.1. Reagentes utilizados .....   | 48 |
| 4.2. Preparação de soluções a serem utilizadas nos experimentos .....                   | 49 |
| 4.3. Síntese e Caracterização de Óxido de Zinco .....                                   | 51 |
| 4.3.1. Preparação de Óxido de Zinco (Método Sonoquímico) .....                          | 51 |
| 4.3.2. Caracterização das Amostras de Óxido de Zinco .....                              | 52 |
| 4.3.3. Equipamentos utilizados para os testes biológicos .....                          | 53 |
| 4.4. Ensaio Biológicos Realizados com as Amostras de Óxido de Zinco .....               | 55 |
| 4.4.1. Ensaio de Alteração da Estrutura da Albumina Humana .....                        | 56 |
| 4.4.2. Ensaio de Indução de Hemólise .....  | 58 |
| 4.4.3. Obtenção de Neutrófilos por Gradiente Duplo de Densidade em Ficoll-Hypaque ..... | 60 |
| 5. Resultados e Discussão .....   | 66 |
| 5.1. Síntese e caracterização de amostras de óxido de zinco em pó .....                 | 66 |
| 5.1.1. Difração de raios X .....  | 67 |
| 5.1.2. Espectroscopia de UV-Visível .....   | 69 |
| 5.1.3. Infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) .....                          | 73 |
| 5.1.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....                                  | 75 |
| 5.2. Testes biológicos realizados com óxido de zinco (ZnO) .....                        | 80 |
| 5.2.1. Escolha das amostras .....   | 80 |
| 5.2.2. Testes de interação com albumina humana (HSA) .....                              | 81 |

|   |     |
|---|-----|
| 5.2.3. Testes realizados com eritrócitos humanos (hemólise) .....   | 95  |
| 5.2.4. Testes realizados com neutrófilos .....  | 97  |
| 6. Conclusão .....  | 109 |
| 7. Referencias .....  | 110 |
| Apêndice A – Modelo do Termo de consentimento livre e esclarecido e Termo de<br>doação assinado pelos doadores..... | 123 |

## Lista de Abreviaturas

**ANS:** Sal de magnésio do ácido 8-Anilino-1-naftaleno sulfônico

**DAG:** Inibidor diacilglicerol

**DG:** Dansilglicina

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**DNSA:** Dansilamida

**EFS:** Espectroscopia de fluorescência sincronizada

**EFT:** Espectroscopia de fluorescência total

**EROs:** Espécies reativas de oxigênio

**FMLP:** formil-metionil-leucil-fenilalanina

**IV:** Infravermelho

**LPMN:** Leucócitos polimorfonucleares

**MDA:** Malondialdeído

**MEV:** Microscópio eletrônico de varredura

**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**NPs:** Nanopartículas

**Phe:** Fenilalanina

**PKC:** Proteína quinase C

**PMA:** Forbol miristato acetato

**S<sub>0</sub>:** Estado eletrônico fundamental singlete

**S<sub>1</sub>:** Primeiro estado eletrônico singlete

**S<sub>2</sub>:** Segundo estado eletrônico singlete

**T<sub>1</sub>:** Primeiro estado eletrônico triplete

**Trp:** Triptofano

**Tyr:** Tirosina

**UV:** Ultravioleta

**UV-Vis:** Ultravioleta-visível

## Lista de Figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Estrutura cristalina do ZnO na fase hexagonal wurtizita. As esferas cinzas representam os átomos de oxigênio e as esferas pretas representam os átomos de zinco (Jagadish et al, 2006).....  | 6  |
| <b>Figura 2.</b> Estrutura cristalina do ZnO na fase rock-salt. As esferas cinzas representam os átomos de oxigênio e as esferas pretas representam os átomos de zinco (Jagadish et al, 2006).....  | 7  |
| <b>Figura 3.</b> Estrutura cristalina do ZnO na fase zinc-blende. As esferas cinzas representam os átomos de oxigênio e as esferas pretas representam os átomos de zinco (Jagadish et al,2006).....   | 7  |
| <b>Figura 4.</b> Diagrama esquemático demonstrando a evolução morfológica de Zn(OH) <sub>2</sub> para ZnO devido ao efeito da sonicação.(Zak et al, 2013).....  | 13 |
| <b>Figura 5.</b> Figura que ilustra os raios X chegando na amostra com a mesma fase e sendo “refletidos” pelo efeito de difração nos planos, onde “d” é a distância entre os planos atômicos e “ $d\sin\theta$ ” é a diferença de caminho entre os raios provenientes de diferentes planos cristalinos. (Cullity, 2001) ..... | 14 |
| <b>Figura 6.</b> Esquema representativo de um equipamento de difração de raios X (Stout, 1989) .....  | 17 |
| <b>Figura 7.</b> Diagrama parcial de níveis de energia para um sistema fotoluminescente (Skoog, 2006).....  | 26 |
| <b>Figura 8.</b> Esquema para os espalhamentos: a) Raman, b) Rayleigh (Sala, 2008). ...   | 30 |
| <b>Figura 9.</b> Estrutura da albumina indicando a subdivisão em domínios (I-III) e subdomínios (A e B) e as localizações aproximadas dos sítios de ligação (Yamasaki, et. al., 2013). .....  | 34 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 10.</b> Espectros de absorbância e fluorescência dos aminoácidos triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe). Trp: $\lambda_{ex}$ = 295nm, $\lambda_{em}$ =353nm; Tyr: $\lambda_{ex}$ = 275nm, $\lambda_{em}$ = 304nm; Phe: $\lambda_{ex}$ = 260nm, $\lambda_{em}$ = 282nm. As estruturas dos aminoácidos são observadas na parte inferior (Ayme, 2014)..... | 38 |
| <b>Figura 11.</b> Modelo de estímulo-resposta no neutrófilo levando a degranulação (Smolen e Boxer, 1995).....   | 43 |
| <b>Figura 12.</b> Atuação da NADPH oxidase na geração do radical ânion superóxido no fagossomo (Adaptado de: Costa, 2003).....   | 44 |
| <b>Figura 13.</b> Representação esquemática de um tubo para a separação de células polimorfonucleares após a centrifugação (Adaptado de: Paracatu, 2012) .....   | 61 |
| <b>Figura 14.</b> Imagem representativa a) Câmara de Neubauer, b) Representação dos 4 quadrantes utilizados para a contagem de leucócitos (representados com a letra L) (Adaptado de: Faria, 2014).....  | 61 |
| <b>Figura 15.</b> Difratoograma experimental comparado com o difratoograma da ficha catalográfica do software Search-Match. ....   | 67 |
| <b>Figura 16.</b> Comparação dos difratogramas em diferentes tempos de síntese.....  | 68 |
| <b>Figura 17.</b> Espectros das sínteses realizadas em diferentes tempos em comparação com o óxido de zinco comercial. ....  | 69 |
| <b>Figura 18.</b> Espectro de uv-vis encontrado na literatura para o óxido de zinco (Zak <i>et al</i> , 2013). ....  | 70 |
| <b>Figura 19.</b> Comparação dos espectros de óxido de zinco sintetizados em diferentes tempos.....  | 73 |
| <b>Figura 20.</b> Espectro de FT-IR encontrado por Zhang e colaboradores (2009) .....  | 74 |
| <b>Figura 21.</b> Imagem de MEV com aumento de 15000 vezes para a amostra comercial .....  | 75 |



- Figura 22.** Imagem de MEV com aumento de 15000 vezes para a amostra sintetizada sem sonicação .....76
- Figura 23.** Imagem de MEV com aumento de 15000 vezes para a amostra sintetizada com 10 minutos de sonicação .....76
- Figura 24.** Imagem de MEV com aumento de 15000 vezes para a amostra sintetizada com 40 minutos de sonicação .....77
- Figura 25.** Imagem de MEV com aumento de 15000 vezes para a amostra sintetizada com 60 minutos de sonicação .....77
- Figura 26.** Imagem de MEV com aumento de 15000 vezes para a amostra sintetizada com 120 minutos de sonicação .....78
- Figura 27.** Fluorescência intrínseca da HSA e o efeito da interação com ZnO nanoestruturado. ZnO (0,1mg/mL) foi incubado com HSA (10 $\mu$ M) em PBS, pH 7.4, temperatura 37°C. **(a)** Espectro de fluorescência da HSA na presença ou ausência de ZnO após 24 horas de incubação. **(b)** Intensidade de fluorescência normalizada após 24 horas de incubação. **(c)** Espectro de fluorescência da HSA na presença ou ausência de ZnO após 168 horas de incubação. **(d)** Intensidade de fluorescência normalizada após 168 horas de incubação. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas; e os testes estatísticos realizados pelo One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey.....83
- Figura 28.** Espalhamento de luz Rayleigh em HSA e o efeito da interação com ZnO nanoestruturado. ZnO (0,1mg/mL) foi incubado com HSA (10 $\mu$ M) em PBS, pH 7.4, temperatura 37°C. **(a)** Espectro de fluorescência da HSA na presença ou ausência de ZnO após 24 horas de incubação. **(b)** Intensidade de fluorescência sincronizada após 24 horas de incubação. **(c)** Espectro de fluorescência da HSA na presença ou ausência de ZnO após 168 horas de incubação. **(d)** Intensidade de fluorescência

normalizada após 168 horas de incubação. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas. \*valor significativamente diferente quando comparado ao valor de HSA ( $p < 0,05$ ) (One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey).....85

**Figura 29.** Fluorescência sincronizada com um  $\Delta=15$  em HSA e o efeito da interação com ZnO nanoestruturado. ZnO (0,1mg/mL) foi incubado com HSA (10 $\mu$ M) em PBS, pH 7.4, temperatura 37°C. **(a)** Espectro de espalhamento da HSA na presença ou ausência de ZnO após 24 horas de incubação. **(b)** Intensidade de espalhamento normalizado após 24 horas de incubação. **(c)** Espectro de espalhamento da HSA na presença ou ausência de ZnO após 168 horas de incubação. **(d)** Intensidade de espalhamento normalizado após 168 horas de incubação. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas; e os testes estatísticos realizados pelo One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey.....87

**Figura 30.** Fluorescência sincronizada com um  $\Delta=60$  em HSA e o efeito da interação com ZnO nanoestruturado. ZnO (0,1mg/mL) foi incubado com HSA (10 $\mu$ M) em PBS, pH 7.4, temperatura 37°C. **(a)** Espectro de espalhamento da HSA na presença ou ausência de ZnO após 24 horas de incubação. **(b)** Intensidade de espalhamento normalizado após 24 horas de incubação. **(c)** Espectro de espalhamento da HSA na presença ou ausência de ZnO após 168 horas de incubação. **(d)** Intensidade de espalhamento normalizado após 168 horas de incubação. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas; e os testes estatísticos realizados pelo One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey.....88

**Figura 31.** Fluorescência da sonda ANS em HSA e o efeito da interação com ZnO nanoestruturado (0,1mg/mL) foi incubado com HSA (10 $\mu$ M) em PBS, pH 7.4, temperatura 37°C. **(a)** Espectro de fluorescência da HSA na presença ou ausência

de ZnO após 24 horas de incubação; também é possível comparar a presença e ausência do HSA interagindo com ANS. **(b)** Intensidade de fluorescência normalizada após 24 horas de incubação. **(c)** Espectro de fluorescência da HSA na presença ou ausência de ZnO após 168 horas de incubação. **(d)** Intensidade de fluorescência normalizada após 168 horas de incubação. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas; e os testes estatísticos realizados pelo One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey.....90

**Figura 32.** Fluorescência da sonda DNSA em HSA e o efeito da interação com ZnO nanoestruturado (0,1mg/mL) foi incubado com HSA (10 $\mu$ M) em PBS, pH 7.4, temperatura 37°C. **(a)** Espectro de fluorescência da HSA na presença ou ausência de ZnO após 24 horas de incubação; também é possível comparar a presença e ausência do HSA interagindo com DNSA. **(b)** Intensidade de fluorescência normalizada após 24 horas de incubação. **(c)** Espectro de fluorescência da HSA na presença ou ausência de ZnO após 168 horas de incubação. **(d)** Intensidade de fluorescência normalizada após 168 horas de incubação. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas; e os testes estatísticos realizados pelo One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey.....92

**Figura 33.** Fluorescência da sonda DG em HSA e o efeito da interação com ZnO nanoestruturado (0,1mg/mL) foi incubado com HSA (10 $\mu$ M) em PBS, pH 7.4, temperatura 37°C. **(a)** Espectro de fluorescência da HSA na presença ou ausência de ZnO após 24 horas de incubação; também é possível comparar a presença e ausência do HSA interagindo com DG. **(b)** Intensidade de fluorescência normalizada após 24 horas de incubação. **(c)** Espectro de fluorescência da HSA na presença ou ausência de ZnO após 168 horas de incubação. **(d)** Intensidade de fluorescência normalizada após 168 horas de incubação. Os resultados estão apresentados como

média e desvio padrão de triplicatas; e os testes estatísticos realizados pelo One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey.....93

**Figura 34.** Espectro de CD da HSA e o efeito da interação com ZnO nanoestruturado (0,1mg/mL) incubado com HSA (10 $\mu$ M) por 168 horas em PBS, pH 7.4, temperatura 37°C. ....94

**Figura 35.** Análise do efeito da interação com ZnO nanoestruturado (0,1mg/mL) incubado com eritrócitos à temperatura de 37°C. **(a)** Gráfico comparativo de hemólise normalizada com tempo de 24 horas de incubação **(b)** Gráfico comparativo de hemólise normalizada com tempo de 24 horas de incubação, analisando-se os resultados sem comparar com o C+ **(c)** Gráfico comparativo de hemólise normalizada com tempo de 48 horas de incubação **(d)** Gráfico comparativo de hemólise normalizada com tempo de 24 horas de incubação, analisando-se os resultados sem comparar com o C+. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas. \*(para os gráficos a e c): valor significativamente menor quando comparado ao valor de C+ ( $p < 0,05$ ) (One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey). \*(para os gráficos b e d) valor significativamente diferente quando comparado ao valor de C- ( $p < 0,05$ ) (One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey).....96

**Figura 36.** Análise do efeito da interação com ZnO nanoestruturado (0,1mg/mL) incubado com células polimorfonucleares à temperatura de 37°C. **(a)** Gráfico comparativo de dano celular em 30 minutos de incubação **(b)** Gráfico comparativo de dano celular em 60 minutos de incubação **(c)** Gráfico comparativo de dano celular em 90 minutos de incubação. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas; e os testes estatísticos realizados pelo One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey.....99

- Figura 37.** Reação química dependente do Luminol. As EROs convertem o Luminol via oxigenação em intermediários instáveis e excitados, emitindo luz na forma de fótons (Santos *et al*, 1993) ..... 100
- Figura 38.** Análise do efeito da interação com ZnO nanoestruturado (0,1mg/mL) incubado com células polimorfonucleares e Luminol à temperatura de 37°C e 30 minutos de incubação. **(a)** Curvas de luminescência obtidas no equipamento **(b)** Gráfico comparativo de valores de área abaixo da curva na excitação de polimorfonucleares através de PMA e polimorfonucleares sem estímulo \*valor significativamente menor quando comparado ao valor de C+ ( $p < 0,05$ ) (One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey). **(c)** Gráfico comparativo excitação de polimorfonucleares com ZnO e polimorfonucleares sem estímulo. \*valor significativamente menor quando comparado ao valor de C- ( $p < 0,05$ ) (One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey). Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas. .... 102
- Figura 39.** Reação química dependente da Lucigenina. A Lucigenina detecta especificamente a produção do ânion superóxido, gerando intermediários instáveis e excitados emitindo luz na forma de fótons (Schepetkin, 1999). .... 104
- Figura 40.** Análise do efeito da interação com ZnO nanoestruturado (0,1mg/mL) incubado com células polimorfonucleares e Lucigenina à temperatura de 37°C e 30 minutos de incubação. **(a)** Curvas de luminescência obtidas no equipamento **(b)** Gráfico comparativo dos valores de área abaixo da curva encontrada na excitação de polimorfonucleares através de PMA e valores sem excitação. \*valor significativamente menor quando comparado ao valor de C+ ( $p < 0,05$ ) (One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey). Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas. .... 105

**Figura 41.** Análise do efeito da interação com ZnO nanoestruturado (0,1mg/mL) incubado com células polimorfonucleares e Amplex-Red à temperatura de 37°C e 30 minutos de incubação. **(a)** Gráfico comparativo entre a estimulação de polimorfonucleares com Amplex Red e sem estimulação \*valor significativamente menor quando comparado ao valor de C+ ( $p < 0,05$ ) (One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey). **(b)** Gráfico comparativo de excitação de polimorfonucleares através de ZnO e sem excitação de polimorfonucleares. \*valor significativamente menor quando comparado ao valor de C+ ( $p < 0,05$ ) (One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey). Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas. .... 108

## Lista de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Especificações de cada uma das medidas realizadas no fluorímetro para os experimentos com HSA .....  | 54 |
| <b>Tabela 2.</b> Comparação do rendimento frente ao tempo de sonicação da síntese ....  | 66 |
| <b>Tabela 3.</b> Valor de comprimento de onda para o máximo de absorbância ( $\lambda_{\max}$ ) e valores de energia de gap ( $E_{\text{gap}}$ ) calculado para cada uma das amostras (comercial e sintetizada em diferentes tempos)..... | 72 |
| <b>Tabela 4.</b> Resultados obtidos de comprimento e largura para as diferentes sínteses de óxido de zinco .....  | 79 |

## 1. Introdução

O número de produtos contendo materiais nanoparticulados vem crescendo constantemente nas últimas décadas. No início de 2014, por exemplo, cerca de 1800 produtos de consumo foram reportados contendo esse tipo de materiais (CPI, 2014), e utilizados em produtos que variam desde equipamentos esportivos até aditivos alimentícios e até mesmo em brinquedos. As nanopartículas também têm um grande potencial na área de aplicações biomédicas como carreadores de medicamentos, diagnósticos, quimioterapia e biossensores (Beddoes *et al*, 2015). As nanopartículas baseadas em metais (metálicas, ligas e de óxidos metálicos) vêm sendo cada vez mais estudadas devido uma grande quantidade de aplicações nas mais diversas áreas e campos. Uma das áreas em que estão sendo amplamente estudadas é na medicina, pois essas nanopartículas apresentam uma série de características interessantes como nanomagnetismo, fluorescência para semicondutores e aumento da emissão de fótons e absorbância de metais nobres. Um exemplo interessante de uma aplicação desses materiais em biomedicina é, por exemplo, a incorporação de uma resposta magnética em uma nanopartícula designada a ser um carreador de medicamentos, pois isso permite que a mesma seja direcionada magneticamente para o sítio contaminado, fazendo da mesma uma terapia de alvo, o que pode reduzir as dosagens e a toxicidade para o resto do corpo. Além disso, uma característica magnética pode abrir possibilidades de sua utilização como agente diagnóstico. Nanopartículas metálicas são excelentes para ferramentas de diagnóstico em exames de ressonância magnética por imagem, uma vez que a interação entre o campo magnético pode acarretar um significativo contraste *in vivo* (Bain *et al*, 2015).



O impacto desse aumento da exposição a esses materiais nanoparticulados para os sistemas biológicos e para o meio ambiente ainda precisa ser compreendido. Como essas nanopartículas têm, em geral, diferentes propriedades, quando comparadas ao mesmo material em tamanho micro, seu impacto biológico é imprevisível. Isso faz com que não possamos explorar completamente suas propriedades sem antes conhecer os riscos que as mesmas possam causar (Nel *et al*, 2006; Maynard, 2006; Arora *et al*, 2012). Efeitos citotóxicos resultantes da interação entre nanopartículas e materiais biológicos têm se mostrado variáveis, podendo ocorrer desde a translocação e ruptura da membrana celular, até mesmo na produção de moléculas altamente reativas podendo causar morte celular (Madl *et al*, 2014; Gong *et al*, 2014; Beddoes *et al*, 2015).

Há algum tempo, pesquisadores estão tentando encontrar uma relação entre tamanho e morfologia das nanopartículas e seus efeitos biológicos. Nie e colaboradores (2006) realizaram um trabalho onde compararam diferentes morfologias nanoestruturadas de óxido de zinco com revestimento de sílica e observaram a sua citotoxicidade e também sua eficiência no carregamento em DNA. Quando se comparou a biocompatibilidade desses materiais, observou-se que as nanotetrapodes mostraram uma menor citotoxicidade, porém uma menor eficiência em relação a nanoesferas. Quando comparado nanotetrapodes com nanohastes, a primeira mostrou uma menor citotoxicidade e uma melhor eficiência de transferência. Isso ocorreu devido à geometria de tetrápodes terem um maior impedimento estérico, o que aumentou a dificuldade dessas nanoestruturas em passar pela membrana celular. Mais recentemente El-Zhary e colaboradores (2015) realizaram um

estudo comparativo da ação bactericida de nanopartículas de prata em diferentes formatos (esférico, triangular e hexagonal), porém todos com o mesmo tamanho (40 nm). Utilizando espectroscopia Raman para monitorar as mudanças, concluíram que a morfologia hexagonal foi a de maior eficiência e que a morfologia triangular não apresentou ação bactericida.

Considerando o exposto e a larga aplicação de nanopartículas de ZnO em diversos dispositivos com aplicação *in vivo*, este trabalho se justifica no sentido de contribuir para o aprofundamento do conhecimento sobre como a morfologia dessas partículas poderia afetar as propriedades estruturais e funcionais da albumina sérica humana e células presentes na corrente sanguínea. Tais informações poderão ser úteis àqueles que pretendem aplicar estes materiais em modelos experimentais *in vivo*.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Nanopartículas

A nanotecnologia é um conjunto de procedimentos para a manipulação e compreensão da matéria, como: design, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas, controlando a forma e o tamanho em escala nanométrica para fins práticos (Parker, 2000; Hamilla *et al*,1995).

Um material é considerado nanométrico quando pelo menos uma de suas dimensões no espaço apresentam-se na escala de 1 a 100 nm, recebendo a denominação de nanomaterial ou nanopartículas. Quando se trata de escalas nanométricas, as propriedades físico-químicas dos materiais mudam consideravelmente, quando comparado aos materiais de mesma composição química, na forma de *bulk*, exigindo estudos específicos. Assim, surge o termo nanociência ao estudo dessas novas propriedades da matéria (Parker, 2000; Andreas e Parvez, 2009).

As nanopartículas (NPs) podem ser constituídas de diferentes materiais, tais como: polímeros orgânicos, lipossomas, ouro, carbono, silício, óxidos semicondutores, entre outros, possuindo aplicações em diferentes campos. Apresenta grande desenvolvimento científico, principalmente nas áreas de óptica, catálise heterogênea, magnetismo e marcadores biológicos (Souza *et al*, 2009).

Dentre os marcadores com propósito para aplicação na área clínica, os desenvolvidos para ensaios biomoleculares são de grande importância nos

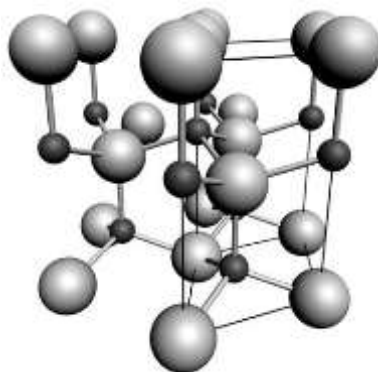
campos da química, biologia e ciência médica. Esses ensaios são utilizados no estudo de funções biológicas e como métodos de detecção ultrasensíveis de espécies biológicas. A exigência por sistemas altamente sensíveis, como o sequenciamento de DNA e diagnóstico clínico, trouxe os nanomateriais para o campo biomédico e biotecnológico. As proteínas, por exemplo, possuem tamanho médio de 5 nm, comparável com dimensões de nanopartículas sintetizadas, dando-nos uma ideia de como essas nanopartículas podem ser usadas como sondas biológicas sem causar grandes interferências nos sistemas biomoleculares (Lima e Andrade, 2012; Paganini, 2012).

## **2.2. Óxido de zinco**

O óxido de zinco (ZnO) é um material amplamente utilizado em nossa sociedade para diversas finalidades, entre elas, a produção de borracha, cerâmica, vidros, tintas, revestimentos, fertilizantes, cosméticos, medicamentos e lubrificantes. O ZnO utilizado em dispositivos eletrônicos data da década de 30 (Bum, 1935; Mercurio, 2009). O ZnO é um semicondutor do tipo-n com uma energia de gap larga ( $E_g \sim 3,4\text{eV}$  à 300K) e, atualmente, é utilizado em diversas aplicações, como o branco nos pigmentos, revestimentos anticorrosivos e antibactericidas, na área odontológica juntamente com o óxido de ferro III para utilização em restaurações odontológicas, entre outras.

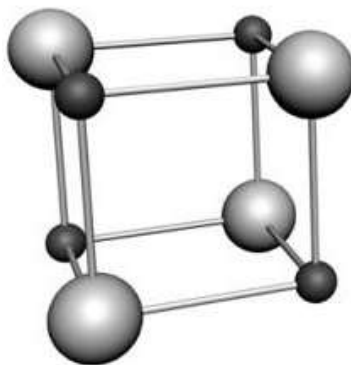
O ZnO possui uma fase estável, com estrutura cristalina hexagonal tipo wurtzita pertencente ao grupo espacial  $P6_3mc$ . A estrutura é composta por íons  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{O}^{2-}$ , onde cada átomo de Zn está no centro de um tetraedro

formado por átomos de O nos vértices e vice-versa. A estrutura wurtzita é mostrada na Figura 1.



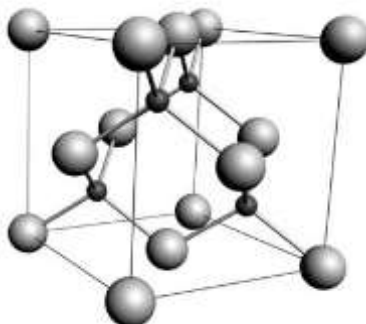
**Figura 1.** Estrutura cristalina do ZnO na fase hexagonal wurtzita. As esferas cinzas representam os átomos de oxigênio e as esferas pretas representam os átomos de zinco (Jagadish et al, 2006).

O ZnO pode apresentar a fase cúbica “*rock-salt*” (Figura 2) mediante a aplicação de pressões elevadas na ordem de 10GPa, com redução de volume de aproximadamente 17% para a transição completa. A estrutura pertence ao grupo espacial  $Fm_3m$ , onde cada átomo de Zn possui como vizinhos seis átomos de oxigênio equidistantes e vice-versa.



**Figura 2.** Estrutura cristalina do ZnO na fase rock-salt. As esferas cinzas representam os átomos de oxigênio e as esferas pretas representam os átomos de zinco (Jagadish et al, 2006).

O ZnO também pode apresentar a fase “zinc-blende” (Figura 3) pertencente ao grupo espacial  $F\bar{4}3m$ . A fase é metaestável e pode ser obtida através do crescimento em substratos cúbicos (ZnS, Si). A estrutura é formada por duas redes cúbicas de corpo centrado interpenetradas, deslocadas da fração de  $\frac{1}{4}$  ao longo da diagonal principal. Possui 8 átomos por célula unitária, onde cada átomo da rede possui coordenação tetraédrica (Ozgur, 2005; Mercurio, 2009).



**Figura 3.** Estrutura cristalina do ZnO na fase zinc-blende. As esferas cinzas representam os átomos de oxigênio e as esferas pretas representam os átomos de zinco (Jagadish et al, 2006).

Atualmente, existem diversos métodos para a obtenção de ZnO, entre eles, os mais utilizados são:

- Pirólise de Spray, onde o óxido é obtido fazendo-se incidir a solução precursora (que contém os elementos de partida que formarão o óxido) em forma de spray sobre um substrato aquecido onde ocorre a reação química (Alver *et al*, 2007).

- Reação por combustão via líquida, onde o pó de ZnO é obtido da combustão do precursor em forma líquida, na qual o processo ocorre de forma rápida uma vez que o precursor atinge a temperatura de ignição (Sousa *et al*, 1999).

- Síntese hidrotérmica, onde o material é obtido a partir do aquecimento de precursores em meio líquido em autoclaves com atmosfera e pressão controladas (Sue *et al*, 2004).

- Secagem por spray é uma técnica muito utilizada na indústria para a obtenção de pós em grande quantidade e com homogeneidade. Neste processo, a solução precursora é pulverizada por um jato de ar quente para a obtenção do pó (Puyane *et al*, 1998).

Diversos métodos foram desenvolvidos como alternativas para sintetizar óxido de zinco nanoestruturado com diferentes morfologias e tamanhos. Por exemplo, o método hidrotermal produz diferentes nanoestruturas de óxido de zinco em uma temperatura relativamente baixa (abaixo de 200°C) utilizando-se de equipamentos simples; porém, o tempo de

reação é grande para a produção em escala nanométrica (pode-se chegar a dias de reação). Assim sendo, o desenvolvimento de uma síntese rápida e eficiente e com um bom controle do óxido de zinco nanoestruturado produzido e em temperatura ambiente vem sendo estudado. O método sonoquímico está sendo apontado como uma alternativa promissora para a fabricação de óxido de zinco nanoestruturado em condições ambientais (Jung *et al*, 2008).

A evolução da tecnologia de processamento de materiais possibilita o desenvolvimento de métodos para a confecção de materiais nanoestruturados, monocristais e nanopartículas. Diversas pesquisas nesses materiais baseados em ZnO têm sido realizadas com grandes perspectivas para aplicações tecnológicas. As possibilidades de utilização para nanoestruturas baseadas em ZnO são as mais diversas e são mais comumente encontradas na confecção de filmes finos flexíveis para dispositivos optoeletrônicos e sensores (Weintraub *et al*, 2008; Mitzner *et al*, 2003; Mercurio, 2009).

### **2.3. Ultrassom e síntese de materiais pelo método sonoquímico**

O desenvolvimento de sistemas sob influência dessas ondas ultrassônicas está relacionado com o fenômeno denominado cavitação.

As ondas ultrassônicas de alta potência (<1W a milhares de  $W.cm^{-2}$ ), podem causar permanente mudança física e química devido cavitação e



microfluxos nos líquidos; aquecimento e ruptura nos sólidos; e instabilidade na superfície da interface de sistemas líquido-líquido e líquido-gás.

Na sonda ultrassônica, a fonte de energia ultrassônica é uma cerâmica piezoelétrica disposta entre duas chapas metálicas. Esse sistema constitui o transdutor piezoelétrico. O gerador de frequência transmite um sinal à cerâmica piezoelétrica, que transforma ondas elétricas em ondas mecânicas; as chapas metálicas amplificam esses sinais, o transdutor transmite os impulsos ultrassônicos ao meio reacional. A sonda ultrassônica encontra-se fixada na extremidade do amplificador do transdutor, em contato direto com o sistema reacional. O efeito das ondas ultrassônicas resulta em mudanças físicas e químicas, como aumento a área superficial das partículas e mudança da morfologia das mesmas. (Barboza e Serra, 1992).

A propagação das ondas ultrassônicas no meio reacional origina uma variação de pressão, a qual é responsável pela cavitação. A cavitação é a criação e implosão de microbolhas de gás no centro do líquido. A variação de pressão cria, em um ponto do líquido, momentos de compressão e decompressão alternados. Se houver uma diminuição de pressão suficiente, pode-se observar a formação de bolhas no centro do líquido, devido ao rompimento das forças de coesão molecular. Dois elementos são importantes no processo: a presença de um gás dissolvido (que enche as bolhas) e a presença de partículas em suspensão, que diminuem a força de coesão molecular (Barboza e Serra, 1992).

A cavitação acústica envolve três estágios (Flynn, 1964; Bremmer, 1990): formação de núcleos de cavitação, crescimento das bolhas e violenta

implosão. Uma vez iniciada a cavitação, dois tipos de bolhas podem ser formadas (Flynn, 1964): as bolhas de cavitação estáveis, que oscilam periodicamente no meio e possuem tempo de vida grande, de alguns ciclos. Seu volume cresce por penetração do gás dissolvido no meio, quando na fase de descompressão. Ao atingirem uma dimensão crítica, podem tornar-se transitórias, que tem um tempo de vida curto. Seu volume cresce por penetração do gás dissolvido na fase de descompressão e elas implodem na fase de compressão, quando alcançam uma dimensão crítica, e são responsáveis pela cavitação.

No momento da implosão das bolhas, há formação de ondas de choque e ao final, no centro da bolha, espera-se temperatura e pressão muito elevadas (na ordem de 10.000 K e 1000 atm) (Bremmer, 1990). Essas altas temperaturas e pressão alcançadas são a origem dos radicais (Barboza e Serra, 1992).

Autores já demonstraram na literatura a existência de duas regiões de reatividade sonoquímica quando se estuda a influência das ondas ultrassônicas no meio homogêneo. Uma corresponde à fase gasosa dentro da bolha e a outra é uma fina camada líquida ao redor da bolha. A zona gasosa também é conhecida como “ponto quente” (hot spot). A destruição da bolha se inicia no “hot spot” e, assim, a eficiência da implosão da bolha depende da volatilidade do solvente.

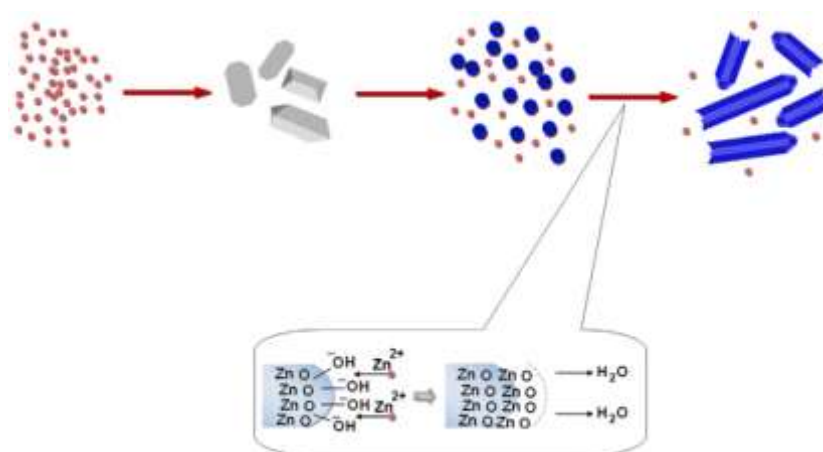
Nos sistemas heterogêneos, na interface sólido-líquido, a natureza da destruição das bolhas apresenta-se diferente. Ela se faz de forma não simétrica, dando origem a um jato de líquido dirigido para a superfície sólida.

Esse jato de líquido pode causar erosão localizada e, provavelmente, é o responsável pela corrosão na extremidade da sonda. Além disso, microfluxos de líquidos são formados devido à absorção de grande quantidade de energia vibracional dentro de pequeno volume, com pouco ou nenhum aquecimento associado. Isso favorece o transporte de massa entre a fase líquida e a superfície sólida, contribuindo para a aceleração da velocidade da reação observada.

Foram nos sistemas heterogêneos que foram observados primeiramente os efeitos emulsificantes e homogeneizantes das ondas ultrassônicas, como formação de emulsão água-óleo. Mais recentemente iniciou-se uma discussão sobre o poder da sonoquímica para quebrar ligações químicas a partir de uma frequência de 20Hz e a partir disso tentar discutir os produtos obtidos com a radiação ultrassônica em ciências dos materiais (Barboza e Serra, 1992).

A síntese sonoquímica pode resultar em produtos nanoestruturados. Em casos onde o solvente é volátil, pode haver a geração de um produto amorfo. Porém, quando utilizados solventes não voláteis ao processo sonoquímico, é possível a obtenção de um produto cristalino, com raras exceções. Uma das grandes vantagens desse método de síntese é a possibilidade de obtenção dos produtos em diferentes morfologias. Primeiramente, foi possível a obtenção de produtos esféricos (ou próximos a esferas). Mas ao longo dos anos, diversos grupos de pesquisa vêm conseguindo morfologias como nanotubos, nano-hastes, nanoagulhas, produtos semelhantes a fulerenos, esferas ocas e muitos outros (Gedanken, 2004).

Para a formação do óxido de zinco sabe-se que primeiramente ocorre a formação de cristais  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ , porém os mesmos não são estáveis sob sonicação e ocorre a sua transformação para  $\text{ZnO}$  (em diferentes morfologias), como pode ser observado na Figura 4 (Zak *et al*, 2013).



**Figura 4.** Diagrama esquemático demonstrando a evolução morfológica de  $\text{Zn}(\text{OH})_2$  para  $\text{ZnO}$  devido ao efeito da sonicação. (Zak *et al*, 2013)

## 2.4. Caracterização de óxidos nanoparticulados

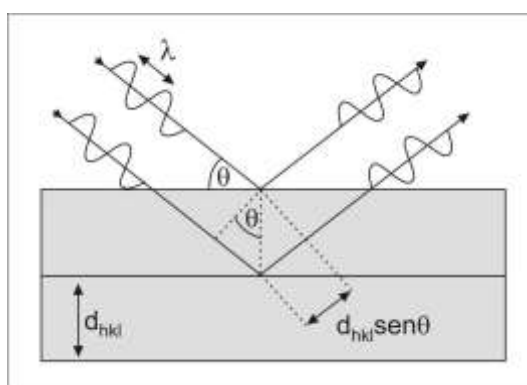
### 2.4.1. Difração de raios x

A caracterização das amostras pela técnica de difração de raios X traz informação sobre a estrutura cristalina do material obtido, bem como indicações da composição da amostra (Mercurio, 2009).

Os raios X ao atingirem um material podem ser espalhados elasticamente, sem perda de energia pelos elétrons de um átomo. O fóton de raios X após a colisão com o elétron, muda sua trajetória, mantendo, porém, a

mesma fase e energia do fóton incidente. Sob o ponto de vista da física ondulatória, pode-se dizer que a onda eletromagnética é instantaneamente absorvida pelo elétron e reemitida. Pode-se dizer então, que cada elétron atua como centro de emissão de raios X.

Se os átomos que compõem o material estiverem arranjados de maneira ordenada, como em uma estrutura cristalina, apresentando entre eles dimensões próximas ao do comprimento de onda da radiação incidente, pode-se verificar a ocorrência de relações de fase, os espalhamentos, tornam-se periódicas e que efeitos de difração dos raios X podem ser observados em vários ângulos. Considerando-se dois ou mais planos de uma estrutura cristalina, as condições para que ocorra a difração de raios X (interferência construtiva ou numa mesma fase) vão depender da diferença de caminho óptico percorrida pelos raios X e o comprimento de onda da radiação incidente, como pode ser observado na Figura 5.



**Figura 5.** Figura que ilustra os raios X chegando na amostra com a mesma fase e sendo “refletidos” pelo efeito de difração nos planos, onde “d” é a distância entre os planos atômicos e “ $d \sin \theta$ ” é a diferença de caminho entre os raios provenientes de diferentes planos cristalinos.

(Cullity, 2001)

A ocorrência de interferência construtiva entre ondas espalhadas obedece à condição de Bragg (Equação 1):

$$2d\sin\theta = n\lambda \quad (1)$$

Onde:

$\theta$  é o ângulo de incidência

$d$  é a distância interplanar

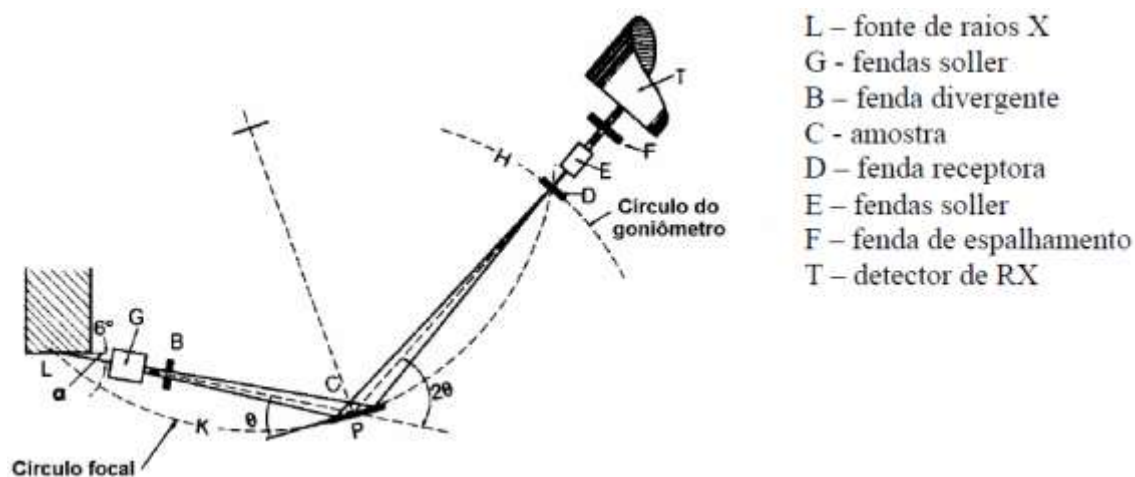
$\lambda$  é o comprimento de onda.

Os raios x são gerados da interação de um elétron de alta energia (gerado por emissão termoiônica em um cátodo) com um alvo metálico (anodo, geralmente feitos de Cu, Cr, Fe e Mo). O espectro da radiação gerado a partir do tubo de raios x não é monocromático e apresenta tanto a radiação característica do material (espectro contínuo) a ser analisado como o material do ânodo ( $K\alpha$ ,  $K\beta$ , etc). Porém, é necessário se empregar uma radiação monocromática, então é necessário se remover a radiação referente à linha  $K\beta$  e também parte do espectro contínuo emitido pelo tubo. Duas alternativas podem ser consideradas para tanto: a primeira considera a utilização de filtros, cujas bandas de absorção de radiação permitam a passagem da radiação referente à linha  $K\alpha$  e a remoção (absorção) da linha  $K\beta$ . Uma outra alternativa consiste na utilização de um filtro monocromador, situado na passagem dos raios X entre a amostra e o detector ou entre o tubo e a amostra, o qual,

através do princípio da difração de Bragg, permite exclusivamente a passagem da radiação e o comprimento de onda de interesse ( $K\alpha$ ) (Stout, 1989).

Os difratômetros de raios X disponíveis no mercado apresentam seu arranjo geométrico básico pode constituir-se de um goniômetro horizontal ( $\theta$ - $2\theta$ ) ou vertical ( $\theta$ - $2\theta$  ou  $\theta$ - $\theta$ ). Como pode ser observado na Figura 6, o goniômetro acoplado aos acessórios de recepção do feixe difratado move-se com velocidade angular ( $2\theta$ /passo) sobre o eixo P e rotacional à amostra C, com metade dessa velocidade angular ( $\theta$ /passo). O raio do círculo do goniômetro é fixo, apresentando iguais distâncias do tubo gerador de raios X à amostra e da amostra à fenda de recepção D ( $LP=PD$ ). O plano do círculo focal contém os raios incidente e difratado, isto é, a fonte, a amostra e a fenda de recepção (Cullity, 2001; Stout, 1989, Teixeira, 2013).

A partir da fonte, os raios X atravessam a fenda soler ou colimadores paralelos (G), a fenda de divergência (B) e irradiam a superfície da amostra (C). Os raios difratados em determinado ângulo  $2\theta$  convergem para a fenda de recepção (D). Antes ou depois da fenda de recepção pode ser colocado um segundo conjunto de colimadores (E) e uma fenda de espalhamento F. Um monocromador do feixe difratado pode ser colocado após a fenda de recepção, na posição da fenda de espalhamento.



**Figura 6.** Esquema representativo de um equipamento de difração de raios X (Stout, 1989)

Na prática, o feixe de raios x é focalizado na amostra, fazendo-se variar o ângulo de incidência da radiação e a detecção da radiação espalhada para cada ângulo. Dos resultados de intensidade difratada em função de um ângulo de espalhamento  $2\theta$  (entre a onda incidente e espalhada), é obtido um espectro, chamado de difratograma. Este padrão de difração obtido é único para cada tipo de cristal. Desta forma, torna-se possível a caracterização do material estudado quanto a sua estrutura cristalina (Cullity, 2001; Peiser *et al*, 1955; Mercurio, 2009).

#### 2.4.2. Microscópio eletrônico de varredura

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um aparato experimental que pode gerar imagens com a ampliação superiores a 30.000 vezes. As imagens são formadas a partir da transcodificação da radiação emitida dos elétrons com a amostra. O feixe de elétrons é produzido por



aquecimento de um filamento de tungstênio através da passagem de corrente elétrica. Com a aplicação de uma diferença de potencial (que varia de 0,5 a 30kV) entre o filamento aquecido e o outro eletrodo positivo, os elétrons são acelerados no tubo do microscópio onde é feito alto vácuo. A correção da trajetória do feixe é feita pelas lentes magnéticas condensadoras constituídas por bobinas que orientam o feixe na direção da lente objetiva, que tem a finalidade de focalizar o feixe de elétrons em uma região específica da amostra analisada (Ludwing, 1998; Mercurio, 2009).

## **2.5. Métodos espectroscópicos**

### **2.5.1. Radiação eletromagnética**

Segundo Skoog e colaboradores (2006), a radiação eletromagnética pode ser descrita como uma onda com propriedades como comprimento de onda, frequência, velocidade e amplitude. Em contraste com as ondas sonoras, a luz não requer nenhum meio de suporte para a sua transmissão; assim, ela facilmente passa pelo vácuo.

O modelo ondulatório falha quando se considera os fenômenos associados com absorção e emissão de energia radiante. Para esses processos, a radiação eletromagnética pode ser tratada como pacotes discretos de energia ou partículas chamadas fótons ou quanta. Essas formas de visualizar a radiação como partículas e como ondas não são mutuamente excludentes, mas sim complementares. Assim sendo, a energia de um fóton é diretamente proporcional à sua frequência. De forma similar, essa dualidade se

aplica aos feixes de elétrons, prótons e outras partículas elementares, as quais podem produzir efeitos de interferência e difração que são tipicamente associados a um comportamento ondulatório (Skoog *et al*, 2006).

### **2.5.2. Interação da radiação com a matéria**

Os tipos de interação mais utilizados em espectroscopia envolvem transições entre diferentes níveis energéticos das espécies químicas. Outros tipos de interações, como reflexão, refração, espalhamento elástico, interferência e difração, são frequentemente mais relacionados com alterações das propriedades físicas dos materiais do que com os níveis energéticos de moléculas ou átomos específicos. Embora essas interações globais sejam também de interesse da espectroscopia, aqui limitaremos nossa discussão àquelas que envolvem transições de níveis energéticos. Os tipos específicos de interações que observamos dependem fortemente da energia da radiação empregada e o modo de detecção (Skoog *et al*, 2006).

Métodos espectroscópicos, que utilizam não somente a radiação visível, como também a ultravioleta e a infravermelha, são frequentemente denominados métodos ópticos, mesmo a despeito do fato de que o olho humano não seja sensível a nenhum desses tipos de radiação (Skoog *et al*, 2006).

### 2.5.3. Medidas espectroscópicas

Em medidas espectroscópicas observa-se as interações da radiação com a matéria para obter informações sobre uma amostra. A amostra é geralmente estimulada, aplicando-se alguma forma de energia (como calor, energia elétrica, luz, partículas ou por uma reação química). Antes de aplicar o estímulo, o analito se encontra predominantemente em seu estado de energia mais baixo ou estado fundamental. O estímulo resulta em algumas espécies do analito sofrendo uma transição para um estado de maior energia ou estado excitado. É possível a obtenção de informações sobre o analito medindo-se a radiação eletromagnética emitida quando este retorna ao estado fundamental ou a quantidade de radiação eletromagnética absorvida decorrente da excitação.

A medida da potência radiante emitida quando o analito retorna ao estado fundamental pode fornecer informações sobre a sua identidade e concentração. Os resultados dessas medidas são frequentemente expressos por meio do espectro, que se refere a um gráfico da radiação emitida em função da frequência ou do comprimento de onda.

Quando a amostra é estimulada pela aplicação de uma fonte de radiação eletromagnética externa, a mesma pode ser espalhada ou refletida. Além disso, uma parte da radiação incidente pode ser absorvida e promover algumas espécies do analito para o estado excitado. Na espectroscopia de absorção, medimos a quantidade de luz absorvida em função do comprimento de onda; isso pode fornecer tanto informações qualitativas como quantitativas

sobre a amostra. Na espectroscopia de fotoluminescência, a emissão de fótons é medida após a absorção.

#### **2.5.4. Espectroscopia de absorção de luz na região do ultravioleta e visível**

A espectroscopia de absorção de luz na região do ultravioleta (200-400nm) e visível (400-800nm) permite a identificação de transições de elétrons dos orbitais moleculares,  $\sigma$ ,  $\pi$  e  $n$  de seu estado energético fundamental para orbitais de maior energia em um estado excitado (Skoog *et al*, 2006).

A técnica de UV-Vis consiste na emissão de ondas eletromagnéticas na faixa do ultravioleta e da luz visível nas amostras estudadas. A partir da absorção dessas ondas pelo material, é possível detectar a presença de compostos orgânicos e inorgânicos (Skoog *et al*, 2006).

#### **2.5.5. Infravermelho**

A radiação infravermelha apresenta níveis de energia entre a região do visível e a de micro-ondas, e geralmente não possui energia suficiente para causar transições eletrônicas, porém pode induzir transições nos estados vibracionais e rotacionais associados com o estado eletrônico fundamental da molécula. A região de maior interesse para esse tipo de técnica está entre 4000 a  $400\text{ cm}^{-1}$ . Essa técnica viabiliza a análise qualitativa de grupos reativos como, por exemplo, COOH, OH-fenólico, OH-enólico, C=O, -NH<sub>2</sub>, etc e de

componentes aromáticos e alifáticos, além de compostos inorgânicos (Stevenson, 1994).

Em um espectrofotômetro de infravermelho, a porcentagem de radiação transmitida pela amostra num intervalo de comprimento de onda de 2,5 a 25  $\mu\text{m}$  é registrada, resultando em um espectro contínuo de bandas de absorção. Usualmente, no espectro de infravermelho (IV) está relacionada a transmitância (ou absorbância) em função do número de onda, expresso em  $\text{cm}^{-1}$  (Silverstein, 1994).

O espectro de IV é característico da molécula como um todo, porém certos grupos funcionais dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência independentemente da estrutura do resto da molécula. Devido à presença dessas bandas características de grupos funcionais, é possível obter informações sobre a estrutura das moléculas (Pigatin, 2011).

Os instrumentos com transformada de Fourier (FTIR) não apresentam nenhum elemento dispersivo e todos os comprimentos de onda são detectados e medidos simultaneamente. As análises de FTIR têm sido tradicionalmente utilizadas para identificar grupos funcionais como: grupos carboxila, amina, hidroxila, carbonila e outros (Schnitzer, 1972; Stevenson, 1994).

#### **2.5.6. Fluorescência**

Em temperatura ambiente, a maioria das moléculas ocupa o estado vibracional de mais baixa energia, e na absorção de luz os mesmos são

elevados para a produção de estados excitados. A excitação pode resultar na molécula alcançar qualquer subnível vibracional associado com cada estado eletrônico. Desde que a energia é absorvida como energia discreta, isso pode resultar em uma série de bandas de absorção distintas. Portanto, a maioria dos compostos tem um amplo espectro de absorção, exceto por aqueles que os níveis rotacionais são restritos (por exemplo, estruturas planares e compostos aromáticos) (Rhys Williams, 1982).

A fluorescência ocorre em sistemas químicos gasosos, líquidos e sólidos, que podem ser simples ou complexos. O tipo mais simples de fluorescência é aquela apresentada por vapores diluídos atômicos. Por exemplo, os elétrons 3s dos átomos de sódio vaporizados podem ser excitados para o estado 3p pela absorção da radiação de comprimentos de onda 589,6 e 589,0nm. Após cerca de  $10^{-8}$ s, os elétrons retornam ao estado fundamental, emitindo radiação dos mesmos dois comprimentos de onda em todas as direções. Esse tipo de fluorescência, na qual a radiação absorvida é reemitida sem mudança da frequência, é conhecida como radiação ressonante ou fluorescência de ressonância (Skoog, 2006).

#### **2.5.6.1. Spin eletrônico**

O princípio da exclusão de Pauli estabelece que, em um átomo, dois elétrons não podem ter o mesmo valor dos quatro números quânticos. Essa restrição exige que não mais do que dois elétrons possam ocupar um orbital e, além disso, os dois devem ter estados de spin opostos. Nessa circunstância, diz-se que os spins estão emparelhados. Devido ao emparelhamento do spin, a

maioria das moléculas não apresenta um campo magnético resultante, sendo então denominadas diamagnéticas – isto é, elas não são atraídas nem repelidas pelos campos magnéticos estáticos. Por outro lado, os radicais livres, que contêm elétrons desemparelhados, têm um momento magnético e, conseqüentemente, são atraídos por um campo magnético. Os radicais livres são, então, denominados paramagnéticos (Skoog, 2006).

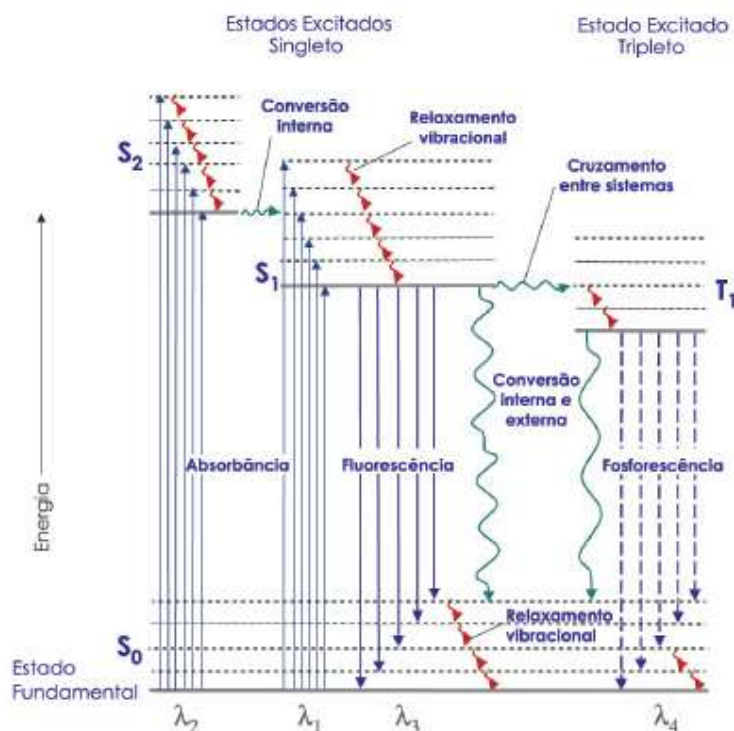
#### **2.5.6.2. Estados excitados singleto e tripleto**

Um estado eletrônico molecular no qual todos os spins eletrônicos estão emparelhados é chamado de estado singleto e, neste caso, não ocorre nenhum desdobramento dos níveis de energia eletrônicos quando a molécula é exposta a um campo magnético. O estado fundamental para um radical livre, por outro lado, é um estado duplete, porque há duas possíveis orientações para o elétron ímpar em um campo magnético, e cada uma fornece energias ligeiramente diferentes ao sistema.

Quando um dos pares de elétrons de uma molécula é excitado a um nível de energia mais alto, forma-se um estado singleto ou tripleto. No estado excitado singleto o spin do elétron promovido ainda está emparelhado com o elétron do estado fundamental. No estado tripleto, porém, os spins dos dois elétrons tornam-se desemparelhados e, portanto, paralelos. Esses estados podem ser representados na Figura 7, onde as setas representam a direção do spin. A nomenclatura de singleto, duplete e tripleto deriva de considerações espectroscópicas de multiplicidade. O estado excitado tripleto é menos energético que o correspondente estado excitado singleto.

As propriedades de uma molécula no estado excitado tripleto diferem significativamente daquelas do estado excitado singleto. Por exemplo, uma molécula é paramagnética no estado tripleto e diamagnética no singleto. Porém, o mais importante é que a transição singleto-tripeto (ou o contrário), que também envolve uma mudança no estado eletrônico, é um evento significativamente menos provável que a correspondente transição singleto-singleto. Como resultado, o tempo de vida médio de um estado excitado tripleto pode variar de  $10^{-4}$  até vários segundos, comparados com o tempo de vida médio de aproximadamente  $10^{-8}$ s para um estado excitado singleto. Além disso, a excitação induzida por radiação de uma molécula do estado fundamental para um estado excitado tripleto tem uma baixa probabilidade de ocorrência e, as bandas de absorção, devido a esse processo, são várias ordens de grandeza menos intensas que a absorção análoga singleto-singleto. Pode-se observar, entretanto, que um estado excitado tripleto pode ser ocupado a partir de um estado singleto de certas moléculas. O resultado desse processo é, frequentemente, a emissão de fosforescência (Skoog, 2006).





**Figura 7.** Diagrama parcial de níveis de energia para um sistema fotoluminescente (Skoog, 2006).

A Figura 7 é um diagrama parcial de níveis de energia chamado de diagrama de Jablonski, para uma molécula fotoluminescente típica. A linha horizontal grossa, na parte inferior do diagrama, representa a energia do estado fundamental da molécula, que é normalmente um estado singlete, e é denominada  $S_0$ . À temperatura ambiente, esse estado representa as energias da maioria das moléculas de uma solução.

As linhas grossas na parte superior indicam os níveis de energia para os estados fundamentais vibracionais de três estados eletrônicos excitados. As duas linhas à esquerda representam o primeiro ( $S_1$ ) e o segundo ( $S_2$ ) estados eletrônicos singlete. A linha à direita ( $T_1$ ) representa a energia do primeiro estado eletrônico tripleto. Como normalmente ocorre, a energia do

primeiro estado excitado tripleto é mais baixa que a energia correspondente no estado singleto.

Numerosos níveis de energia vibracional estão associados a cada um dos quatro estados eletrônicos, conforme sugerido pelas linhas horizontais mais estreitas. Como mostrado na Figura 7, as transições de absorção podem ocorrer do estado eletrônico fundamental singleto ( $S_0$ ) para níveis vibracionais dos estados eletrônicos excitados singleto ( $S_1$  e  $S_2$ ). Observe que a excitação direta para o estado tripleto não é mostrada. Uma vez que essa transição envolve uma mudança na multiplicidade, há uma probabilidade muito pequena da sua ocorrência. Uma transição de baixa probabilidade desse tipo é chamada de transição proibida.

As moléculas excitadas para os estados eletrônicos  $S_1$  e  $S_2$  perdem rapidamente qualquer excesso de energia vibracional e relaxam para o nível vibracional fundamental daquele estado eletrônico. Esse processo não radiante é conhecido como relaxação vibracional (Skoog, 2006).

### **2.5.6.3. Espectroscopia de fluorescência total**

As medidas de fluorescência podem ser classificadas em dois tipos: no estado estacionário e dependentes do tempo. Medidas no estado estacionário são aquelas realizadas com iluminação e observação constantes. A amostra é iluminada com um feixe contínuo de luz e a intensidade (ou espectro de emissão) é então registrada. Quando a amostra é exposta à luz, o estado estacionário é alcançado quase que imediatamente.

No entanto, para as medidas dependentes do tempo a fluorescência é utilizada para determinar a intensidade e tempo de decaimento. Para esse tipo de medida a amostra é exposta a um pulso de luz, onde a largura do pulso é tipicamente mais curta que o tempo de decaimento da amostra. Essa intensidade de decaimento é registrada com um sistema de alta velocidade de detecção, que permite medir a intensidade e a anisotropia em uma escala de tempo de nanosegundos.

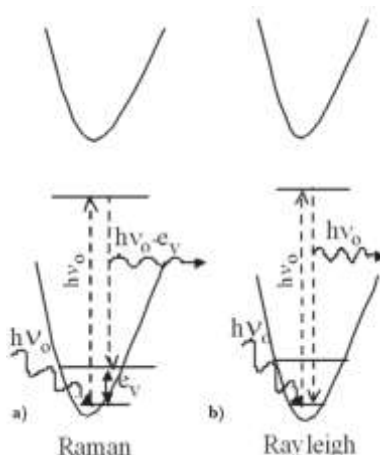
É possível estabelecer uma relação entre as medidas de estado estacionário e as medidas dependentes do tempo. A observação do estado estacionário é simplesmente uma média do fenômeno dependente do tempo sobre a intensidade de decaimento da amostra. Fluoróforos podem dispor de tempo de vida de subnanosegundos. Devido às curtas escalas de tempo da fluorescência, medidas de emissão de fluorescência dependentes do tempo requerem uma ótica e eletrônica sofisticadas. No entanto, apesar das dificuldades experimentais, a técnica dependente do tempo tem sido cada vez mais utilizada (Lakowicz, 2006).

Em uma medida de fluorescência dependente do tempo, um comprimento de onda de excitação é selecionado e a emissão é registrada na faixa do comprimento de onda de interesse. Um novo comprimento de onda é escolhido e a faixa de emissão é verificada novamente (Rubio *et al*, 1986).

#### 2.5.6.4. Espectroscopia de espalhamento Rayleigh

Em uma descrição abreviada, pode-se dizer que em um espalhamento inelástico de luz, a radiação eletromagnética interage com a matéria através de seu campo elétrico, levando-a até um estado virtual, assim chamado por não corresponder a um autoestado da molécula. Esse estado virtual pode ter sua energia relaxada de dois modos: a molécula pode retornar ao estado vibrônico original ou pode retornar a outro estado diferente de energia. No primeiro caso, tem-se o espalhamento elástico de luz, ou espalhamento Rayleigh, enquanto que no segundo caso tem-se o espalhamento inelástico, ou espalhamento Raman (Faria e Santos, 1997).

A diferença entre os espalhamentos Raman e Rayleigh pode ser representada pelo esquema da Figura 8 onde é mostrado o poço potencial do estado eletrônico fundamental e de um excitado, onde pode-se observar o nível intermediário (com energia  $h\nu_0$ ) bem abaixo do estado excitado. No esquema (a) o fóton de energia  $h\nu_0$  encontra a molécula no estado vibracional fundamental e leva o sistema a um estado intermediário com energia  $h\nu_0$ , que em seguida decai para o nível vibracional excitado  $e_v$ , que é chamado de espalhamento Raman. No esquema (b) o fóton leva o sistema a uma energia  $h\nu_0$  e retorna ao estado fundamental com espalhamento de radiação de mesma energia, que é espalhamento Rayleigh (Sala, 2008).



**Figura 8.** Esquema para os espalhamentos: a) Raman, b) Rayleigh (Sala, 2008).

#### 2.5.6.5. Espectroscopia de fluorescência sincronizada (EFS)

Na técnica de EFS, tanto a excitação quanto o comprimento de onda de emissão são digitalizados simultaneamente durante a aquisição do espectro. Iniciando as análises, são selecionados: um comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{exc}$ ) e um comprimento de onda de emissão ( $\lambda_{em}$ ), onde a diferença entre ambos será  $\Delta\lambda$  ( $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{exc}$ ). Os dados de EFS fornecem superfícies de resposta de três dimensões para a intensidade de fluorescência. As características dos espectros EFS são usualmente mais acentuadas que os espectros convencionais de fluorescência devido à compreensão da largura de banda espectral. A técnica de EFS tem diversas vantagens sobre a espectroscopia de fluorescência padrão para as análises de amostras complexas como, por exemplo, aumentar a intensidade de alguns picos, melhorando a sensibilidade do método (Wakeham, 1977; Panjota, 2010).

A fluorescência sincronizada pode fornecer informações sobre o ambiente molecular no entorno da cromosfera molecular. Foi proposto por

Llody e pode ser usada para a caracterização de misturas complexas. Por exemplo, o espectro característico dos resíduos de tirosina e triptofano podem ser observados quando o intervalo de comprimento de onda ( $\Delta\lambda$ ) é igual a 15 e 60 nm, respectivamente. As mudanças no comprimento de onda máximo dos resíduos da albumina correspondem à polaridade ao redor da molécula cromófora e assim é possível avaliar as mudanças conformacionais de proteínas pela diferença da posição de máxima emissão (Pis *et al*, 2011).

### **2.5.7. Supressão da fluorescência**

Uma ferramenta muito utilizada no estudo da fluorescência em sistemas biológicos é a supressão da fluorescência. Este fenômeno envolve qualquer processo que diminua a intensidade de fluorescência de uma amostra. Uma variedade de interações moleculares pode resultar em supressão, como reações de estado-excita, rearranjos moleculares, transferência de energia, formação de complexo no estado fundamental e supressão por colisões com moléculas do solvente ou moléculas supressoras específicas (Marquezin, 2008).

A supressão pode ser de dois tipos: colisional (ou dinâmica), quando o fluoróforo no estado excitado colide com o supressor, decaindo para o estado fundamental sem a emissão de fluorescência; ou estática, onde ocorre a ligação entre o fluoróforo e supressor, formando um complexo não fluorescente. Ambos os processos requerem contato molecular entre o fluoróforo e o supressor e essa necessidade de contato molecular resulta em várias aplicações da supressão como, por exemplo, a obtenção de informações

acerca da acessibilidade do fluoróforos a determinados supressores localizados em sítios específicos de uma proteína (Lakowicz, 2006).

### **2.5.8. Dicroísmo circular**

Uma ferramenta utilizada no estudo de propriedades de macromoléculas em solução é o dicroísmo circular (CD), que ocorre quando uma molécula possui cromóforos quirais, ou seja, centros assimétricos, de modo que a componente circularmente polarizada à direita seja absorvida com diferente quantidade da componente à esquerda. Dessa forma, existem as duas ondas transmitidas que, quando combinadas, resultarão em uma luz elipticamente polarizada, caracterizando assim o fenômeno (Trindade, 2005).

A espectroscopia de CD é umas das técnicas mais úteis no estudo estrutural de proteínas, uma vez que suas unidades básicas, os resíduos de aminoácidos, possuem centros quiróforos. A análise de um espectro de CD geralmente se concentra na região do ultravioleta distante (180 a 250nm), mesmo em concentrações baixas de amostra (1-10mg/mL) e fornece informações sobre o efeito dos ligantes adicionados (Trindade, 2005).

Além disso, de acordo com a conformação estrutural que essas proteínas adquirem ( $\alpha$ -hélices,  $\beta$ -folhas ou estruturas desordenadas), é possível caracterizar a estrutura secundária destas macromoléculas devido ao perfil espectral de CD particular desses arranjos, bem como estimar as frações destas estruturas na estrutura global das mesmas (Kelly e Price, 2000; Nakanishi et al, 1994). Algumas características como mudanças

conformacionais, que podem ocorrer nas proteínas em função de interação com ligantes específicos, variações de temperatura, pH e força iônica do meio também podem ser monitoradas por CD (Trindade, 2005).

Nessa técnica, a amostra é irradiada por uma luz polarizada circularmente, que é transformada para luz elíptica, se houver diferença na absorção de luz polarizada circularmente para a direita (RHCP, da sigla em inglês *Right Hand Circularly Polarized*) e luz polarizada circularmente para a esquerda (LHCP, da sigla em inglês *Left Hand Circularly Polarized*) (Guzzo, 2007; Fasman, 2010; Greenfield; 2006; Kelly e Price, 2000).

Uma molécula que absorve luz polarizada para a esquerda, diferente da luz polarizada para a direita, é opticamente ativa, ou quiral. As proteínas possuem uma série de cromóforos que podem dar origem a sinais de CD. Na região distante do UV (240-180 nm), que corresponde à absorção de ligação peptídica, o espectro pode fornecer informações referentes às características da estrutura secundária. Já a região próxima do UV (320-260 nm) reflete o ambiente das cadeias laterais de aminoácidos aromáticos e, assim, dá a informação sobre a estrutura terciária da proteína (Kelly e Price, 2000).

Definimos RHCP como sendo o sentido horário no qual o vetor campo elétrico  $E$  da luz gira em função do tempo num determinado ponto fixo do espaço e a LHCP para o sentido anti-horário (Manfrini, 2007).

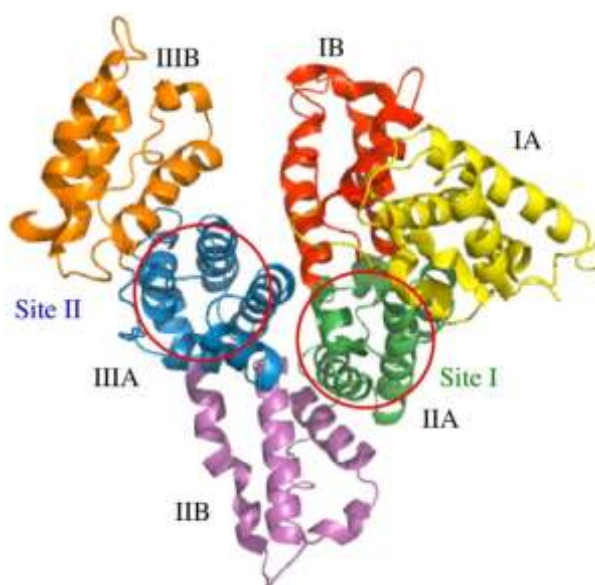
Os espectros de CD são medidos usando um espectrômetro de CD, que permite medir a dispersão da rotação óptica, que é uma espectroscopia de birrefringência circular. Um sinal de CD pode ser positivo ou negativo, se a luz polarizada circularmente para a esquerda é absorvida numa extensão maior do



que a luz polarizada circularmente para a direita (sinal positivo de CD) ou, em menor escala (sinal negativo de CD) (Fasman, 2010; Kelly e Price, 2000;).

## 2.6. Albumina Sérica

Uma única cadeia de 585 resíduos de aminoácidos constitui a estrutura primária da albumina sérica humana (*human serum albumin*, HSA), o que totaliza uma massa molecular de aproximadamente 66 kD. Essa cadeia peptídica está arranjada de tal forma a apresentar três domínios homólogos, cada qual formado por três alças, que estão unidas por ligações dissulfeto (He e Carter, 1992, Shaw e Pal, 2008), como pode ser observado na Figura 9.



**Figura 9.** Estrutura da albumina indicando a subdivisão em domínios (I-III) e subdomínios (A e B) e as localizações aproximadas dos sítios de ligação (Yamasaki, et. al., 2013).

A estrutura secundária da HSA é formada principalmente por  $\alpha$ -hélices, que constituem cerca de 67% da estrutura total,  $\beta$ -folhas com cerca de 23% da estrutura total e estruturas randômicas com os 10% restantes. (Carter e Ho, 1994).

É possível observar que a albumina possui três domínios homólogos, comumente chamados de I, II e III, e cada um desses é composto por dois subdomínios, chamados A e B. O subdomínio A possui seis  $\alpha$ -hélices e o subdomínio B quatro  $\alpha$ -hélices. (Kragh- Hansen *et al*, 2002). Sudlow e colaboradores (Sudlow *et al*, 1975) realizaram um trabalho pioneiro a fim de estudar a interação de drogas com albumina. Esse trabalho foi baseado no deslocamento de sondas fluorescentes e mostrou que a maioria das drogas se liga ao sítio I ou sítio II com alta afinidade. No sítio I ligam-se preferencialmente a ácidos di-carboxílicos ou moléculas heterocíclicas volumosas e no sítio II ligam-se preferencialmente ácidos carboxílicos aromáticos carregados negativamente. (Kragh- Hansen *et al*, 2002).

Albuminas séricas são as proteínas mais abundantes no plasma sanguíneo. Essas proteínas auxiliam no transporte de drogas e elementos nutritivos pelo corpo humano (Zhang *et al*, 2008) e também são responsáveis pela disposição e eficácia de medicamentos (Olson e Christ, 1996). Além disso, mantêm o pH do sangue e têm grande contribuição para manter a pressão osmótica (He e Carter, 1992). Embora existam diversos tipos de albuminas, a mais utilizada em pesquisas são a HSA e a albumina de soro bovino (BSA) (Pan *et al*, 2011). Como destacado, uma das principais funções das albuminas séricas é o transporte de medicamentos onde, por meio de interações não

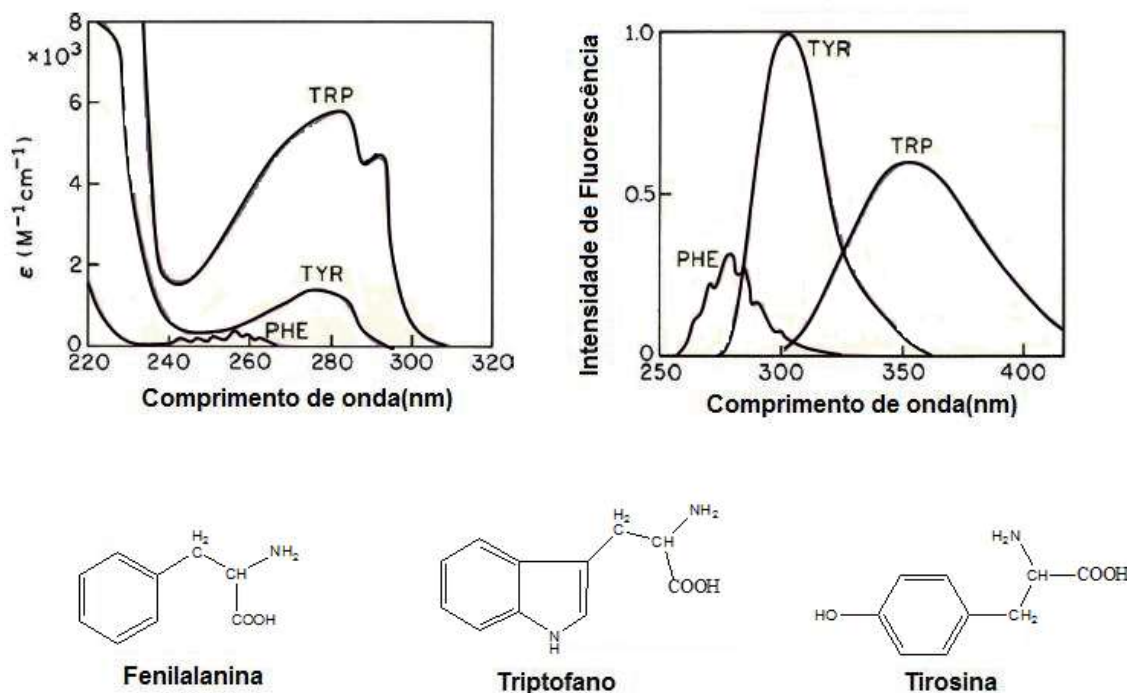
covalentes com a proteína, estas substâncias podem ser distribuídas para diferentes áreas do corpo (Bhogale *et al*, 2013).

A albumina humana pode se ligar rapidamente e com grande afinidade a vários ligantes diferentes, sendo os equilíbrio HSA-ligante atingindo ordem de 1 microssegundo (Vorum, 1999). Isso sugere a capacidade da proteína de alterar sua conformação interna de modo rápido. Grupos substituintes carregados e hidrofobicidade podem auxiliar os ligantes a se fixarem na proteína. Porém, a capacidade de alteração conformacional tem um limite e o próprio ligante tem que preencher requisitos estéricos para ligações com alta afinidade (Eposito, 2000). Além disso, a presença de um ligante pode impedir a ligação de outro (devido a competição pelos sítios de ligação) e proteger a proteína contra a desnaturação pelo calor ou pela ação da ureia, contra a hidrólise enzimática, entre outros (Kragh-Hansen, 1990).

Os íons metálicos, tipicamente ácidos de Lewis, podem ser mais “duros” ou “moles” de acordo com, respectivamente, seu menor ou maior tamanho, sua carga e facilidade de polarização. Essa característica do íon metálico vai ditar as espécies do substrato biológico com as quais poderá se ligar com maior afinidade. As proteínas, em geral, oferecem vários tipos de sítios de coordenação para íons metálicos, duros ou moles. As cadeias laterais ligantes mais importantes são os grupos –SH, imidazol, carboxilato, fenolato e menos frequentemente o tioéter, carboxamida, guanidina (Lippard e Berg, 1994). Os grupos  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> apresentam alta basicidade e permitem a estabilização de complexos por efeito do campo ligante. Além disso, as pontes S-S da cistina, abundantes na molécula de HSA, podem oferecer um sítio específico para ligação com metais (Sarkar, 1987).

No que se refere ao transporte desses metais, a albumina difere da grande maioria das outras proteínas, justamente por transportar várias espécies diferentes, com grande afinidade. Além de transportar grandes quantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  de uma maneira relativamente pouco específica, a albumina humana contém sítios de alta afinidade para  $\text{Cu(II)}$ ,  $\text{Zn(II)}$  e  $\text{Ni(II)}$  (Sarkar, 1983; Eposito, 2000).

Nas proteínas, a fluorescência intrínseca é causada por três aminoácidos: triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe) (Figura 10). O grupo indol do triptofano é o maior responsável pela sua capacidade de absorver luz UV e pode ser seletivamente excitado (pois possui uma forte absorção entre 280-300nm, e os demais fluoróforos são excitáveis em comprimentos de onda menores). A emissão da fluorescência do triptofano é sensível ao grau de polaridade do meio, sendo por essa razão que a emissão da fluorescência do triptofano é muito utilizada em estudos de mudanças conformacionais (Uversky *et al*, 2012; Loving *et al*, 2010; Yan e Marriot, 2004; Doi *et al*, 2002; Lakowicz, 2006).



**Figura 10.** Espectros de absorvância e fluorescência dos aminoácidos triptofano (Trp), tirosina (Tyr) e fenilalanina (Phe). Trp:  $\lambda_{\text{ex}}= 295\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=353\text{nm}$ ; Tyr:  $\lambda_{\text{ex}}= 275\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}= 304\text{nm}$ ; Phe:  $\lambda_{\text{ex}}= 260\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}= 282\text{nm}$ . As estruturas dos aminoácidos são observadas na parte inferior (Ayme, 2014).

Algumas moléculas não possuem capacidade de emitir fluorescência ou simplesmente o desenho do experimento exige além da fluorescência intrínseca. Para superar esse inconveniente, é necessário usar fluoróforos externos (ou extrínsecos) e ligar em lugares específicos nas moléculas. Hoje em dia é conhecida uma vasta quantidade de fluoróforos extrínsecos, (Loving *et al*, 2010; Yan e Marriot, 2004; Doi *et al*, 2002; Lakowicz, 2006).

As proteínas podem ser ligadas à superfície de diversos nanomateriais, de acordo com suas propriedades físico-químicas de sua nanoestrutura, como carga da superfície e hidrofobicidade, e ainda algumas propriedades como forma e curvatura da superfície têm influência somente na

quantidade (e não no tipo) de ligação na proteína. A interação das proteínas com nanopartículas pode ter consequências negativas, como a indução de mudanças conformacionais, e as mesmas podem induzir a perda de funcionalidade das proteínas, a modificação de sua interação com outros elementos, e até mesmo o início de uma resposta inflamatória e alérgica (Lynch e Dawson, 2008; Podila *et al*, 2012). Recentemente, foi demonstrado que nanopartículas de ouro, carregadas negativamente com plasma humano, induzem o desdobramento do fibrinogênio quando esse comportamento é observado em medidas de dicroísmo circular (Deng *et al*, 2011). Isso pode causar uma resposta inflamatória induzida através do fibrinogênio com o receptor Mac-1. Porém, algumas interações de nanopartículas com proteínas podem induzir efeitos positivos, como a diminuição da degradação enzimática. Por exemplo, a adsorção de lipases em poliestireno e polimetilmetacrilato nanoestruturado aumenta a performance em termos de seletividade e atividade enzimática e também aumenta a sua estabilidade termal (Palocci *et al*, 2007; Simon-Vazquez, 2014).

A conjugação de ZnO nanoparticulado com albumina foi estudada utilizando-se a fluorescência de triptofano para provar as interações eletrônicas (Kathiravan *et al*, 2009; Bardhan *et al*, 2009; Tantra *et al*, 2010). Kathiravan e colaboradores (2009) e Bardhan e colaboradores (2009) reportaram um mecanismo de *quenching* estático na fluorescência de albumina na presença de coloides de ZnO nanoparticulado. Os autores encontraram algumas mudanças conformacionais indicadas pelo *quenching* de fluorescência, essas mudanças foram mostradas em algumas distorções na  $\alpha$ -hélices das cadeias polipeptídicas na estrutura secundária da albumina. Esses estudos preliminares

mostraram que a albumina conjugada com o ZnO nanoparticulado representa um sistema aceitável para um estudo mais profundo de interações conformacionais e eletrônicas entre proteínas e superfície de nanomateriais semicondutores. (Klaumunzer *et al*, 2013).

## **2.7. Eritrócitos e sua estimulação (hemólise)**

O fato da membrana eritrocitária ser ricamente composta por ácidos graxos poliinsaturados oferece a ela uma maior susceptibilidade ao ataque de radicais livres, o que a torna um bom modelo experimental para estudos de lesão oxidativa. A ação destes radicais pode levar a uma série de alterações, entre elas, a formação de lipoperóxidos, redução da deformabilidade, mudanças na morfologia, fragmentação das proteínas, hemólise e alterações no metabolismo intracelular (Sato *et al*, 1995; Begum e Terao, 2002; Schmitz *et al*, 2008; Faria, 2014). Sato e colaboradores demonstraram que a hemólise é causada por pelo menos dois eventos: a lipoperoxidação e a redistribuição da proteína de banda 3 (proteína da dupla camada lipoproteica que auxilia na deformidade da membrana eritrocitária, conferindo a possibilidade da passagem da hemácia por capilares de pequenos diâmetros). Essa redistribuição leva à formação de poros na membrana e à alteração do formato característico bicôncavo dos eritrócitos para esferócito, alteração na qual, *in vivo*, resultaria em hemólise e anemia. Simão e colaboradores (2006) avaliaram os mecanismos de injúria oxidativa intracelular pela avaliação do perfil espectral da hemoglobina e seus derivados e demonstraram uma queda dos níveis intracelulares de oxihemoglobina e o aumento nos níveis de

metahemoglobina e hemicromo, produtos de sua oxidação. Portanto, os radicais peroxila gerados no meio extracelular foram capazes de causar oxidação intracelular ou ainda uma ação oxidativa indireta através da aceleração da oxidação da hemoglobina liberada no meio extracelular após a hemólise. Seus estudos também mostraram o aumento de malondialdeído (MDA), um produto resultante da lipoperoxidação. Esses resultados apontam a importância de se estudar substâncias como agentes inibidores da hemólise oxidativa, assim como inibidores da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), pois é importante ressaltar que quando os eritrócitos são desafiados com radicais livres, também pode ocorrer interação direta com a membrana celular em ruptura da mesma (Freder, 2006; Starek *et al*, 2008; Faria, 2014).

Cho e colaboradores (2013) realizaram testes com diferentes tipos de células, em diferentes óxidos nanoparticulados, em diferentes tamanhos de partículas, diferentes áreas e em concentração de 5% (m/m) e encontraram alguns resultados que indicavam o poder oxidativo de alguns desses materiais. O óxido de zinco apresentou algum poder citotóxico dependendo da cultura celular utilizada. Porém, para os testes de hemólise não foram encontrados resultados significativos.

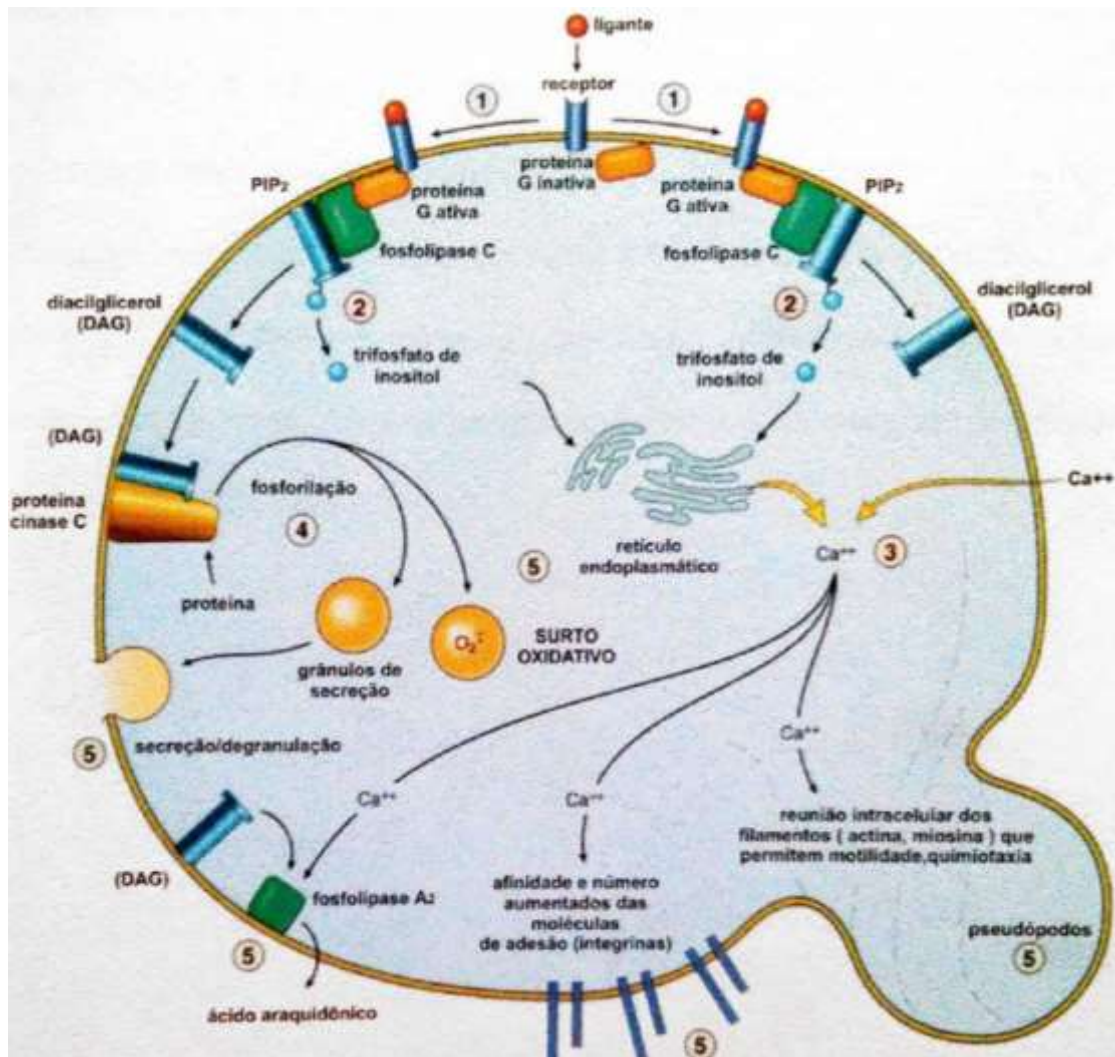


## 2.8. Neutrófilos e o “burst” oxidativo

Os neutrófilos constituem um importante componente de defesa inata do organismo contra patógenos e usualmente são as primeiras células a chegarem aos locais de infecção/inflamação (Verhoc e Visser, 1993). Para exercer suas funções, os neutrófilos devem migrar para o sítio da infecção guiados por sinais químicos específicos, reconhecer, fagocitar e finalmente destruir o micróbio invasor. Sua atividade microbicida é um processo dinâmico que requer um grande gasto de energia e as alterações metabólicas, associadas com a ação microbicida dos leucócitos polimorfonucleares (LPMNs), são referidas como explosão ou surto (“burst”) respiratório (Ricevuti e Mazzone, 1989).

Quando os neutrófilos são ativados, dependendo de seu grau de estimulação, esse processo pode levar ao fenômeno da degranulação do conteúdo de seus grânulos azurófilos (primários) e específicos, bem como à ativação do surto (“burst”) respiratório. A compreensão dos fenômenos iniciais desse processo pode ser resumida em Figura 11 (Smolen e Boxer, 1995). A ligação de um ligante específico ao receptor R leva a uma alteração conformacional nessa proteína e a ativação da proteína G, que pode ser bloqueada pela toxina pertusis. A proteína ativada pela ligação de GTP interage com uma fosfolipase C fosfatidilinositol específica, levando à sua ativação que cliva um lipídeo endógeno denominado bifosfato de fosfatidil inositol, gerando diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol. Na sequência de eventos ocorre a liberação de cálcio das reservas intracelulares e ativação de proteína quinase C (PKC), que inicia o processo de ativação da NADPH-oxidase de membrana e ocorre a fosforilação da subunidade P-47 Phox e

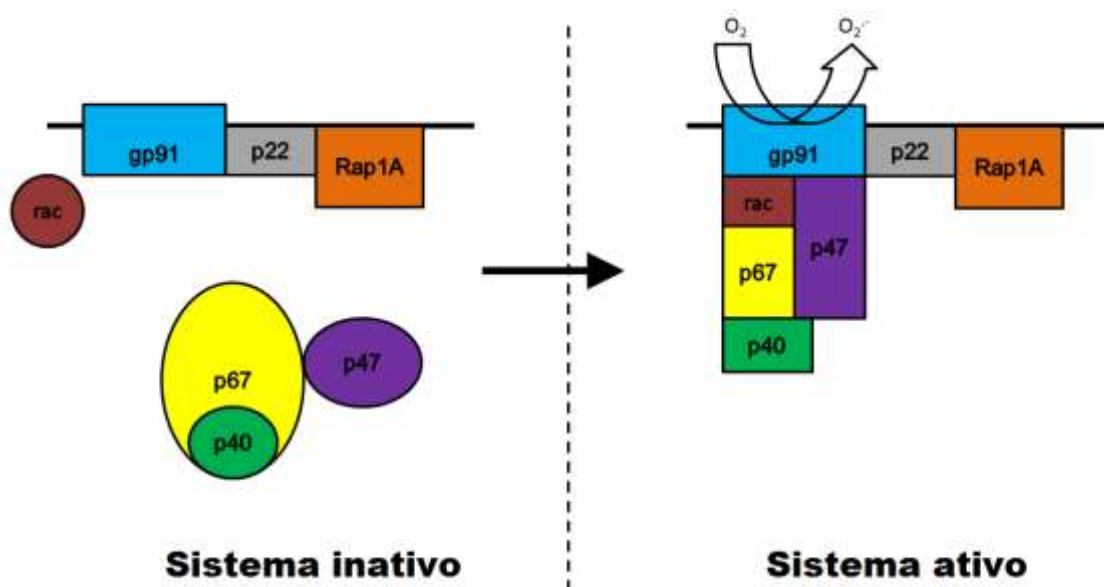
liberação de grânulos para o exterior da célula. Esses sinais transdutórios são comuns em importantes células secretoras (Costa, 2003).



**Figura 11.** Modelo de estímulo-resposta no neutrófilo levando a degranulação (Smolen e Boxer, 1995).

Para destruir os patógenos fagocitados, o neutrófilo utiliza procedimentos oxidativos e não oxidativos. Durante o processo fagocitário, os neutrófilos consomem oxigênio (Yagi, 1984) e é a partir de um complexo

enzimático conhecido como NADPH oxidase de membrana (Figura 12). Elétrons são transferidos da NADPH citoplasmática (gerado por um grande aumento da via metabólica do shunt da hexose) para o oxigênio no fagossomo, gerando inicialmente o radical ânion superóxido, e depois uma série de outras espécies reativas de oxigênio (EROs) (Segal e Abo, 1993; Chanock *et al*, 1994). O sistema NADPH oxidase dos neutrófilos constitui um modelo essencial nas respostas imunológicas, porém também está envolvido no dano tissular associado a muitas doenças inflamatórias (Costa, 2003).



**Figura 12.** Atuação da NADPH oxidase na geração do radical ânion superóxido no fagossomo

(Adaptado de: Costa, 2003).

A subunidade gp-91 é uma flavoproteína FAD-dependente que contém o sítio de ligação da NADPH e, em última análise, transporta elétrons para o oxigênio molecular, formando o radical superóxido. A subunidade p-47 pode ser fosforilada em diferentes graus e esse processo pode ser importante na ativação da oxidase, possivelmente relacionado com a sua “cauda” hidrofóbica poliisoprenoíde c-20 (Costa, 2003).

Após a formação do radical ânion superóxido, uma outra série de eventos bioquímicos, que ocorre no fagossomo (ou espaço extracelular) levam à formação de outras EROs, todas elas implicadas em maior ou menor grau na destruição dos patógenos fagocitados (Hampton *et al*, 1998).

A ativação dos fagócitos pode ocorrer através de mecanismos mediados ou não por receptores. A ligação de um estímulo a um receptor pode levar a vários eventos como movimentos específicos da célula, abertura de canais de íons, alteração no metabolismo celular ou à liberação de material celular, ou ainda uma combinação destes (Costa, 2003).

Dentre os estímulos dependentes de receptores pode-se destacar: formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP), C5a, complexos imunes, zymosan opsonizado, bactérias opsonizadas, partículas de látex opsonizadas. Entre os que independem de receptores estão o acetato de forbol miristato (PMA), os ionóforos de cálcio, diacilglicerol (DAG), entre outros (Goldstein, 1975; Costa, 2003).

O PMA (utilizado nesse trabalho) é um estímulo solúvel e não depende de receptores para a ativação de LPMN. Esse composto ativa a proteína quinase C (PKC), aumentando a atividade do shunt da hexose

monofosfato, com conseqüente aumento do “burst” oxidativo pela ação da NADPH oxidase, produzindo ânion radical superóxido (Naccache *et al*, 1990; Costa, 2003).

### 3. Objetivos

Estudar os potenciais efeitos deletérios do óxido de zinco nanoparticulado em função de sua morfologia nos seguintes contextos:

Efeitos deletérios do ZnO sobre a albumina sérica humana, tendo como parâmetros suas propriedades estruturais e a afinidade aos sítios de ligação da mesma.

Efeitos deletérios do ZnO sobre eritrócitos a partir do estudo do rompimento de sua membrana (testes de hemólise).

Efeitos deletérios do ZnO sobre neutrófilos humanos, a partir de estudos sobre a ativação do *burst* oxidativo dessas células.

## 4. Materiais e métodos

### 4.1. Reagentes utilizados

Acetato de zinco di-hidratado ( $\text{ZnO}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), solução aquosa de amônia ( $\text{NH}_3$ ) 25%, hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ), cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ), fosfato dibásico de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), fosfato diácido de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), ácido clorídrico ( $\text{HCl}$ ), albumina humana (HSA), dansilglicina (DG –  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ ), dansilamida (DNSA –  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ ), sal de magnésio do ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfônico (ANS –  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{Mg}_{0.5}\text{NO}_3\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ), óxido de zinco comercial nanoparticulado ( $\text{ZnO}$ ), solução de polissacarose e diatrizoato de sódio ajustada a uma densidade de 1,119g/mL (Histopaque®-1119), solução de polissacarose e diatrizoato de sódio ajustada a uma densidade de 1,077g/mL (Hitopaque®-1077), dimetilsulfóxido (DMSO –  $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ ), cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), glicose ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ), solução de Lazarus, 5-amino-2,3-di-hidro-1,4-ftalazinediona (Luminol), nitrato de bis-*N*-metilacridínio (Lucigenina), corante azul de Trypan, 10-acetil-3,7-di-hidroxifenoxazino (Amplex®-Red), Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA).

## 4.2. Preparação de soluções a serem utilizadas nos experimentos

- **Solução tampão PBS**

Pesou-se 8g de NaCl, 0,2g de KCl, 1,44g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e adicionou-se a essa mistura 800mL de água destilada. Levou-se a solução a um pH-metro previamente calibrado, e ajustou-se o pH da solução para 7,4 com o auxílio de HCl 0,1M. Ao final, completou-se o volume para 1L com água destilada e armazenou-se em geladeira.

- **Solução tampão PBS Suplementado**

Adicionou-se em um tubo estéril, 10mL de tampão PBS, 100μL de cloreto de cálcio 100mM, 100μL de cloreto de magnésio 50mM e 100μL de glicose 100mg/mL.

- **Soluções das sondas fluorescentes**

Para a preparação de 5mL da sonda DG a 5μM (Massa molar= 308,35g/mol), pesou-se 7,7mg do mesmo e diluiu-se em uma solução de ácido clorídrico padronizado a 0,01M.

Para a preparação de 5mL da sonda ANS a 5μM (Massa molar= 310,49g/mol), pesou-se 7,8mg do mesmo e diluiu-se em uma solução de ácido clorídrico padronizado a 0,01M.

Para a preparação de 5 mL da sonda DNSA a 5μM (Massa molar =250,32g/mol), pesou-se 6,3mg do mesmo e diluiu-se em DMSO.



As diluições necessárias para a realização dos testes foram realizadas em tampão PBS.

- **Solução de PMA**

Em um frasco contendo 1mg de PMA (comercial e lacrado), adicionou-se 1mL de DMSO (considerando-se sua massa molar igual a 616,8g/mol, a concentração final dessa solução é de 1,62mM), e essa foi chamada de solução-estoque de PMA.

A partir da solução-estoque, diluiu-se para uma concentração de 50 $\mu$ M em DMSO, essa foi chamada de solução de trabalho. Aliquotou-se a solução de trabalho em volumes de 10 $\mu$ L de solução em tubos de microcentrifugação de 1,5mL.

Para a utilização da solução, adicionou-se ao tubo de microcentrifugação 990 $\mu$ L de PBS para a diluição da solução de trabalho em 1:100 (concentração final = 0,5 $\mu$ M).

- **Solução estoque de luminol**

Considerando-se que a massa molar do luminol é 117,16g/mol, pesou-se 88,6mg de luminol e adicionou-se 5mL de tampão PBS para a obtenção da solução estoque de 100 $\mu$ M.

A solução de trabalho foi a diluição dessa solução estoque para a concentração de 10 $\mu$ M.

- **Solução estoque de lucigenina**

Considerando-se que a massa molar da lucigenina é 510,50g/mol, pesou-se 255mg de lucigenina e adicionou-se 5mL de tampão PBS para a obtenção da solução estoque de 100µM.

A solução de trabalho foi a diluição dessa solução estoque para a concentração de 10µM.

- **Solução estoque de Amplex-Red®**

Considerando-se que a massa molar do Amplex-Red® é 257,24g/mol, pesou-se 129mg de Amplex Red® e adicionou-se 5mL de tampão PBS para a obtenção da solução estoque de 100µM.

A solução de trabalho foi a diluição dessa solução estoque para a concentração de 10µM.

### **4.3. Síntese e Caracterização de Óxido de Zinco**

#### **4.3.1. Preparação de Óxido de Zinco (Método Sonoquímico)**

Amostras de óxido de zinco foram preparadas pesando-se 2,75g de acetato de zinco di-hidratado ( $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e adicionando-se 25mL de solução aquosa de amônia 25% ( $\text{NH}_3$ ) até a completa diluição. Na sequência adicionou-se 1g de hidróxido de sódio em pérolas (NaOH) e agitou-se até dissolução. As amostras foram submetidas à sonicação, utilizando um aparelho Hielscher Sonics Vibracell VCX 750, com 750W e 20Hz de potência (Brandeburgo, Alemanha) em potência fixa de 226W/cm<sup>2</sup> e variando o tempo

de sonicação em 10 minutos, 40 minutos, 60 minutos e 120 minutos. Uma amostra não foi sonicada, mas deixada em repouso por 48 horas.

Após a sonicação, lavou-se as amostras de 4 a 5 vezes por meio de centrifugações (13520g) e ressuspensões até a obtenção de pH neutro. Após as lavagens, secou-se as amostras em um forno com uma rampa de temperatura de 5°C/min até alcançar 200°C, que foi mantido durante 120 minutos e na sequência retornando à temperatura ambiente em uma rampa de 5°C/min. O material obtido (pó de cor branca) foi submetido à caracterização como será descrito posteriormente.

#### **4.3.2. Caracterização das Amostras de Óxido de Zinco**

Realizaram-se as caracterizações a partir da difração de raios X em configuração Bragg-Bretano no equipamento Rigaku D/MAX 2100PC (Texas, EUA), com radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1,5405\text{\AA}$ ) e filtro de níquel para eliminação de radiação  $\text{K}\beta$ . Preparou-se a amostra conforme protocolo geral de utilização em porta-amostra de sílica amorfa. Leitura realizada com fenda com abertura de 10mm, corrente de 20mA, potencial de 40kV, a varredura do detector foi de 10 a 100° a um passo de 0,02°/2s.

Medidas de infravermelho em modo FT-IR em um equipamento Jasco, FT/IR-4600 (Maryland, EUA) foram realizadas utilizando o método ATR, onde uma pequena quantidade de pó foi colocada em um cristal de diamante sob uma ponteira para a leitura.

Realizou-se microscopia eletrônica de varredura em um equipamento Carl Zeiss, EVO LS15 (Turíngia, Alemanha) com filamento de tungstênio, em um substrato de quartzo colado com fita de carbono sob um stub de alumínio apropriado ao equipamento. Uma pequena quantidade de cola prata foi colocada para o aumento da condução de elétrons e a obtenção de uma medida mais nítida.

Realizou-se espectroscopia de UV-Vis em um equipamento Perkin Elmer, Lambda 35 (Massachusetts, EUA) em cubeta de quartzo de 10mm. Suspensões aquosas de óxido de zinco (0,1mg/mL) foram utilizadas para a obtenção do comprimento de onda máximo e o valor de *bandgap* para o material sintetizado.

#### **4.3.3. Equipamentos utilizados para os testes biológicos**

Realizaram-se os testes de fluorescência com albumina humana em um espectrômetro de fluorescência da Perkin Elmer, LS55 (Massachusetts, EUA) em cubeta de quartzo de 10mm, com filtro de corte de 1% de transmitância, em modo scan, utilizando-se os slits de entrada no valor de 2,5 e de saída em 15nm. Para cada tipo de medida utilizou-se os valores abaixo apresentados (Tabela 1).

**Tabela 1.** Especificações de cada uma das medidas realizadas no fluorímetro para os experimentos com HSA

|                             | $\lambda_{\text{excitação}}(\text{nm})$ | $\lambda_{\text{emissão}}(\text{nm})$ | $\Delta\lambda(\text{nm})$ |
|-----------------------------|---|---------------------------------------|----------------------------|
| <b>Normal</b>               | 295                                     | 310-450                               | -                          |
| <b>Rayleigh</b>             | 295                                     | 260-310                               | -                          |
| <b>Sincronizada</b>         | 250                                     | 350                                   | 15 e 60                    |
| <b>Sondas fluorescentes</b> | 340                                     | 400-600                               | -                          |

Realizaram-se os testes de espectroscopia de CD com albumina humana em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Maryland, EUA) em cubeta de quartzo de 2 mm, com espectro no comprimento de onda entre 195-350nm, resolução de 1nm, tempo de resposta de 1s e velocidade de escaneamento de 50nm/min.

Realizaram-se os testes de hemólise em espectrômetro de UV-Visível Shimadzu, UV Mini 1240 (Kyoto, Japão), em cubeta de vidro de 10 mm, lendo-se em comprimento de onda de 540nm.

Realizaram-se os testes de quimiluminescência dependente do luminol com neutrófilos ativados e de quimiluminescência dependente da lucigenina em um luminômetro Berthold, Centro LB 960 (Baden-Württemberg, Alemanha) de placas a uma temperatura de 37°C, com shake de 5 segundos e medida em 30 minutos, lendo-se os poços selecionados em uma placa branca e opaca.

Realizaram-se os testes de quimiluminescência dependente de Amplex®-Red em um espectrômetro híbrido de placas Biotek, Synergy H1 (Vermont, EUA) lendo-se a fluorescência ( $\lambda_{\text{excitação}} = 530\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{emissão}} = 590\text{nm}$ ) dos poços selecionados em uma placa preta e opaca.

#### **4.4. Ensaio Biológico Realizado com as Amostras de Óxido de Zinco**

Foram selecionados três tipos de modelos biológicos *in vitro* para o estudo dos efeitos do óxido de zinco nanoparticulado sobre o meio biológico: Proteínas (Albumina Sérica Humana), Eritrócitos (estudo de hemólise eritrocitária) e Leucócitos (representados no trabalho pelos neutrófilos e o estudo do *burst oxidativo*)

A albumina séria humana utilizada foi comercial fabricada pela Sigma Aldrich (Código: A1887-1G), encontrada em forma de pó liofilizado e livre ácidos graxos.

Os eritrócitos e neutrófilos foram isolados do sangue total de doadores por métodos que serão descritos posteriormente, com o Comitê de

Ética FCF-UNESP nº 40979014.2.0000.5398 (Apêndice A contém informações sobre o “termo de doação” e “termo de consentimento livre e esclarecido” assinados pelos doadores)

#### **4.4.1. Ensaio de Alteração da Estrutura da Albumina Humana**

Preparou-se quatro suspensões em tampão PBS (pH=7,0) como segue:

Solução controle → Albumina humana (HSA) 10 $\mu$ M;

Solução amostra → HSA 10 $\mu$ M + ZnO (nanoestruturado) 0,1mg/mL;

Cada uma dessas suspensões foi incubada à 37°C, sob agitação constante por 7 dias, sendo uma alíquota retirada para análise após 1 dia e outra após 7 dias. As alíquotas (5mL) foram centrifugadas a 700g por 10 minutos e o sobrenadante utilizado para as análises de fluorescência intrínseca, espalhamento de luz (Rayleigh), fluorescência sincronizada, fluorescência extrínseca (adição de sondas fluorescentes).

Para a análise dos dados obtidos nas curvas de fluorescência (ou espalhamento) construiu-se o gráfico de barras a partir da fluorescência normalizada (ou espalhamento normalizado), dada pela Equação 2:

$$F.N. = \frac{F_{\max}(amostra)}{F_{\max}(HSA)} \quad (2)$$

Onde:

F.N. é o valor de fluorescência normalizada

$F_{\max(amostra)}$  o valor de fluorescência máxima para a HSA + amostra após um determinado tempo

$F_{\max(HSA)}$  é o valor de fluorescência máxima para o HSA após um determinado tempo

Com os mesmos tampões preparados anteriormente, foram realizados estudos de CD, incubadas por 7 dias, centrifugadas e medidas em espectropolarímetro.



Para avaliação da concentração de albumina nas soluções foi utilizada a Lei de Lamber-Beer, que é dada pela Equação 3:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot [ ] \quad (3)$$

Onde:

A= absorvância da amostra no comprimento de onda máximo

$\epsilon$ = absortividade molar do analito

b= caminho óptico da cubeta

[ ]= concentração do analito

#### **4.4.2. Ensaio de Indução de Hemólise**

Coletou-se 5mL de sangue periférico e centrifugou-se por 10 minutos à 770g. Na sequência, o sobrenadante (plasma) foi descartado e as células (hemácias) ressuspendidas em PBS e lavada por 3 vezes. Após as lavagens, as células foram ressuspendidas em uma concentração final de 20% (v/v) em PBS.

Controle → 500 $\mu$ L de suspensão de hemácias + 500 $\mu$ L de PBS;

Amostras → 500 $\mu$ L de suspensão de hemácias + 500 $\mu$ L de PBS + 0,1mg de ZnO em pó.

Após incubação a 37°C por 24 e 48 horas, retirou-se uma alíquota de 75µL e adicionou-se 1425µL de PBS. Esta suspensão foi centrifugada e o sobrenadante submetido à análise de sua absorvância em 540nm, sendo o espectrofotômetro zerado com PBS. Como controle positivo retirou-se uma alíquota de 75µL do controle negativo e adicionou-se 1425µL de água destilada no lugar do PBS, provocando a hemólise total das células.

Os valores de hemólise obtidos no espectrofotômetro foram normalizados para a análise dos resultados a partir da Equação 4:

$$H.N. = \frac{Abs(amostra)}{Abs(C+)} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

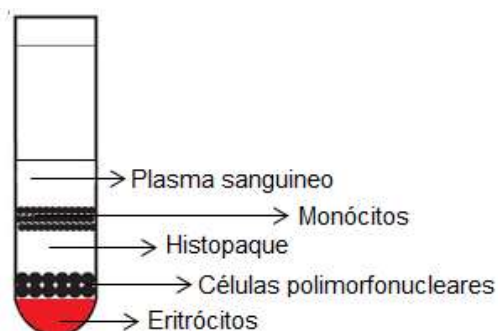
H.N. é o valor de hemólise normalizada

Abs(amostra) é o valor de absorvância encontrado para a reação (e para o controle negativo)

Abs(C+) é o valor de absorvância encontrado para o controle positivo

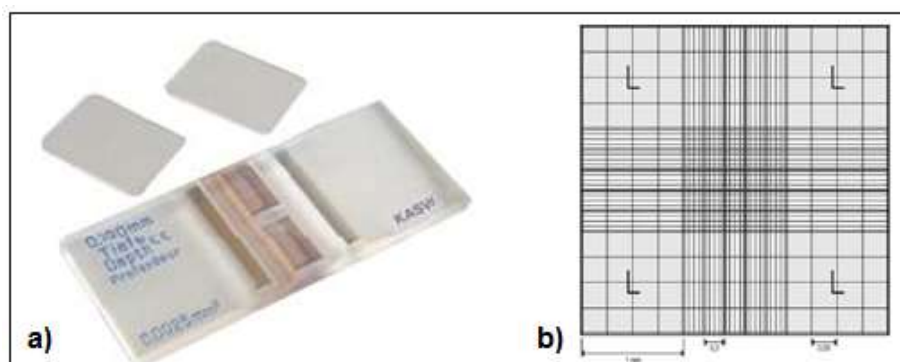
#### **4.4.3. Obtenção de Neutrófilos por Gradiente Duplo de Densidade em Ficoll-Hypaque**

O método utiliza HISTOPAQUE®-1119 e HISTOPAQUE®-1077 para separar células mononucleares e polimorfonucleares. Em um tubo Falcon® estéril, adicionou-se 3mL de HISTOPAQUE®-1119 e, cuidadosamente, acrescentou-se 3mL de HISTOPAQUE®-1077 e 6mL de sangue total. Centrifugou-se por 30 minutos (770g) à temperatura ambiente. Após a centrifugação, formaram-se cinco camadas distintas (como pode ser observado na Figura 13), sendo duas delas de células, separadas por suas densidades. A camada superior composta de plasma foi aspirada utilizando-se uma pipeta de Pasteur e desprezada; assim como a camada de monócitos e histopaque (três camadas superiores). A quarta camada, composta de células polimorfonucleares foi transferida para outro tubo estéril e adicionou-se 10mL de PBS para a primeira lavagem, centrifugando-se por 10 minutos. A lavagem foi realizada por mais três vezes. O sobrenadante foi descartado e, ao final, as células foram ressuspensas em 1mL de PBS suplementado (10mL de PBS, 100µL de solução de glicose 1mg/mL, 100µL de solução de cloreto de magnésio 0,5mM e 100µL de solução de cloreto de cálcio 1mM).



**Figura 13.** Representação esquemática de um tubo para a separação de células polimorfonucleares após a centrifugação (Adaptado de: Paracatu, 2012)

Realizou-se a contagem das células em câmara de Neubauer (Figura 14), onde as células diluídas a 1/20 (10 $\mu$ L de suspensão de polimorfonucleares em 190 $\mu$ L de Líquido de Lázarus). Após a contagem, adicionou-se PBS de modo a ajustar a suspensão para uma concentração final de 1x10<sup>7</sup>células/mL



**Figura 14.** Imagem representativa a) Câmara de Neubauer, b) Representação dos 4 quadrantes utilizados para a contagem de leucócitos (representados com a letra L) (Adaptado de: Faria, 2014).

#### 4.4.3.1. Teste de Exclusão por Azul de Trypan

Incubou-se, em microtubos de centrifugação, 100 $\mu$ L de suspensão celular ( $1 \times 10^7$  células/mL) e 100 $\mu$ L de suspensão de óxido de zinco (0,2mg/mL em PBS). Para o controle negativo, a suspensão de óxido de zinco foi substituída por 100 $\mu$ L de tampão PBS.

Os tempos de incubação foram: 30, 60 e 90 minutos. Para cada tempo retirou-se alíquotas de 50 $\mu$ L e adicionou-se 20 $\mu$ L de solução do corante Azul de Trypan. Na sequência incubou-se por 5 minutos à temperatura ambiente e contou-se as células vivas e mortas em câmara de Neubauer. As células vivas, portanto íntegras e viáveis, apresentam-se brilhantes e transparentes, enquanto as células mortas apresentam-se coradas de azul, pois sua membrana perde a sua capacidade de repelir o corante, permitindo a entrada do mesmo. A porcentagem de células vivas foi definida pela fórmula:

$$\text{Porcentagem de células viáveis} = \left[ \frac{\text{células vivas}}{\text{células vivas} + \text{células mortas}} \right] \times 100$$

#### 4.4.3.2. Ensaio de Quimiluminescência Dependente de Luminol

Para este ensaio preparou-se as seguintes soluções (a preparação já foi anteriormente descrita no tópico 4.2):

- Luminol 10 mM.
- PMA 500nM.
- Suspensões de óxido de zinco (0,2mg/mL em PBS) nas diferentes morfologias.

Aos poços de uma microplaca branca e opaca adicionou-se 25 $\mu$ L de luminol, 100 $\mu$ L de suspensão de óxido de zinco em PBS, 40 $\mu$ L de suspensão de neutrófilos ( $1 \times 10^7$  células/mL) e 35 $\mu$ L de PBS suplementado. Para o controle positivo, a suspensão de óxido de zinco foi substituída por 40 $\mu$ L de solução de PMA (500nM) e para o controle negativo por 40 $\mu$ L de PBS.

Após o posicionamento da placa na câmara de leitura em um luminômetro Berthold, Centro LB 960 (Baden-Württemberg, Alemanha), a ativação das células foi monitorada pela emissão de luz provocada pela oxidação do luminol por 30 minutos. O estudo comparativo foi realizado utilizando-se os valores de área abaixo da curva dos controles positivo e negativo e das curvas das amostras.

#### 4.4.3.3. Ensaio da Quimiluminescência Dependente de Lucigenina

Aos poços de uma microplaca branca e opaca adicionou-se 10µL de lucigenina (250µM), 100 µL de suspensão de óxido de zinco (0,2mg/mL em PBS) em PBS, 50µL de suspensão de neutrófilos ( $1 \times 10^7$  células/mL) e 40µL de PBS suplementado. Para o controle positivo, a suspensão de óxido de zinco foi substituída por 60µL de solução de PMA (500nM) e para o controle negativo por 140µL de PBS. Após o posicionamento da placa na câmara de leitura em um luminômetro Berthold, Centro LB 960 (Baden-Württemberg, Alemanha), o monitoramento foi iniciado. O tempo de reação acompanhado foi de 30 minutos.

Para a análise de dados comparativos de estimulação utilizou-se a Equação 5 para a normalização de valores de área abaixo da curva da seguinte forma:

$$AUC_{norm} = \frac{AUC_{amostra}}{AUC_{C+}} \quad (5)$$

$AUC_{norm}$  é o valor de área abaixo da curva normalizado

$AUC_{amostra}$  é o valor de área abaixo da curva para a reação entre óxido de zinco e neutrófilos (e para o controle negativo)

$AUC_{C+}$  é o valor de área abaixo da curva para o controle negativo (neutrófilos estimulados)

#### **4.4.3.4. Ensaio para Determinação da Produção de Peróxido de Hidrogênio Extracelular por Amplex® Red**

Em microtubos adicionou-se 150µL de suspensão de óxido de zinco em PBS, 60µL de suspensão de neutrófilos e 60µL de PBS suplementado. Aos controles, a suspensão de óxido de zinco foi substituída por 150µL e 210µL de PBS, positivo e negativo, respectivamente. Os tubos foram incubados a 37°C por 15 minutos sob agitação constante. Na sequência, adicionou-se em todos os tubos 30µL de solução de Amplex® Red e para o controle positivo 60µL de PMA. O volume final da mistura foi para todos 300µL. Incubou-se novamente por 30 minutos a 37°C, sob agitação constante. Após incubação, os tubos foram centrifugados (700g) por 5 minutos. O sobrenadante (200µL) foi transferido para uma microplaca e a fluorescência medida nos comprimentos de onda 530nm para excitação e 590nm para emissão em um Multidetector para Microplacas, Synergy H1 Hybrid Reader, Biotek (Vermont, EUA). O estudo comparativo foi realizado utilizando-se os valores de fluorescência dos controles positivo e negativo e das curvas das amostras.



## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Síntese e caracterização de amostras de óxido de zinco em pó

As sínteses geraram suspensões brancas e opacas, que foram secas em forno a 200°C para a obtenção de pós finos de cor branca, característicos para o óxido de zinco. As lavagens foram importantes para a retirada de impurezas do meio e diminuição do pH (para retirada das impurezas, principalmente o hidróxido de zinco). Houve elevação do rendimento das amostras dependente do aumento do tempo de síntese, como pode ser observado na

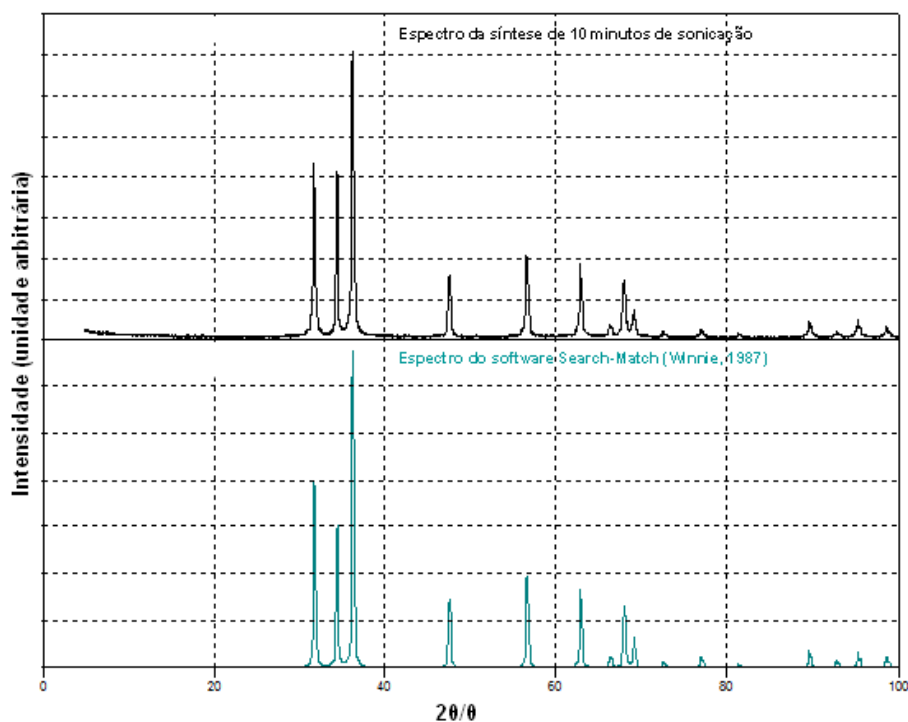
Tabela 2.

**Tabela 2.** Comparação do rendimento frente ao tempo de sonicação da síntese

| Tempo de síntese (min) | Rendimento (%) |
|------------------------|----------------|
| 10                     | 76,7           |
| 40                     | 80,5           |
| 60                     | 99             |
| 120                    | 99             |

### 5.1.1. Difração de raios X

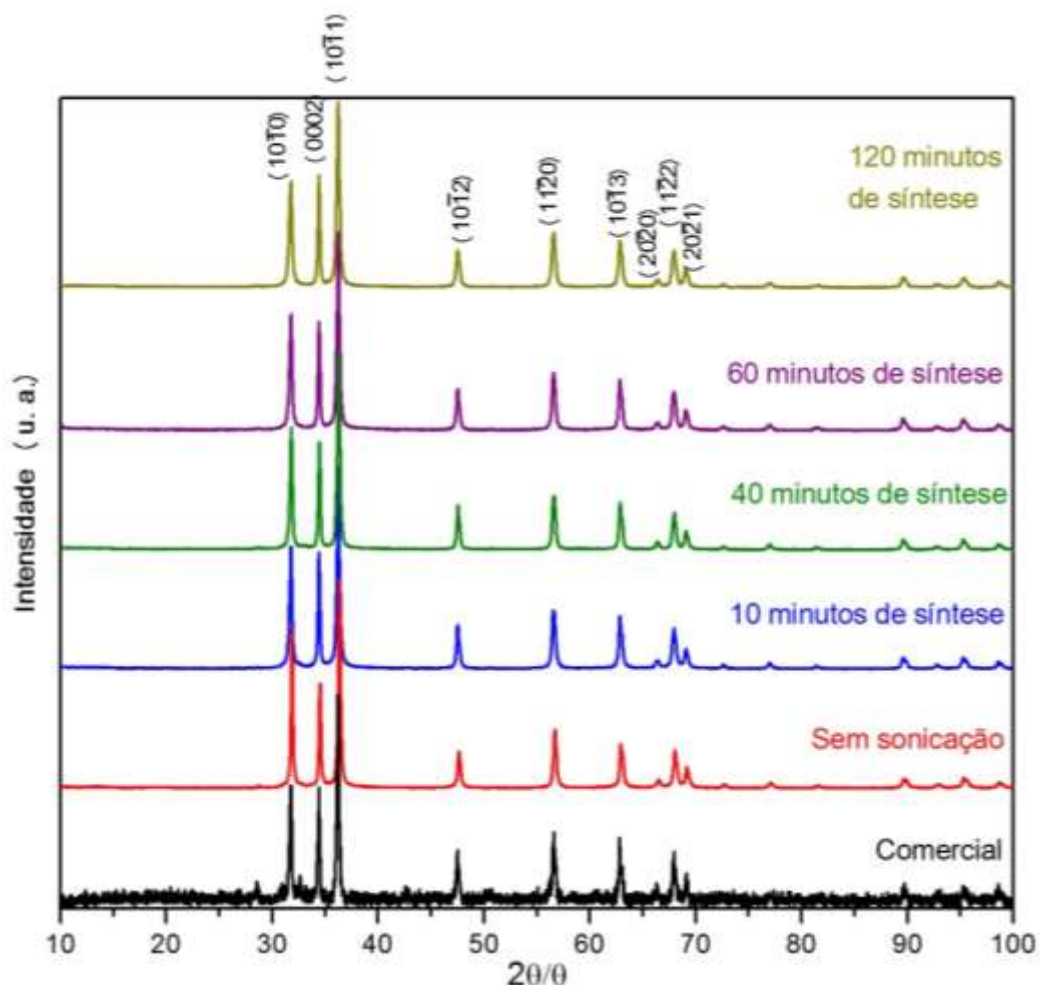
A análise de difração de raios X tem por finalidade constatar se a estrutura cristalina desejada foi obtida. Para a comparação dos difratogramas encontrados com difratogramas teóricos foi utilizado um *software* que contém estruturas catalogadas em uma base de dados chamado Search-Match. A comparação entre os difratogramas pode ser observada na Figura 15.



**Figura 15.** Difratograma experimental comparado com o difratograma da ficha catalográfica do software Search-Match.

Além da comparação entre o difratograma experimental com o difratograma de ficha catalográfica, também se realizou a comparação de

difratogramas experimentais entre as sínteses em diferentes tempos, como pode ser observado na Figura 16.



**Figura 16.** Comparação dos difratogramas em diferentes tempos de síntese

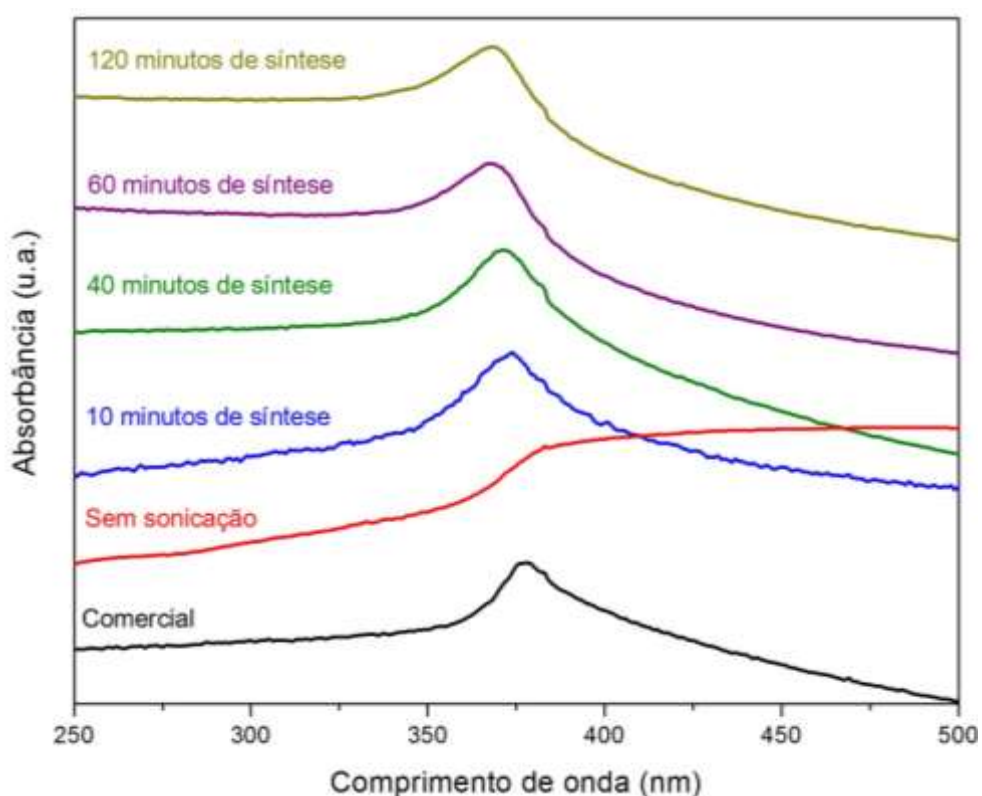
Pode-se observar que o tempo de síntese ou a síntese sem sonicar não interferiu significativamente na formação do ZnO na fase wurtzita ( $P6_3mc$ ), pois todos os espectros apresentaram picos característicos dessa fase (hexagonal) conforme comparação com JCPDS card no. 36-1451 (1997). Para uma confirmação da fase formada, também se realizaram medidas de UV-Vis,

que também mostram pico característico para essa fase, e de FT-IR que apresentam pico na banda inorgânica, característico para esse material.

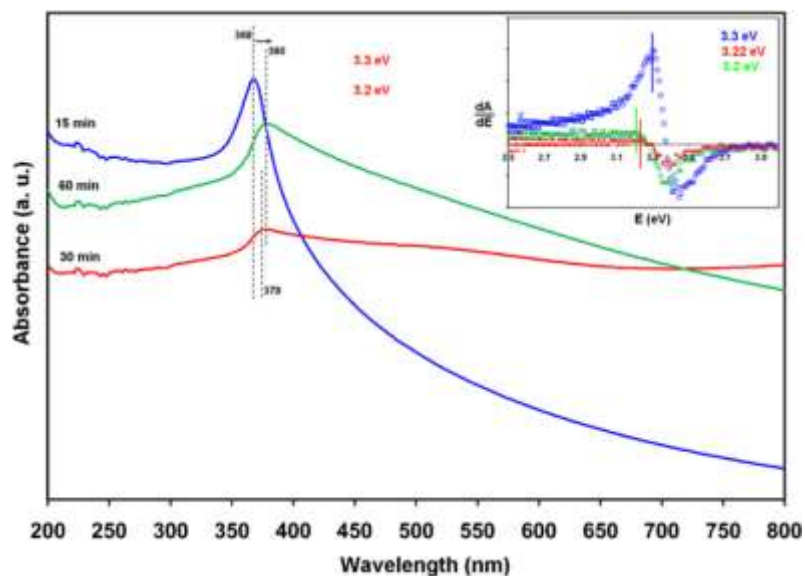
### 5.1.2. Espectroscopia de UV-Visível

A fim de confirmar a presença da estrutura de óxido de zinco, foram realizadas medidas de espectroscopia UV-Visível em suspensões etanólicas de ZnO 0,05% (m/v), assim como reportado na literatura por Zak e colaboradores (Figura 18) (Zak *et al*, 2013).

Os espectros encontrados para os diferentes tempos de síntese em comparação com a amostra comercial são apresentados na Figura 17.



**Figura 17.** Espectros das sínteses realizadas em diferentes tempos em comparação com o óxido de zinco comercial.



**Figura 18.** Espectro de uv-vis encontrado na literatura para o óxido de zinco (Zak *et al*, 2013).

Em comparação com o resultado da literatura reportado por Zak e colaboradores (2013) (Figura 18), exceto a síntese realizada sem sonicação, pode-se observar que todas as amostras mostram o perfil característico para o óxido de zinco.

A partir dos valores de comprimento de onda para o valor de absorbância máximo para cada amostra pode-se encontrar o valor de *gap* para as mesmas, a partir da seguinte Equação 6:

$$E_{gap} = \frac{1240}{\lambda_{max}} \quad (6)$$

Onde:  $E_{gap}$  é o valor da energia de gap calculado

$\lambda_{max}$  é o valor de comprimento de onda para o máximo de absorbância

Os valores de comprimento de onda para o máximo de absorbância e os resultados calculados de energia de gap se encontram na Tabela 3.

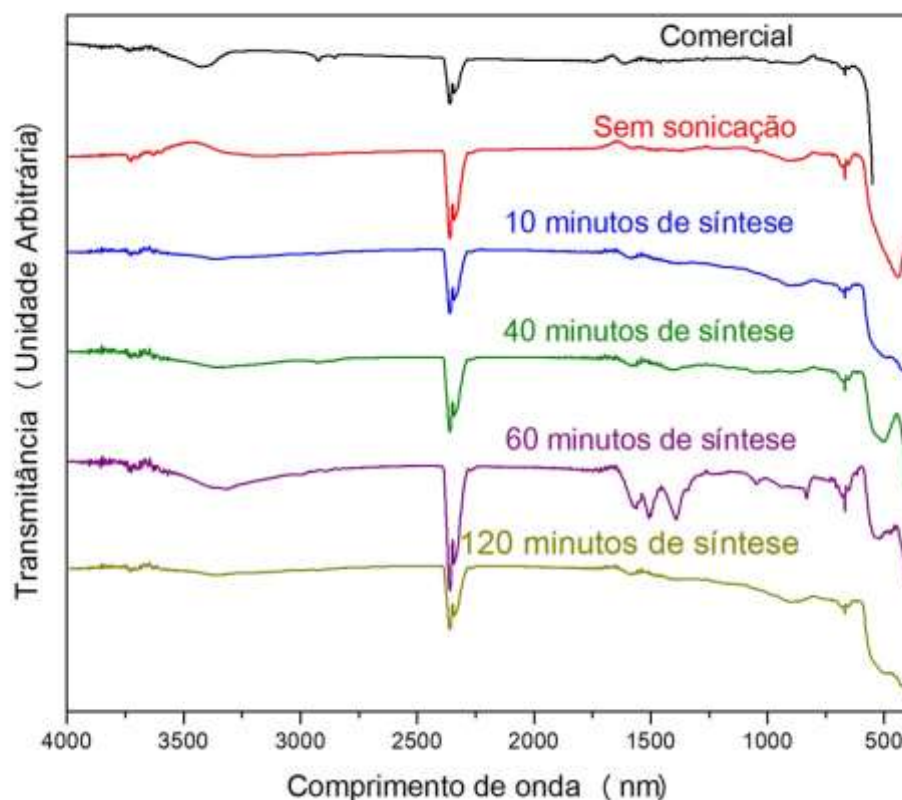
**Tabela 3.** Valor de comprimento de onda para o máximo de absorbância ( $\lambda_{\max}$ ) e valores de energia de gap ( $E_{\text{gap}}$ ) calculado para cada uma das amostras (comercial e sintetizada em diferentes tempos).

| <b>Amostra</b>                         | <b><math>\lambda_{\max}(\text{nm})</math></b> | <b><math>E_{\text{gap}}(\text{eV})</math></b> |
|--|---|---|
| Comercial                              | 382   | 3,25  |
| 10 minutos de síntese<br>ultrassônica  | 383   | 3,24  |
| 40 minutos de síntese<br>ultrassônica  | 371   | 3,34  |
| 60 minutos de síntese<br>ultrassônica  | 369   | 3,36  |
| 120 minutos de síntese<br>ultrassônica | 370   | 3,35  |

Os valores encontrados para as amostras estão condizentes com os valores encontrados na literatura de 3,4eV (Mercurio, 2009). As diferenças encontradas estão dentro dos erros experimentais de diferentes instrumentos utilizados e do operador.

### 5.1.3. Infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

A fim de realizar uma melhor caracterização do óxido sintetizado, realizou-se medidas de infravermelho por FT-IR, e na Figura 19 pode-se fazer uma comparação entre os diferentes espectros sintetizados em diferentes tempos.

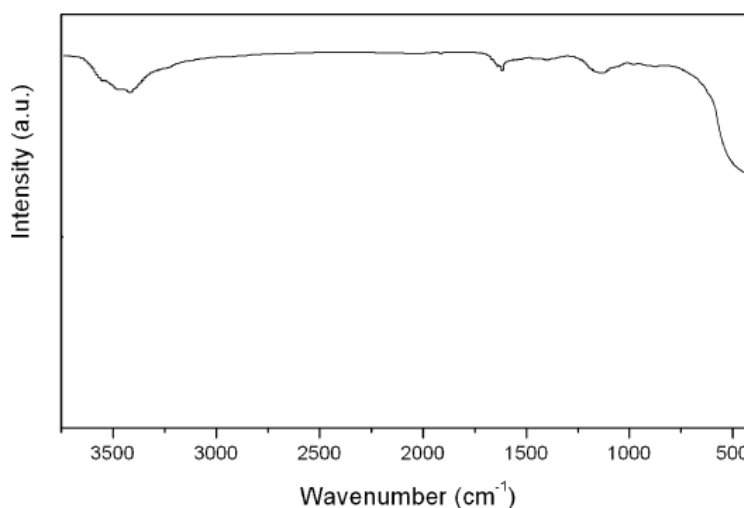


**Figura 19.** Comparação dos espectros de óxido de zinco sintetizados em diferentes tempos



Os picos por volta de  $476\text{cm}^{-1}$  são associados à vibração do Zn-O. Picos entre  $3418\text{-}3450\text{cm}^{-1}$  são atribuídos a picos de OH ou água. (Skoog *et al*, 2006).

Esses valores estão em concordância com diversos artigos encontrados na literatura, como pode ser observado na Figura 20 (Zhang *et al*, 2009). Os autores realizaram a síntese de nanofibras de ZnO e obtiveram o espectro como o mostrado a seguir.



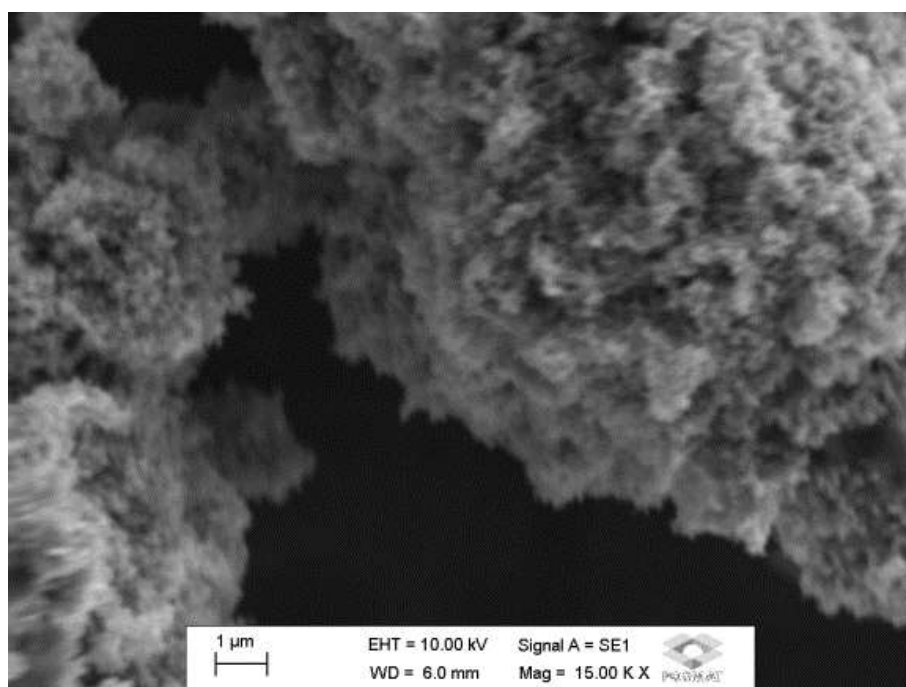
**Figura 20.** Espectro de FT-IR encontrado por Zhang e colaboradores (2009)

A partir dos espectros da Figura 19 pode-se observar que, em alguns casos, a presença de ligações C=C (faixa entre  $1650$  e  $1550\text{cm}^{-1}$ , onde quando conjugado com C=O apresenta dois picos de menor intensidade em valores próximos a  $1600$  e  $1400\text{cm}^{-1}$ ; isso pode ser um indício da presença do acetato que não reagiu durante a síntese). Observa-se ainda ligações CH e CH<sub>2</sub> angular (advindo de ligações CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>, na faixa entre  $1465$  e  $1375\text{cm}^{-1}$ ), C-O [ésteres (como acetato), éteres, álcoois, e ácidos apresentam picos

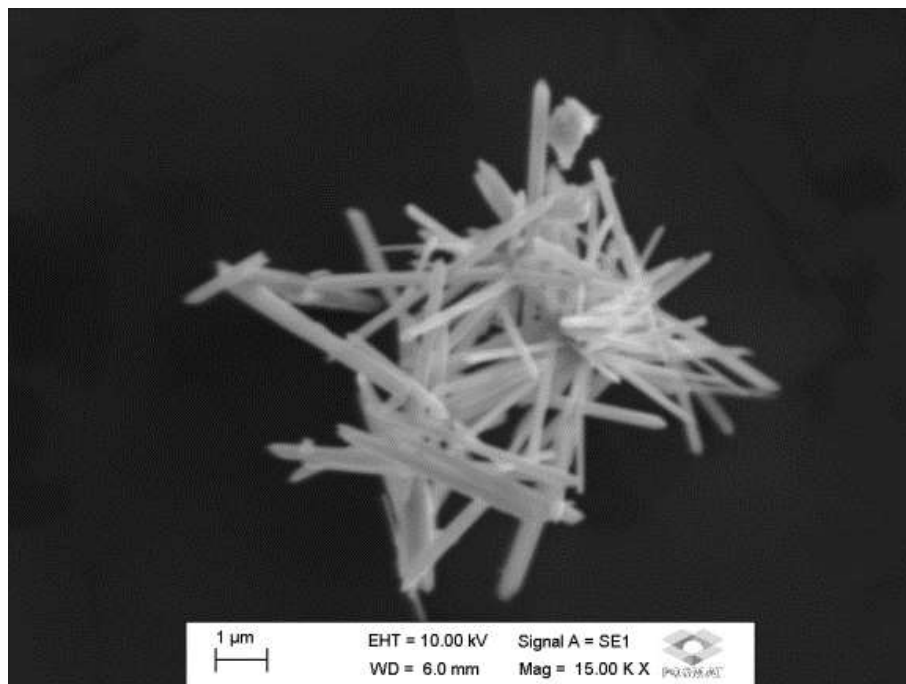
característicos na faixa de  $1300$  a  $1100\text{cm}^{-1}$ ] e  $\text{CH}_2$  (pico por volta de  $900\text{cm}^{-1}$ ) (Silverstein *et al*, 1994). Assim sendo, pode-se afirmar que resíduos de acetato estão presentes no óxido de zinco, uma vez que utilizou-se do mesmo como precursor.

#### 5.1.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

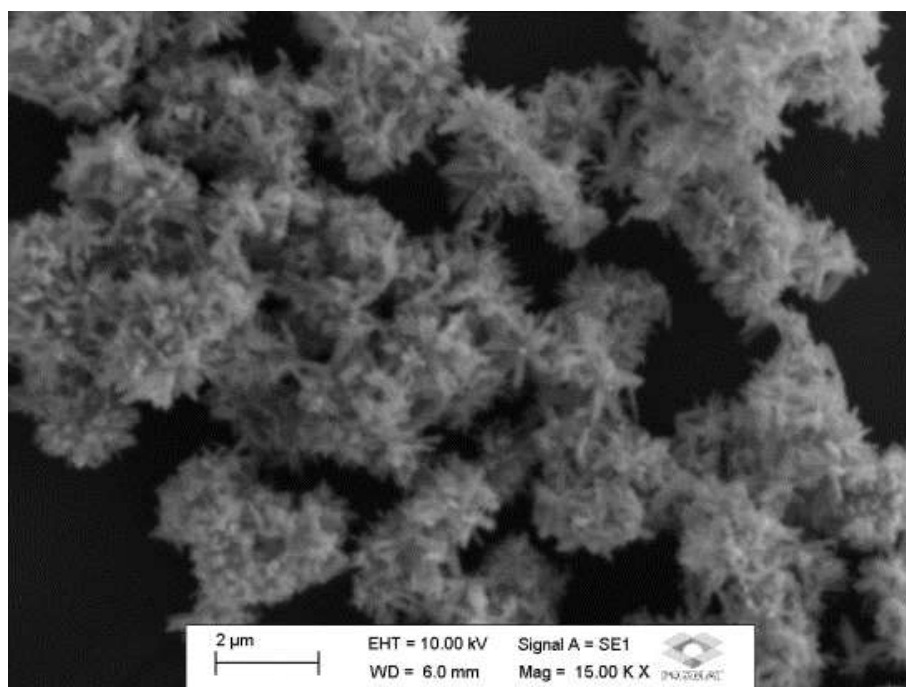
Realizaram-se medidas em um microscópio da Faculdade de Ciências – UNESP Bauru, em diferentes magnitudes para elucidar as morfologias encontradas em cada um dos casos. Nas imagens (Figura 21 a 26) pode-se observar diferentes morfologias dependendo do tempo de síntese.



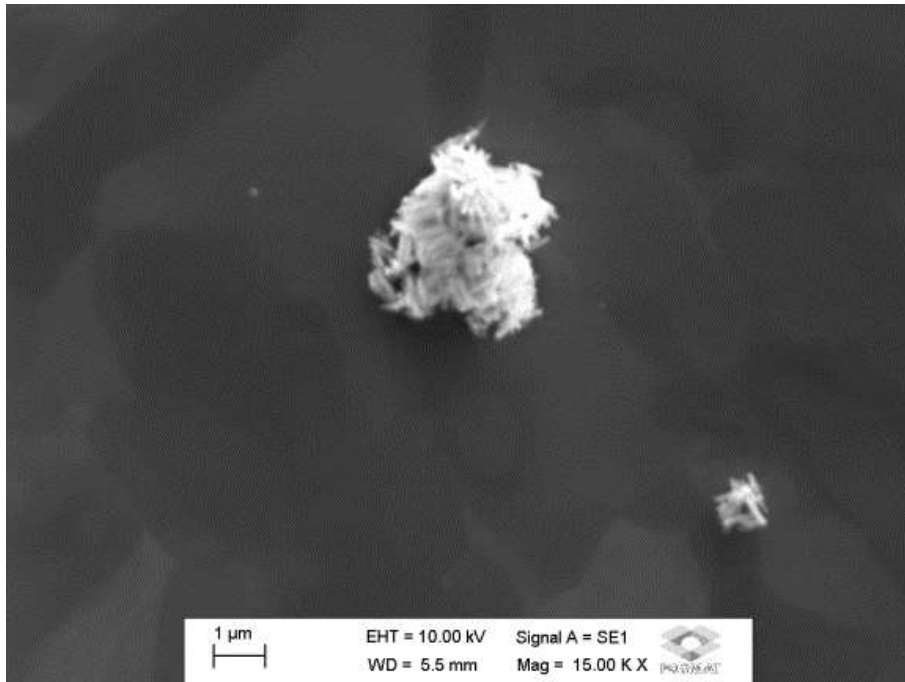
**Figura 21.** Imagem de MEV com aumento de 15000 vezes para a amostra comercial



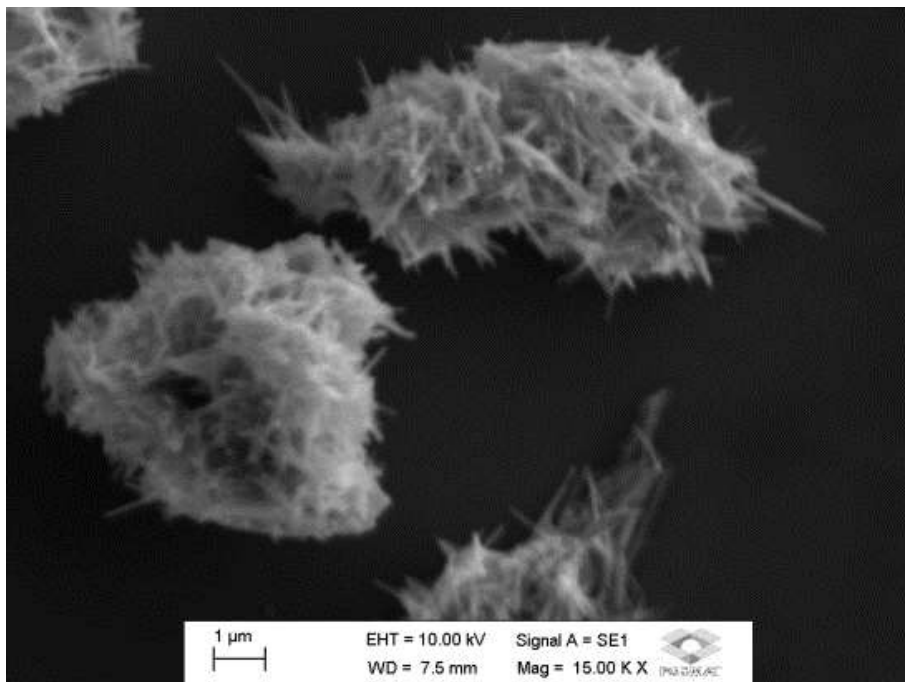
**Figura 22.** Imagem de MEV com aumento de 15000 vezes para a amostra sintetizada sem sonicação



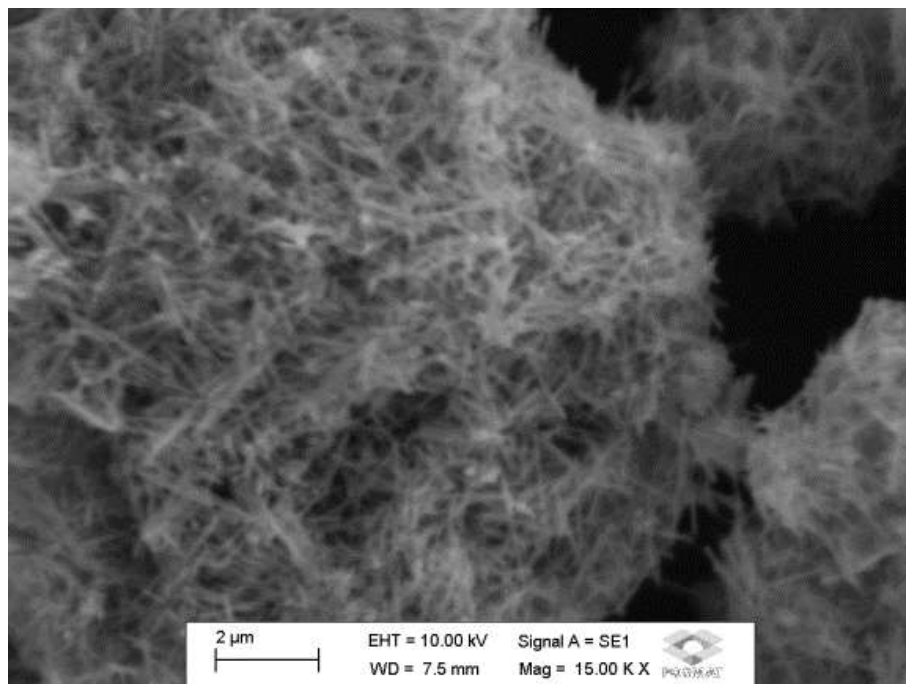
**Figura 23.** Imagem de MEV com aumento de 15000 vezes para a amostra sintetizada com 10 minutos de sonicação



**Figura 24.** Imagem de MEV com aumento de 15000 vezes para a amostra sintetizada com 40 minutos de sonicação



**Figura 25.** Imagem de MEV com aumento de 15000 vezes para a amostra sintetizada com 60 minutos de sonicação



**Figura 26.** Imagem de MEV com aumento de 15000 vezes para a amostra sintetizada com 120 minutos de sonicação

Praticamente todas as amostras (com exceção da síntese de 10 minutos) formaram o que comumente é tido como nanoagulhas, que têm como característica a relação entre comprimento e largura dos mesmos serem de 1 a 100 vezes maior do que o outro. Os valores de comprimento e largura, em nanômetros, para as amostras que formaram nanoagulhas, estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Resultados obtidos de comprimento e largura para as diferentes sínteses de óxido de zinco

| <b>Amostra</b> | <b>Comprimento (nm)</b> | <b>Largura (nm)</b> |
|----------------|-------------------------|---------------------|
| Sem sonicação  | 4000                    | 300                 |
| 40 minutos     | 500                     | 230                 |
| 60 minutos     | 1700                    | 120                 |
| 120 minutos    | 2000                    | 150                 |

A amostra que foi sintetizada em 10 minutos apresentou a morfologia chamada de nanoflor (o diâmetro médio das mesmas foi de 1600nm), que é caracterizada pelas nanoagulhas agrupadas de forma ordenada ao redor de um centro, o que lembra a forma de uma flor.

A partir das imagens, pode-se observar que sem sonicação não ocorreu a formação de nanopartículas. Para as amostras com tempo de síntese de 10 minutos, obteve-se uma morfologia de nanoflores e para as sínteses, a partir de 40 minutos de sonicação, obteve-se uma morfologia de nanoagulhas. Assim sendo, o método sonoquímico mostrou-se interessante para a formação de estruturas em tamanho nanométrico pois, sem a sonicação, observa-se uma morfologia semelhante a obtida ao sonicar, porém em tamanho micrométrico.

## **5.2. Testes biológicos realizados com óxido de zinco (ZnO)**

### **5.2.1. Escolha das amostras**

As amostras foram escolhidas a partir das medidas anteriormente discutidas. Primeiramente, escolheram-se as amostras de diferentes morfologias e que apresentavam o tamanho nanométrico. Quando houve amostras com mesma morfologia, decidiu-se a partir de fatores como rendimento, perfis de raios x, UV-VIS, infravermelho e diferença de comprimento e diâmetro.

Observando-se todos esses fatores, utilizou-se para os testes as amostras sintetizadas em 10 minutos e a sintetizada em 60 minutos, pois ambas apresentaram boa homogeneidade, perfil de UV-VIS bem caracterizado, nanoflores e nanoagulhas de tamanho nanométrico para os tempos de 10 e 60 minutos, respectivamente e um alto rendimento de síntese.

Assim sendo, todos os testes biológicos foram realizados com base na morfologia encontrada e assim as amostras com tempo de síntese de 10 minutos serão chamadas de “ZnO(f)” e as amostras com tempo de síntese de 60 minutos serão chamadas de “ZnO(a)”, para uma melhor compreensão dos fenômenos observados nos experimentos.

### 5.2.2. Testes de interação com albumina humana (HSA)

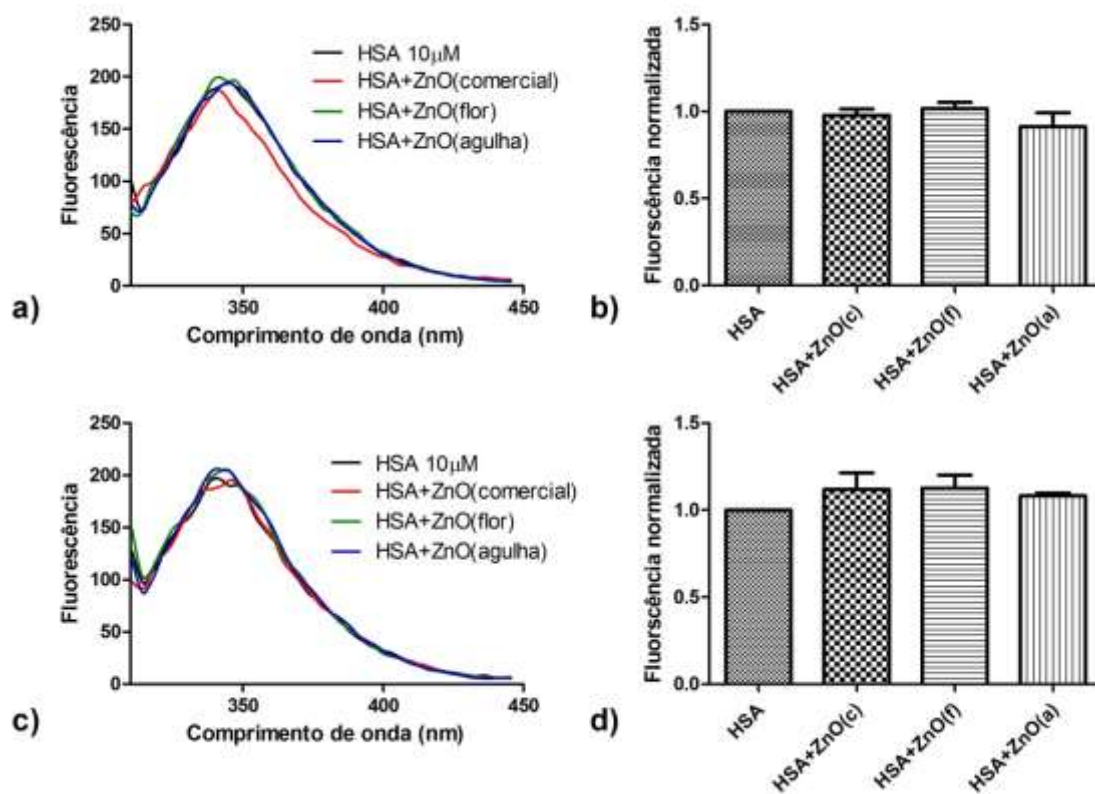
Como anteriormente descrito, a escolha das amostras para realização dos testes biológicos foi baseada principalmente na morfologia e dimensões das nanopartículas, ou seja, houve a escolha das duas morfologias predominantes, agulha e flor. Adicionalmente, houve o estudo e a comparação do efeito das nanopartículas sintetizadas neste trabalho com uma amostra comercial. A primeira abordagem foi verificar o efeito que o contato das mesmas com a proteína albumina poderia provocar.

Nesses experimentos, as nanopartículas, previamente suspensas em PBS na concentração de 0,1mg/mL, foram incubadas com HSA em tampão PBS, pH 7,4 e 37°C por 1 e 7 dias. Inicialmente houve uma análise da presença das nanopartículas poderia causar alguma alteração na fluorescência intrínseca da albumina. Como pode ser observado nos resultados apresentados na Figura 27, mesmo após sete dias de incubação, não se observou alterações significativas no perfil do espectro de fluorescência intrínseca da proteína.

Dois pontos precisam ser ressaltados aqui: Primeiro, poderia ser observado uma supressão da fluorescência, ou seja, diminuição de intensidade. De fato, há relatos na literatura de que isso pode ser provocado por algumas nanopartículas (Horie *et al*, 2009), e inclusive foi descrito para o ZnO. No estudo realizado por Bhogale e colaboradores (2013) supressão de fluorescência causada pelo ZnO foi utilizada para o cálculo da constante de ligação entre a albumina e a mesma. Nos experimentos realizados nesse trabalho também poderia ter sido observado resultado semelhante, caso



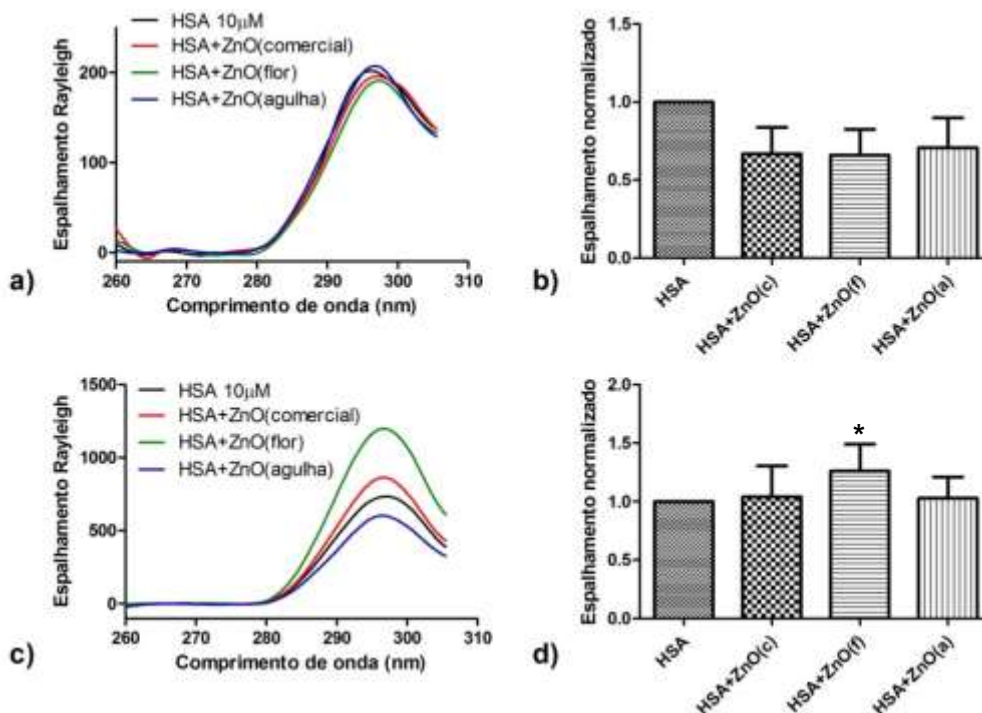
aumentássemos a concentração das nanopartículas no meio. No entanto, esta interpretação de artigos anteriores está falha, considerando que, embora com dimensões reduzidas (ordem de 10-100nm), as nanopartículas são ainda muito maiores do que a molécula de albumina (500Å). Assim, não é possível conceber, como os autores propuseram (Bhogale *et al*, 2013), que a mesma se ligue nos sítios de ligação da proteína. O efeito mais importante observado é a interação da proteína com a superfície das nanopartículas e isso poderia causar alterações estruturais na mesma. No entanto, essa possível interação não causou alteração significativa, mesmo após uma semana de contato sob agitação. Vale lembrar que uma alteração no perfil ou um deslocamento do máximo de fluorescência, seja para comprimentos de onda maiores ou menores, poderia indicar alteração conformacional da mesma (Lakowicz, 2006), o que não se verificou.



**Figura 27.** Fluorescência intrínseca da HSA e o efeito da interação com ZnO nanoestruturado.

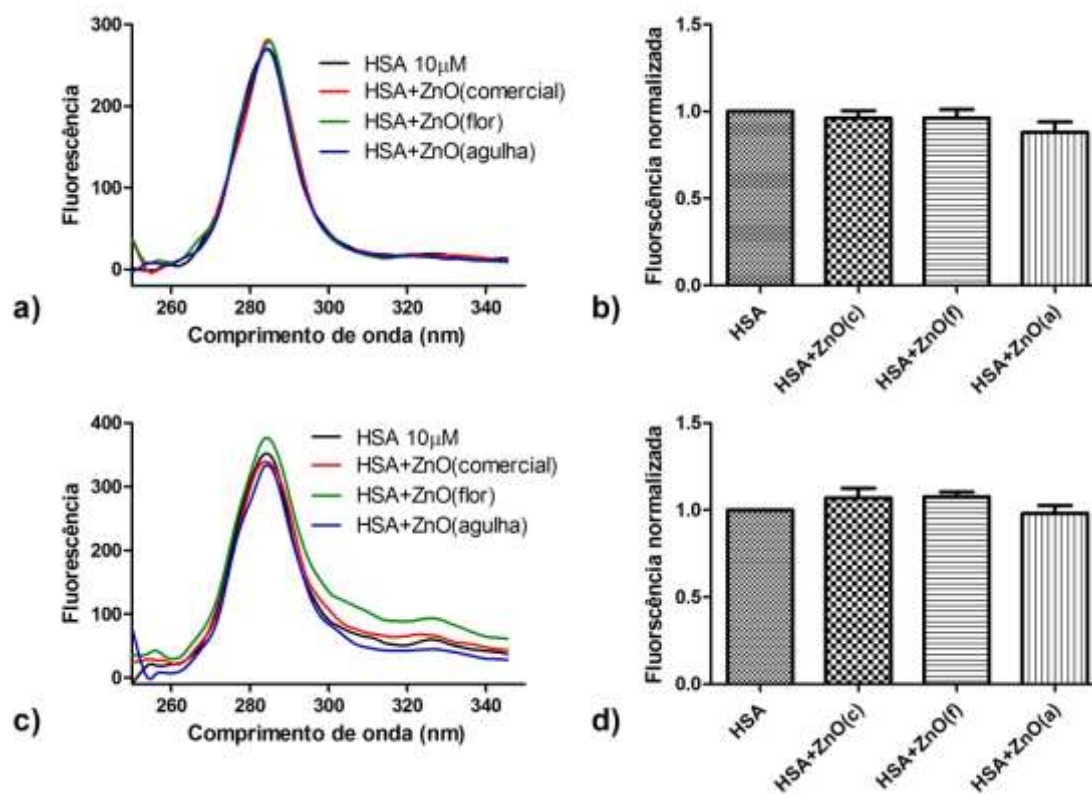
ZnO (0,1mg/mL) foi incubado com HSA (10 $\mu$ M) em PBS, pH 7.4, temperatura 37°C. **(a)** Espectro de fluorescência da HSA na presença ou ausência de ZnO após 24 horas de incubação. **(b)** Intensidade de fluorescência normalizada após 24 horas de incubação. **(c)** Espectro de fluorescência da HSA na presença ou ausência de ZnO após 168 horas de incubação. **(d)** Intensidade de fluorescência normalizada após 168 horas de incubação. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas; e os testes estatísticos realizados pelo One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey.

Na sequência, foram realizados experimentos para verificar se a interação das nanopartículas com a proteína poderia causar a agregação da mesma. Um dos métodos para se verificar o nível de agregação é medir o espalhamento de luz causado quando uma solução contendo a substância é irradiada no comprimento de onda que absorve e monitorar a luz espalhada em torno dessa região com o detector posicionado em um ângulo de 90° em relação à luz incidente. Este espalhamento de luz de mesma energia daquela incidente é conhecido como espalhamento Rayleigh e muito utilizado para se estudar agregação de proteínas (Lakowicz, 2006). O que se espera, caso ocorra agregação, é um aumento do sinal, o que não ocorreu, como pode ser observado na Figura 28, para o tempo de 24 horas de incubação. Este resultado é consistente com os resultados de alteração na fluorescência intrínseca e comprova a ausência de efeitos provocados pelas nanopartículas. Por outro lado, uma pequena agregação pôde ser observada para as amostras incubadas por sete dias. Este efeito foi ainda mais pronunciado para as nanopartículas, cuja estrutura predominante era em flores.

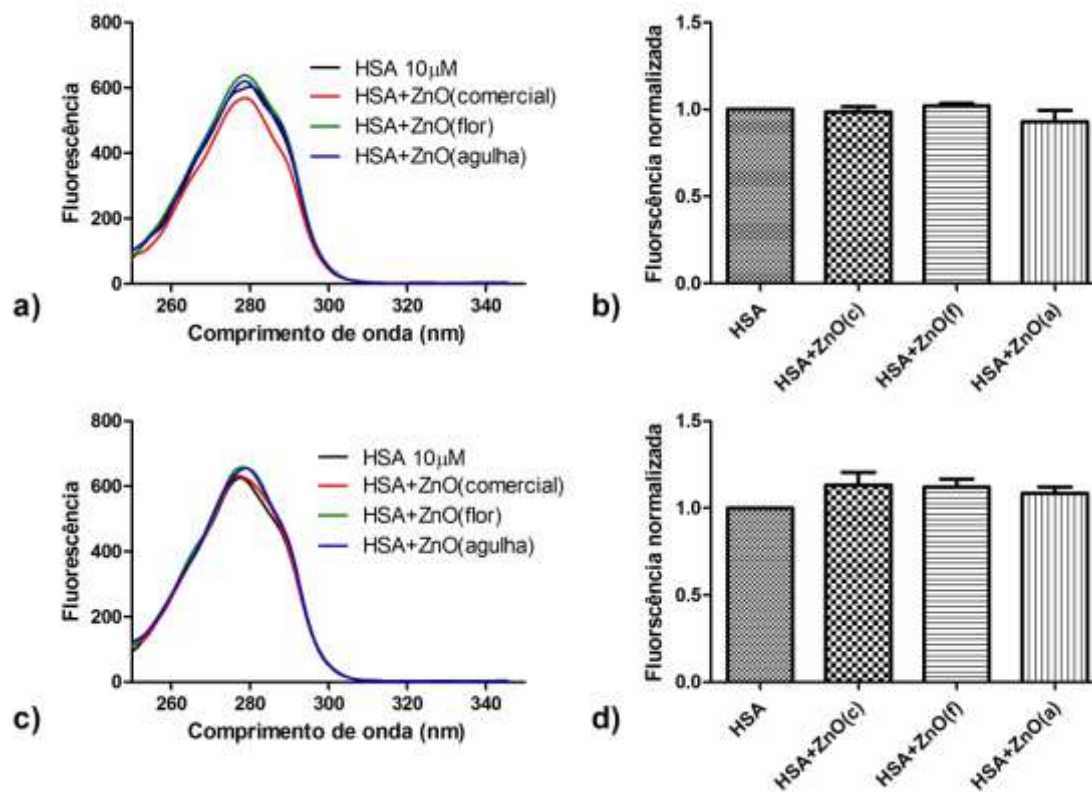


**Figura 28.** Espalhamento de luz Rayleigh em HSA e o efeito da interação com ZnO nanoestruturado. ZnO (0,1mg/mL) foi incubado com HSA (10 $\mu$ M) em PBS, pH 7.4, temperatura 37°C. **(a)** Espectro de fluorescência da HSA na presença ou ausência de ZnO após 24 horas de incubação. **(b)** Intensidade de fluorescência sincronizada após 24 horas de incubação. **(c)** Espectro de fluorescência da HSA na presença ou ausência de ZnO após 168 horas de incubação. **(d)** Intensidade de fluorescência normalizada após 168 horas de incubação. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas. \*valor significativamente diferente quando comparado ao valor de HSA ( $p < 0,05$ ) (One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey).

Na sequência foram realizadas medidas de fluorescência sincronizadas, onde os comprimentos de ondas de emissão e excitação variam simultaneamente e a diferença de frequência é sempre a mesma. Essa técnica dá espectros característicos mais definidos e diferenciados, diminuindo erros sobre o espectro característico do HSA (Pis *et al*, 2011). Assim como na fluorescência intrínseca, um deslocamento do máximo do pico ou uma supressão da fluorescência poderiam indicar que ocorreu uma interação da proteína com o meio reacional (Lakowicz, 2006). Nesta abordagem experimental, utiliza-se  $\Delta\lambda=15$  nm e 60 nm, para detectar alterações nas vizinhanças de resíduos de tirosina e triptofano na proteína, respectivamente (Rubio *et al*, 1986). Como pode ser observado em Figura 29 e Figura 30, não se observou alterações significativas nos espectros de fluorescência sincronizada HSA quando incubadas com ZnO.



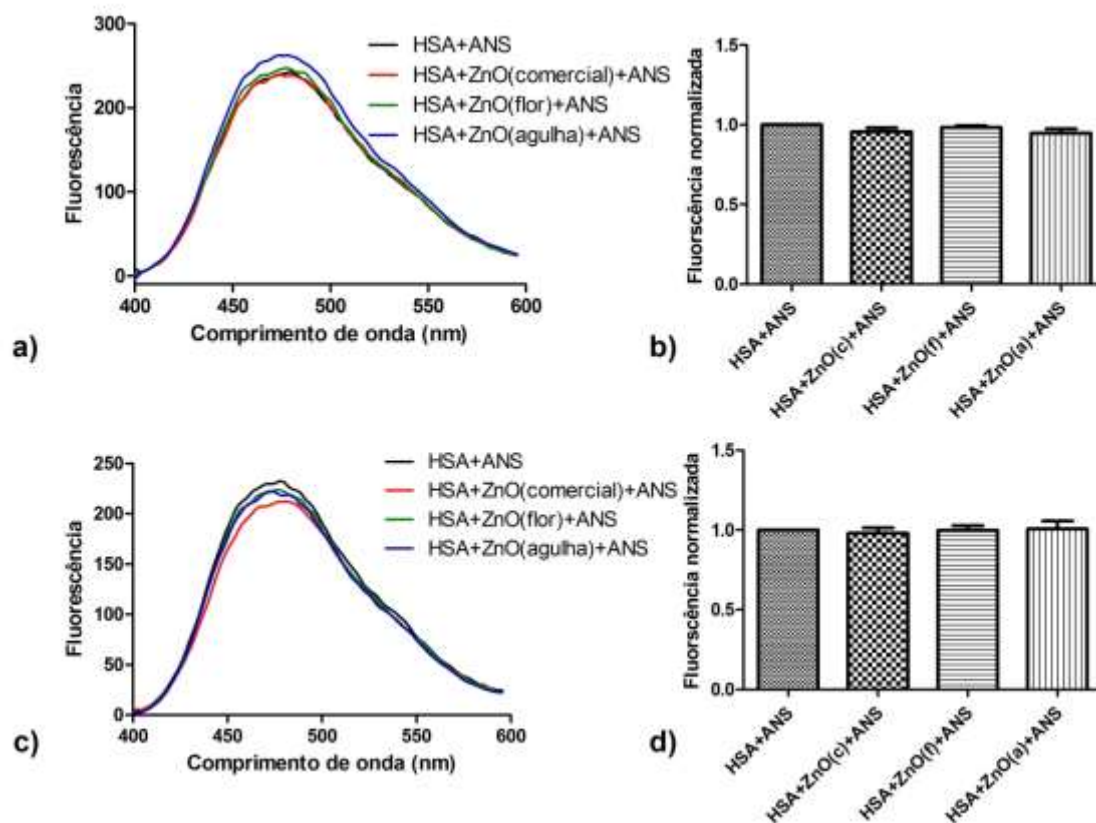
**Figura 29.** Fluorescência sincronizada com um  $\Delta=15$  em HSA e o efeito da interação com ZnO nanoestruturado. ZnO (0,1mg/mL) foi incubado com HSA (10 $\mu$ M) em PBS, pH 7.4, temperatura 37°C. **(a)** Espectro de espalhamento da HSA na presença ou ausência de ZnO após 24 horas de incubação. **(b)** Intensidade de espalhamento normalizado após 24 horas de incubação. **(c)** Espectro de espalhamento da HSA na presença ou ausência de ZnO após 168 horas de incubação. **(d)** Intensidade de espalhamento normalizado após 168 horas de incubação. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas; e os testes estatísticos realizados pelo One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey.



**Figura 30.** Fluorescência sincronizada com um  $\Delta=60$  em HSA e o efeito da interação com ZnO nanoestruturado. ZnO (0,1mg/mL) foi incubado com HSA (10 $\mu$ M) em PBS, pH 7.4, temperatura 37°C. **(a)** Espectro de espalhamento da HSA na presença ou ausência de ZnO após 24 horas de incubação. **(b)** Intensidade de espalhamento normalizado após 24 horas de incubação. **(c)** Espectro de espalhamento da HSA na presença ou ausência de ZnO após 168 horas de incubação. **(d)** Intensidade de espalhamento normalizado após 168 horas de incubação. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas; e os testes estatísticos realizados pelo One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey.

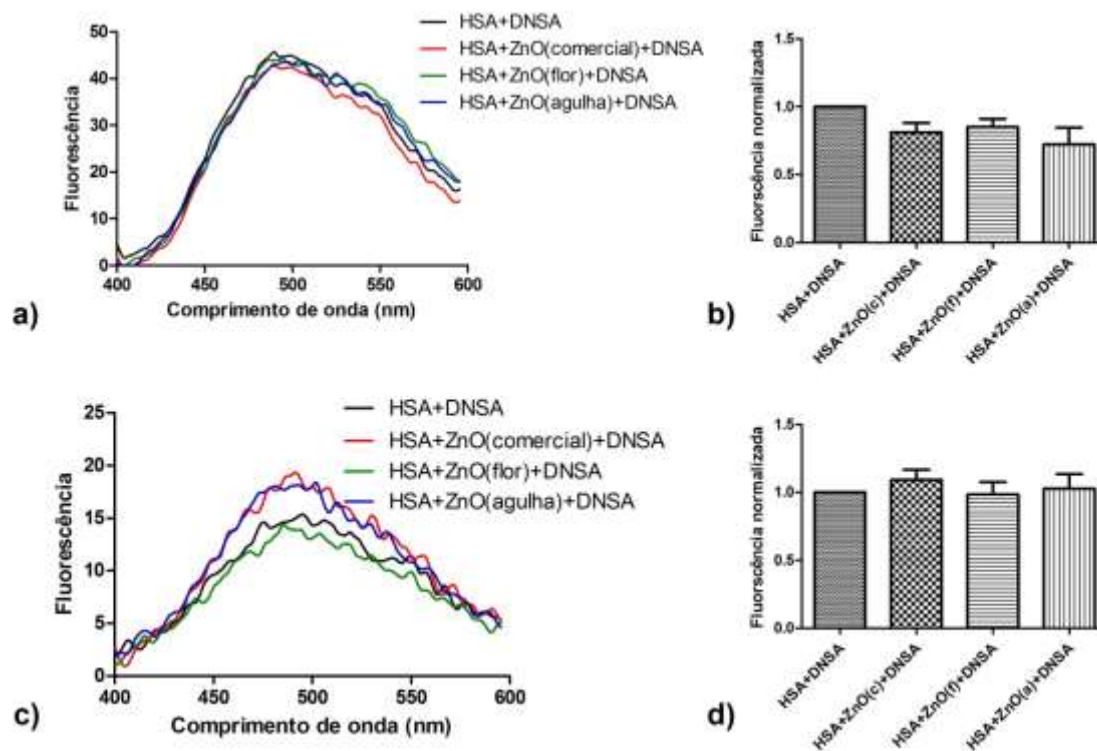
Foram também realizados testes com as sondas fluorescentes ANS, DNSA e DG. A sonda ANS se caracteriza por ter a sua fluorescência aumentada quando ligada em sítios hidrofóbicos das proteínas. Dessa maneira, caso ocorra alterações na proteína e que levem à exposição de sítios hidrofóbicos, um aumento na fluorescência do ANS será verificado (Moreno e Jimenez, 1999). Os resultados apresentados na Figura 31 mostram que não ocorreu alteração significativa também para este parâmetro.





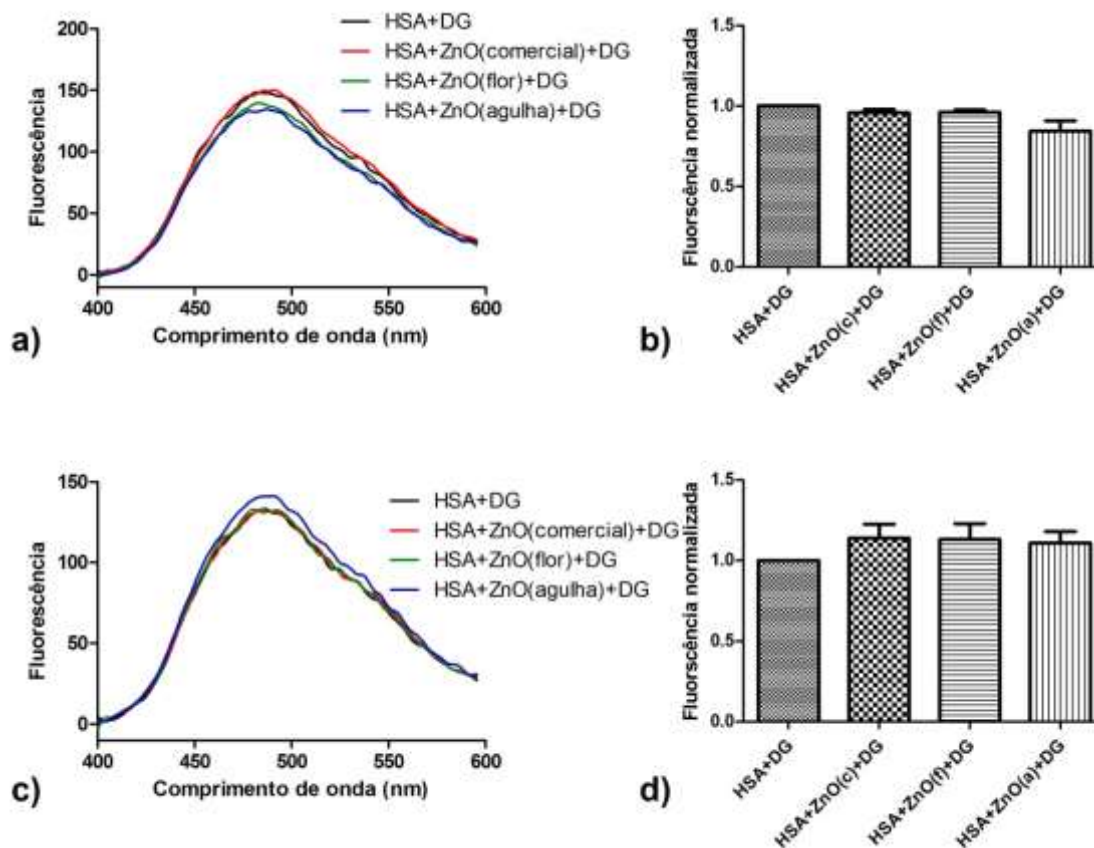
**Figura 31.** Fluorescência da sonda ANS em HSA e o efeito da interação com ZnO nanoestruturado (0,1mg/mL) foi incubado com HSA (10 $\mu$ M) em PBS, pH 7.4, temperatura 37°C. **(a)** Espectro de fluorescência da HSA na presença ou ausência de ZnO após 24 horas de incubação; também é possível comparar a presença e ausência do HSA interagindo com ANS. **(b)** Intensidade de fluorescência normalizada após 24 horas de incubação. **(c)** Espectro de fluorescência da HSA na presença ou ausência de ZnO após 168 horas de incubação. **(d)** Intensidade de fluorescência normalizada após 168 horas de incubação. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas; e os testes estatísticos realizados pelo One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey.

As sondas DNSA e DG são utilizadas para caracterização dos sítios de ligação em albumina, sendo a sonda DNSA específica para o sítio I e DG para o sítio II (Loving *et al*, 2010; Yan *et al*, 2004; Doi *et al*, 2002; Lakowicz, 2006). Da mesma forma que o ANS, as sondas DNSA e DG também são caracterizadas por um aumento em suas fluorescências quando complexadas à albumina. São bastante utilizadas para estudar a interação de fármacos com HSA, de modo que se houver a interação entre o medicamento e o sítio ocorrerá diminuição da fluorescência, o que pode indicar que o mesmo se liga naquele sítio específico (Moreno e Jimenez, 1999). Assim sendo, o que se espera em estudos como esse é que, caso as nanopartículas causem alguma alteração nas vizinhanças desses sítios, se observaria alguma alteração no espectro de fluorescência das mesmas. Como pode ser observado pelos resultados apresentados em Figura 32 e Figura 33, novamente não se observou alterações significativas. Mesmos os espectros que se apresentaram um pouco abaixo do controle (HSA+sonda) não se reproduziram nas repetições, de modo que na média não houve alteração significativa.



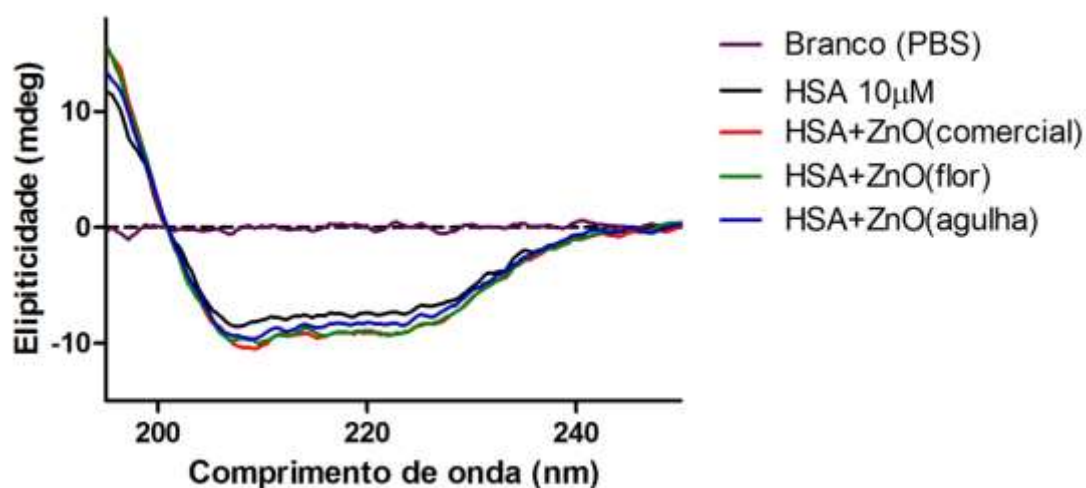
**Figura 32.** Fluorescência da sonda DNSA em HSA e o efeito da interação com ZnO nanoestruturado (0,1mg/mL) foi incubado com HSA (10 $\mu$ M) em PBS, pH 7.4, temperatura 37°C.

**(a)** Espectro de fluorescência da HSA na presença ou ausência de ZnO após 24 horas de incubação; também é possível comparar a presença e ausência do HSA interagindo com DNSA. **(b)** Intensidade de fluorescência normalizada após 24 horas de incubação. **(c)** Espectro de fluorescência da HSA na presença ou ausência de ZnO após 168 horas de incubação. **(d)** Intensidade de fluorescência normalizada após 168 horas de incubação. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas; e os testes estatísticos realizados pelo One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey.



**Figura 33.** Fluorescência da sonda DG em HSA e o efeito da interação com ZnO nanoestruturado (0,1mg/mL) foi incubado com HSA (10 $\mu$ M) em PBS, pH 7.4, temperatura 37°C. **(a)** Espectro de fluorescência da HSA na presença ou ausência de ZnO após 24 horas de incubação; também é possível comparar a presença e ausência do HSA interagindo com DG. **(b)** Intensidade de fluorescência normalizada após 24 horas de incubação. **(c)** Espectro de fluorescência da HSA na presença ou ausência de ZnO após 168 horas de incubação. **(d)** Intensidade de fluorescência normalizada após 168 horas de incubação. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas; e os testes estatísticos realizados pelo One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey.

Por último, foram realizadas medidas de CD (dicroísmo circular), que apresentam uma análise da estrutura secundária das proteínas, gerando um perfil característico da albumina que são atribuídos aos resíduos de triptofano e às ligações de dissulfeto. Essa técnica é altamente sensível e nos fornece informações importantes sobre o tipo de ligação que está sendo formada entre a proteína e um potencial supressor. Os gráficos da análise de CD podem ser observados na Figura 34.

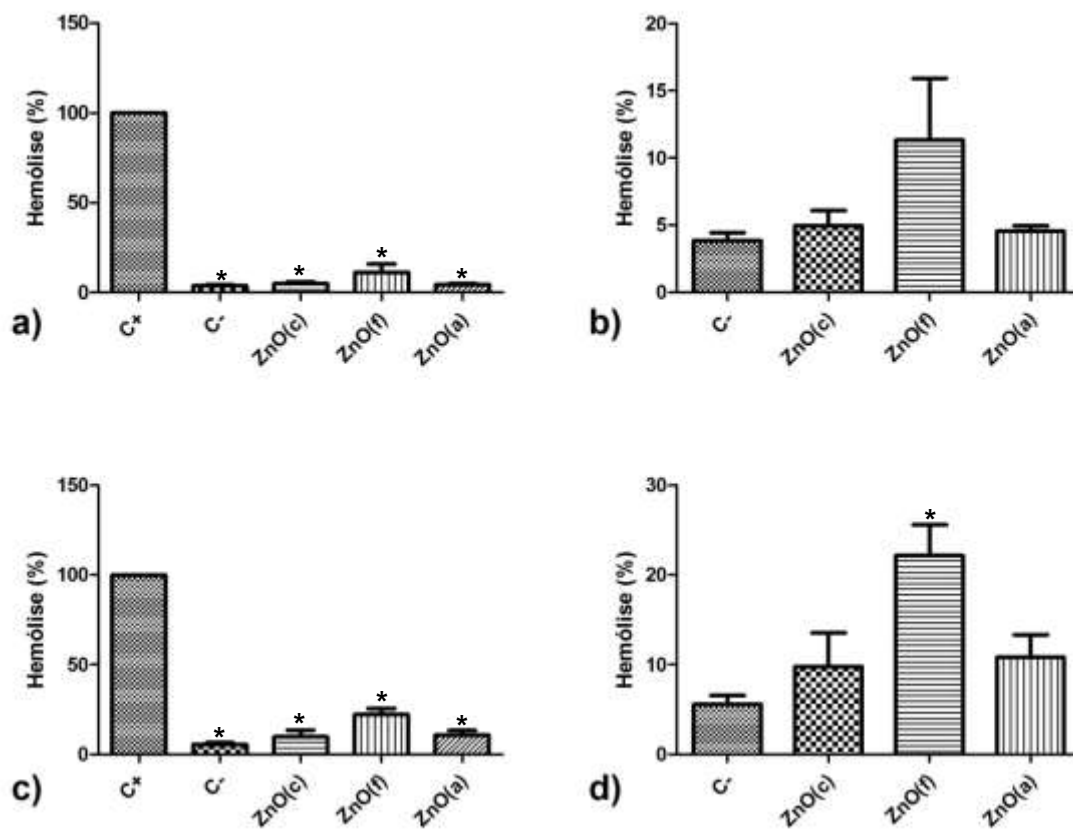


**Figura 34.** Espectro de CD da HSA e o efeito da interação com ZnO nanoestruturado (0,1mg/mL) incubado com HSA (10µM) por 168 horas em PBS, pH 7.4, temperatura 37°C.

Como pode ser observado no gráfico, nenhuma morfologia de óxido de zinco foi capaz de mudar a estrutura secundária das proteínas, mesmo após 7 dias de incubação.

### 5.2.3. Testes realizados com eritrócitos humanos (hemólise)

Para dar prosseguimento aos estudos sobre o potencial deletério de nanopartículas de ZnO, houve uma tentativa de aproximação do meio vivo. Em outras palavras, passando dos estudos com proteínas para estudos com células humanas. O modelo escolhido para esse estudo foi o efeito das nanopartículas com eritrócitos humanos, que foram separados a partir do sangue total. O estudo da hemólise de eritrócitos tem sido amplamente utilizado como um modelo *ex vivo* para o estudo da ruptura de membranas celulares induzida por espécies reativas de oxigênio e, para avaliar o efeito protetor de antioxidantes (Faria, 2014). O ensaio se baseia no rompimento da membrana celular e consequente extravasamento da hemoglobina, ou seja, provocando a hemólise dos eritrócitos. O grau de hemólise é avaliado pelo aumento da absorbância devido ao conteúdo de hemoglobina liberado ao meio. Assim sendo, foram realizados os testes de hemólise para a avaliação do poder oxidativo do óxido de zinco em hemácias humanas para a avaliação citotóxica das mesmas. Uma vez que já foram encontrados danos à parede celular (Cho *et al*, 2013), o estudo se tornou interessante, pois através desse teste preliminar, prever a citotoxicidade do óxido de zinco em diferentes morfologias. Na realização desse ensaio, o controle positivo é obtido incubando os eritrócitos com água destilada, o que causa a hemólise total das células. Como pode ser observado nos resultados apresentados na Figura 35, com exceção das nanopartículas com morfologia em flor, as demais não causaram hemólise maior do que aquela observada para o controle negativo. Após 48 horas, observou-se um aumento em relação ao controle negativo mas, com exceção da estrutura em flor, não significativo.



**Figura 35.** Análise do efeito da interação com ZnO nanoestruturado (0,1mg/mL) incubado com eritrócitos à temperatura de 37°C. **(a)** Gráfico comparativo de hemólise normalizada com tempo de 24 horas de incubação **(b)** Gráfico comparativo de hemólise normalizada com tempo de 24 horas de incubação, analisando-se os resultados sem comparar com o C+ **(c)** Gráfico comparativo de hemólise normalizada com tempo de 48 horas de incubação **(d)** Gráfico comparativo de hemólise normalizada com tempo de 24 horas de incubação, analisando-se os resultados sem comparar com o C+. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas. \*(para os gráficos a e c): valor significativamente menor quando comparado ao valor de C+ ( $p < 0,05$ ) (One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey). \*(para os gráficos b e d) valor significativamente diferente quando comparado ao valor de C- ( $p < 0,05$ ) (One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey).

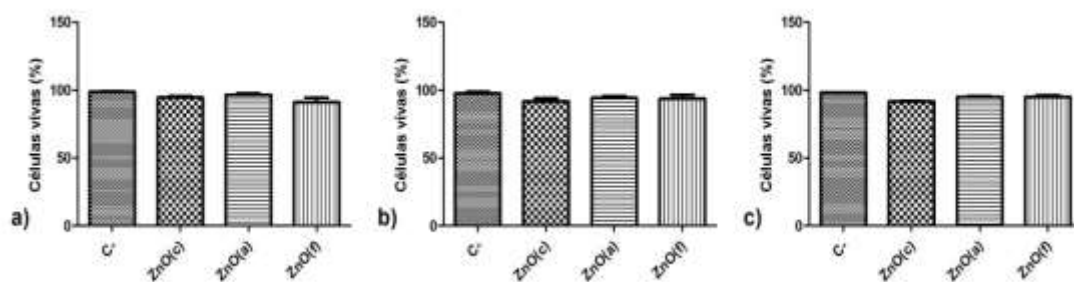
#### 5.2.4. Testes realizados com neutrófilos

O ZnO nanoparticulado já está sendo amplamente estudado, porém a sua segurança quanto aos humanos não está ainda totalmente conhecida e os mecanismos regulatórios intracelulares envolvidos entre o ZnO e a indução da citotoxicidade é pouco clara (Ramussen *et al*, 2010). Neste contexto, a interação direta entre nanopartículas e células polimorfonucleares é pouco documentada. Nos poucos estudos que foram feitos, foi demonstrado que a resposta biológica dos neutrófilos pode ser alterada na presença das nanopartículas. Entre outras coisas, foi encontrado que o ZnO pode causar a degranulação dos neutrófilos. Gonçalves e Girard (Gonçalves e Girard, 2014) realizaram um estudo onde demonstraram que o ZnO nanoparticulado pode causar a ativação de neutrófilos, uma vez que causa a mudanças na forma da célula. Porém, os autores afirmam que o ZnO nanoestruturado não induz a geração EROs em neutrófilos humanos. Esse resultado difere de alguns encontrados na literatura, que demonstram estresse celular em células epiteliais humanas de pulmão e apoptose induzida pela produção de EROs em células humanas de fígado (Huang *et al*, 2010). Além disso, encontraram que o ZnO poderia inibir a apoptose de neutrófilos, uma vez que impede a polimerização dos mesmos, pois impede a célula de se dividir (Sharma *et al*, 2012). Assim, o próximo passo foi estudar o efeito das nanopartículas aqui sintetizadas como promotoras da ativação do burst oxidativo dos neutrófilos.



#### 5.2.4.1. Teste de exclusão por azul de Trypan

O primeiro passo foi avaliar se as nanopartículas exerceriam um papel citotóxico aos neutrófilos e, para isso, usou-se o corante azul de Trypan. Trata-se de um corante vital não permeável à membrana. Este processo baseia-se no princípio de que células vivas possuem permeabilidade seletiva de membrana e, portanto, não adquirem citoplasma azulado, e que em células mortas o corante é permeável às mesmas, que penetra livremente adquirindo citoplasma e núcleo azulado. Nesse caso, o azul de Trypan cora as células que tiveram o rompimento da membrana, ou seja, foi quantificada as células que tiveram morte celular por necrose. Assim, a morte celular por apoptose não pode ser avaliada (Cavalcanti, 2003). Como pode ser observado na Figura 36, a incubação dos neutrófilos com as nanopartículas de ZnO não provocou a morte das mesmas. Realizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Tuckey nos valores de porcentagem de células vivas. As análises foram feitas no programa GraphPad Prism e não mostraram diferença significativa entre o resultado do controle negativo e das amostras. Além disso, todas as amostras apresentaram valores acima de 91% de viabilidade celular, resultado este que mostra que o óxido de zinco possui uma baixa citotoxicidade.

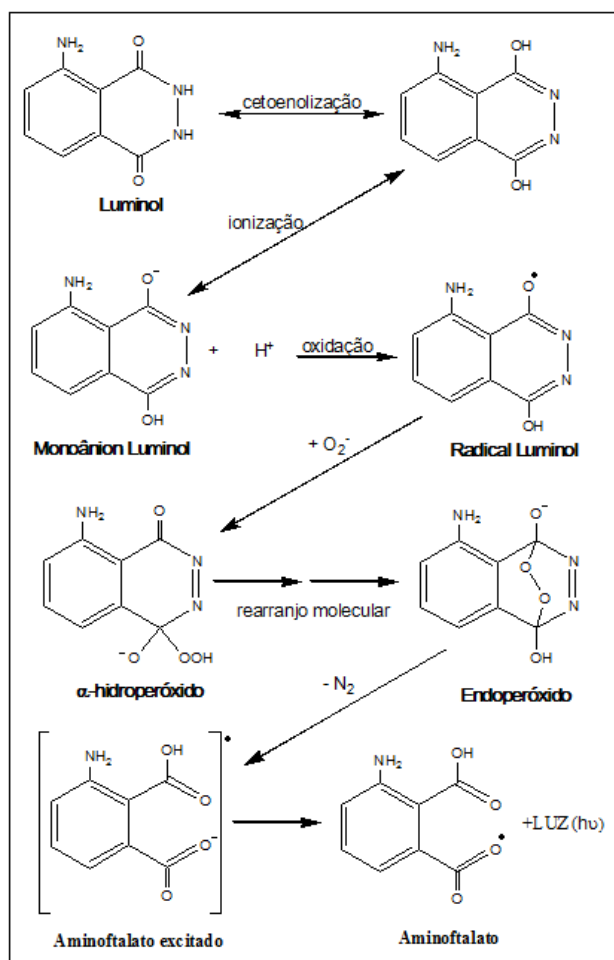


**Figura 36.** Análise do efeito da interação com ZnO nanoestruturado (0,1mg/mL) incubado com células polimorfonucleares à temperatura de 37°C. **(a)** Gráfico comparativo de dano celular em 30 minutos de incubação **(b)** Gráfico comparativo de dano celular em 60 minutos de incubação **(c)** Gráfico comparativo de dano celular em 90 minutos de incubação. Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas; e os testes estatísticos realizados pelo One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey.

#### 5.2.4.2. Ensaio de quimiluminescência dependente do Luminol

O fenômeno da quimiluminescência pode ser explicado pelo fato de que em determinados processos de oxidação formam-se moléculas-produto no estado eletronicamente excitado, que podem decair ao estado fundamental emitindo luz (Costa, 2003). A quimiluminescência dependente do Luminol é um ensaio utilizado para a quantificação de EROs (peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, radical ânion superóxido e oxigênio singlete) produzidos pela estimulação dos neutrófilos. Esse método é utilizado para a detecção de todas as EROs formadas no “burst” oxidativo, indistintamente (Paracatu, 2012).

O Luminol sofre reações que produzem intermediários em estados eletronicamente excitados, que decaem com emissão de luz, conforme pode ser observado na Figura 37.

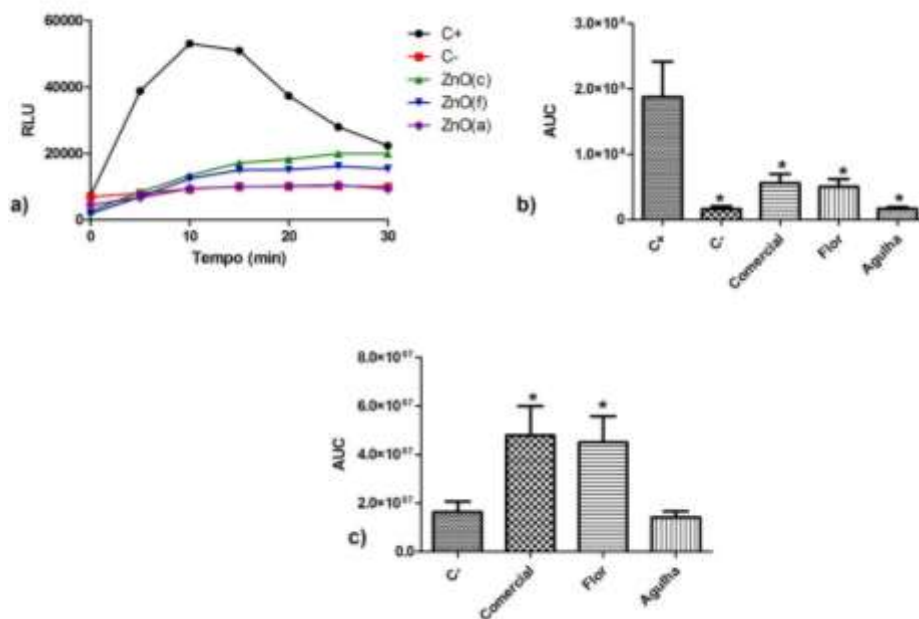


**Figura 37.** Reação química dependente do Luminol. As EROs convertem o Luminol via oxigenação em intermediários instáveis e excitados, emitindo luz na forma de fótons (Santos et al, 1993)

A oxidação do Luminol pode tanto ocorrer pelo sistema MPO/ $\text{H}_2\text{O}_2$  (ação peroxidásica) como devido à reação Luminol/HOCl com a formação de uma diazoquinona, que posteriormente reage com  $\text{H}_2\text{O}_2$  formando aminoftalato eletronicamente excitado, que ao voltar ao estado fundamental emite luz. Dalgren e Karlson mostraram que a QLDL produzida por neutrófilos

estimulados depende grande parte da geração de HOCl pelo sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Cl<sup>-</sup> (Santos *et al*, 1993).

Os resultados apresentados na Figura 38 mostram a cinética de emissão de luz (RLU) produzida pela estimulação dos neutrófilos. Como controle positivo utilizou-se o estímulo PMA. A Figura mostra também que as nanopartículas foram capazes de uma pequena estimulação. Como pode ser observado, a nanoestrutura em flor foi novamente mais efetiva do que aquela em agulha.

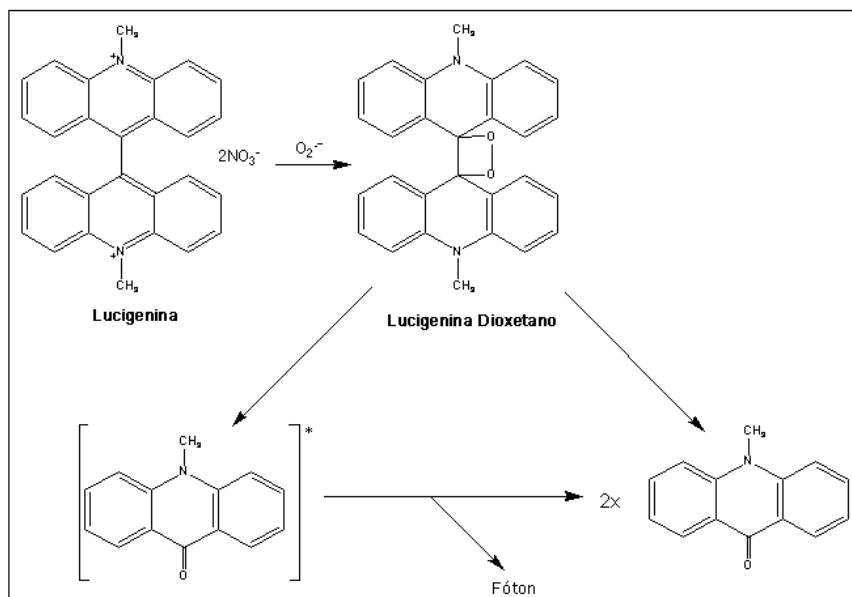


**Figura 38.** Análise do efeito da interação com ZnO nanoestruturado (0,1mg/mL) incubado com células polimorfonucleares e Luminol à temperatura de 37°C e 30 minutos de incubação. **(a)** Curvas de luminescência obtidas no equipamento **(b)** Gráfico comparativo de valores de área abaixo da curva na excitação de polimorfonucleares através de PMA e polimorfonucleares sem estímulo \*valor significativamente menor quando comparado ao valor de C+ ( $p < 0,05$ ) (One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey). **(c)** Gráfico comparativo excitação de polimorfonucleares com ZnO e polimorfonucleares sem estímulo. \*valor significativamente menor quando comparado ao valor de C- ( $p < 0,05$ ) (One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey). Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas.

### 5.2.4.3. Ensaio da quimiluminescência dependente da Lucigenina

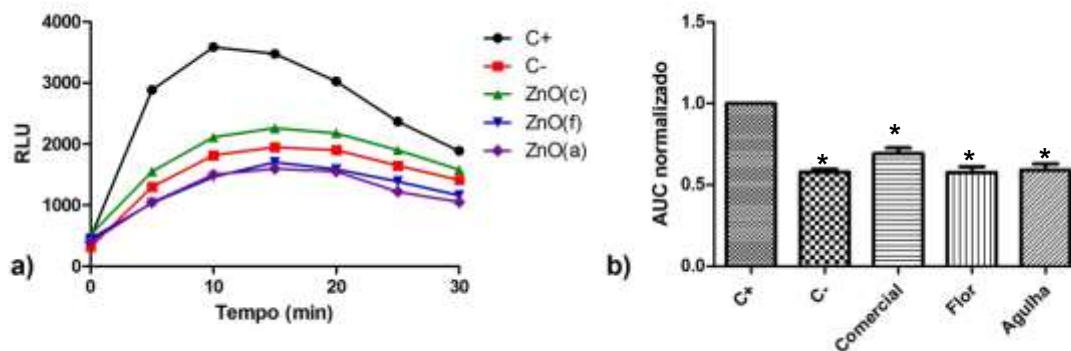
A quimiluminescência dependente da Lucigenina é um ensaio utilizado especificamente para a quantificação da geração de ânion superóxido no *burst* oxidativo de neutrófilos e outras células. A quimiluminescência dependente da Lucigenina tem sido utilizada em sistemas biológicos como uma avaliação de eventos extracelulares, pela detecção do radical ânion superóxido, sendo um método de escolha na avaliação do funcionamento do NADPH oxidase de membrana. Entretanto a Lucigenina pode ser utilizada para avaliação de outros sistemas como NADH-desidrogenase, NADPH-citocromo P450 redutase, em microsomas, xantina oxidase e NADPH oxidases em células vasculares e células musculares lisas (Faria, 2014).

A reação se inicia com a redução univalente da Lucigenina pelo radical ânion superóxido para o radical correspondente, que então reage com  $O_2^-$ , para produzir um intermediário dioxetano, que é decomposto em duas moléculas de acridina, estando uma delas no estado eletrônico excitado e capaz de emitir luz ao retornar ao estado fundamental (Van Dyke, 1987; Figueiredo, 2010) (Figura 39).



**Figura 39.** Reação química dependente da Lucigenina. A Lucigenina detecta especificamente a produção do ânion superóxido, gerando intermediários instáveis e excitados emitindo luz na forma de fótons (Schepetkin, 1999).

Os resultados apresentados na Figura 40 mostram a cinética de emissão de luz (RLU) no tempo de 30 minutos com células polimorfonucleares, com as células sendo estimuladas por PMA e as células após a interação com óxido de zinco em diferentes morfologias, e um estudo comparativo da capacidade do óxido de zinco de estimular as células polimorfonucleares (resultados normalizados a partir da Equação 5).



**Figura 40.** Análise do efeito da interação com ZnO nanoestruturado (0,1mg/mL) incubado com células polimorfonucleares e Lucigenina à temperatura de 37°C e 30 minutos de incubação. **(a)** Curvas de luminescência obtidas no equipamento **(b)** Gráfico comparativo dos valores de área abaixo da curva encontrada na excitação de polimorfonucleares através de PMA e valores sem excitação. \*valor significativamente menor quando comparado ao valor de C+ ( $p < 0,05$ ) (One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey). Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas.

Realizou-se a análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Tuckey nos valores de área abaixo da curva normalizados. As análises foram feitas no programa GraphPad Prism e não mostraram diferença significativa entre o resultado do controle positivo e das amostras



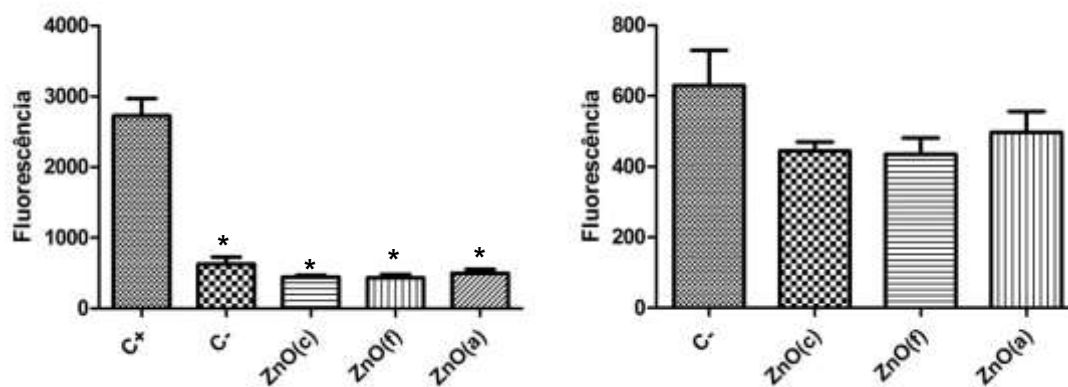
#### **5.2.4.4. Ensaio da determinação da inibição da produção de peróxido de hidrogênio extracelular por Amplex® Red**

A medida da fluorescência resultante da oxidação do Amplex® Red tem sido reportada como um método altamente específico e sensível para a detecção de peróxido de hidrogênio extracelular (Zhou *et al*, 1997; Fortaleza *et al*, 2003; Rinaldi *et al*, 2007, Faria, 2014).

As espécies reativas de oxigênio podem ser detectadas tanto extra quanto intracelularmente, devido ao fato da NADPH oxidase estar localizada na membrana celular (Hampton *et al*, 1998). A internalização da membrana e o tráfico intracelular do fagossoma formado (contendo o complexo NADPH oxidase) resulta na geração de EROs dentro desse compartimento. Enquanto que a geração de EROs extracelular é atribuída à produção direta de NADPH oxidase da membrana celular pelo escape desses oxidantes, quando o fagossoma ainda não foi completamente selado e internalizado durante o processo de fagocitose (Babior, 1984; Dahlgren e Karlsson, 1999; Rinaldi *et al*, 2007). Rinaldi e colaboradores avaliaram a sensibilidade de ensaios para a detecção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intra e extracelular liberado por PMN ativados com PMA ou zymozan. A capacidade desses ensaios discriminarem o conteúdo liberado intracelular do que é extracelular foi avaliado utilizando o superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio e, a catalase, que reduz o peróxido de hidrogênio à água. Ambas as enzimas são impermeáveis à célula, capazes de sequestrar extracelularmente as EROs liberadas, e suas propriedades tornaram possível a identificação específica da espécie gerada. Ao final do estudo, Rinaldi e seus colaboradores

concluíram que o Amplex® Red é uma sonda altamente específica para a detecção de peróxido de hidrogênio extracelular.

Assim sendo, o teste de Amplex® Red teve como objetivo avaliar o potencial de estimulação do óxido de zinco nanoparticulado em diferentes morfologias. Na presença de peroxidase, o Amplex® Red é oxidado e capaz de reagir com  $H_2O_2$ , resultando em um produto vermelho altamente fluorescente, a resorufina, a quantidade de fluorescência mostrada nos resultados reflete a quantidade de peróxido de hidrogênio liberado no meio extracelular. Os resultados apresentados na Figura 41 mostram que a presença de ZnO nanoestruturado não foi capaz de estimular os neutrófilos a produzirem peróxido de hidrogênio. Isto pode ser concluído pela comparação com o controle positivo, onde as células foram estimuladas por PMA. A análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Tuckey nos valores de área abaixo da curva normalizados. As análises foram feitas no programa GraphPad Prism e não mostraram diferença significativa entre o resultado do controle positivo e das amostras.



**Figura 41.** Análise do efeito da interação com ZnO nanoestruturado (0,1mg/mL) incubado com células polimorfonucleares e Amplex-Red à temperatura de 37°C e 30 minutos de incubação.

**(a)** Gráfico comparativo entre a estimulação de polimorfonucleares com Amplex Red e sem estimulação \*valor significativamente menor quando comparado ao valor de C+ ( $p < 0,05$ ) (One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey). **(b)** Gráfico comparativo de excitação de polimorfonucleares através de ZnO e sem excitação de polimorfonucleares. \*valor significativamente menor quando comparado ao valor de C+ ( $p < 0,05$ ) (One-way ANOVA e teste de comparação de Tuckey). Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de triplicatas.

## 6. Conclusão

Os resultados obtidos nos mostram que é possível a mudança de morfologia do óxido de zinco nanoestruturado através do método do ultrassom aumentando-se o tempo de síntese.

O estudo da interação entre nanopartículas e a proteína albumina sugere que essa interação é de caráter fraco, não sendo capaz de realizar mudanças conformacionais significativas nas proteínas. Uma exceção foi a obtenção de pequena agregação, como pode ser observado nas medidas após 168 horas de incubação da mistura.

O estudo realizado com eritrócitos humanos mostrou que a morfologia em nanoflor causa um dano maior que as demais morfologias em um tempo de incubação de 48 horas. Resultado semelhante foi observado em testes realizados com neutrófilos humanos, pois a morfologia de nanoflor foi capaz de causar a produção de espécies reativas de oxigênio de forma mais eficiente que as demais morfologias. No entanto, esta ativação não foi capaz de causar a morte das células.

## 7. Referencias

ALVER, U. *et al.* Synthesis and characterization of spray pyrolysis zinc oxide microrods. **Thin Solid Films**, v. 515, n. 7-8, p. 26, 2007

ANDREAS, B.; PARVEZ, I. H. Biological Biomedical Infrared Spectroscopy: Advances in Biomedical Spectroscopy. **IOS Press**, Amsterdam, 2009.

ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 258, p. 151-165, 2012.

AYME, A. J. L. O efeito do pH da albumina sérica humana e os flavonoides quercetina e quercitrina. **Universidade Estadual Paulista**, São José do Rio Preto, 2014.

BABIOR, B. M. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. **Blood**, v. 64, n. 5, p. 959-966, 1984.

BAIN, J.; STANILAND, S. S. Bioinspired nanoreactors for the biomineralisation of metallic-based nanoparticles for nanomedicine, **Physiscal Chemistry Chemical Physics**, n. 17, p. 15508-15521, 2015.

BARBOZA, J. C. S.; SERRA, A. A. Ultrassom(I): influência do ultrassom na química. **Química Nova**, v. 15, n. 4, p. 302-316, 1992.

BARDHAN, M.; MANDAL, G.; GANGULYA, T. Steady state, time resolved, and circular dichroism spectroscopic studies to reveal the nature of interactions of zinc oxide nanoparticles with transport protein bovine serum albumin and to monitor the possible protein conformational changes. **Journal of Applied Physics**, v. 106, 034701-1, 2009.

BEDDOES, C. M.; CASE, C. P.; BRISCOE, W. H. Understanding nanoparticle cellular entry: a physicochemical perspective. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 218, p. 48-68, 2015.

BEGUM, A. N.; TERAQ, J. Protective effects of alpha-tocotrienol against free radical-induced impairment of erythrocyte deformability. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 66, n. 2, p. 398-403, 2002.

BHOGALE, A., *et al.* Systematic investigation on the interaction of bovine serum albumin with ZnO nanoparticles using fluorescence spectroscopy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n. 120, p. 257-264, 2013.

BREMMER, D. Advances in sonochemistry, v. 5, **JAI Press Inc**, Stamford, 1990.

BUM, C.W. The lattice-dimensions of zinc oxide. **Proceedings of the Physical Society of London**, v. 47, p.385, 1935

CARTER, D. C. HO, J. X. Structure of sérum albumin, **Advances in Protein Chemistry**, v. 45, p. 153-203, 1994.

CAVALCANTI, B. N. Resposta de fibroblastos de polpa humanos submetidos a substâncias liberadas por capeadores pulpares diretos, **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2003.

CHANOCK, S. J. *et al.* The respiratory burst oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 24519-24523, 1994

CHO, W. S. *et al.* Predictive value of in vitro assays depends on the mechanism of toxicity of metal oxide nanoparticles. **Particle and fibre toxicology**, v. 10, n. 55, p. 1-15, 2013.

COSTA, M. Efeito dos corpos cetônicos acetoacetato e  $\beta$ -hidroxibutirato em funções de neutrófilos humanos, **Universidade Estadual Paulista**, Araraquara, 2003.

CPI – Consumer products inventory. Retrieved February 2014. Disponível em:  
<<http://www.nanotechproject.org/cpi>>

CULLITY, B. D; STOCK, S.R. Elements of X-ray diffraction, Third Edition. **Prentice Hall**, New Jersey USA, 2001.

DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. respiratory burst in human neutrophils. **Journal of Immunological Methods**, v. 232, p. 3-14, 1999.

DENG, Z. J. *et al.* Nanoparticle-induced unfolding of fibrogen promotes Mac-1 receptor activations and inflammation. **Nature Nanotechnology**, v. 6, p. 39-44, 2011.

DOI, N. *et al.* Novel fluorescence labeling and high-throughput assay technologies for in vitro analysis of protein interactions. **Genome Research**, v. 12, n. 3, p. 487-492, 2002.

EL-ZHARY, M. R. *et al.* Antibacterial effect of various shapes of silver nanoparticles monitored by SERS, **Talanta**, n. 138, p. 183-189, 2015.

EPOSITO, B. P. Interações de complexos de Ródio (II) com albumina humana. **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2000.

FARIA, C. M. Q. G. Ácido protocatecúico e seus ésteres alquílicos: propriedades antioxidantes e seus efeitos no metabolismo oxidativo de leucócitos. **Universidade Estadual Paulista**, Araraquara, 2014.

FARIA, D. L. A.; SANTOS, L. G. Uma demonstração sobre espalhamento inelástico de luz: repetindo o experimento de Raman, **Química Nova**, v. 20, n. 3, p. 319-323. 1997.

FASMAN, G. D. Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules. **Plenum Press**, New York, 2010.

FIGUEIREDO, A. S. G. Efeito da sazonalidade no perfil químico e na atividade antioxidante de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) e ação modulatória desta planta sobre o metabolismo oxidativo de neutrófilos. **Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2010.

FLYNN, H. G. Physical acoustics, **Academic Press**, New York, 1964.

FORTALEZA, J. *et al.* Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature**, v. 422, n. 6930, p. 442-446, 2003.

FRECER, V. QSAR analysis of antimicrobial and haemolytic effects of cyclic cationic antimicrobial peptides derived from protegrin-1. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 17, p. 6065-6074, 2006.

GEDANKEN, A. Usinf sonochemistry for the fabrication of nanomaterials. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, p. 47-55, 2004.

GOLDSTEIN, I. M. *et al.* Complement and immunoglobulins stimulate superoxide production by human leucocytes independently of phagocytosis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 56, p. 1155-1163, 1975.

GONÇALVES, D. M.; GIRARD, D. Zinc oxide nanoparticles delay human neutrophil apoptosis by a de novo protein synthesis-dependent and reactive oxygen species-independent mechanism. **Toxicology in vitro**, v. 28, p. 926-931, 2014.

GONG, C. *et al.* The role of reactive oxygen species in silicon dioxide nanoparticle-induced cytotoxicity and DNA damage in HaCaT cells. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 4915-4925, 2014.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nat Protocols Author manuscript**, v. 1, n. 6, p. 2876-2890, 2006.

GUZZO, M. R. Estudo da complexação da fisetina com ciclodextrinas, **Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2007.

HABIBE, A. F.; *et al.* Moagem de alta energia de ligas odontológicas à base de Co-Cr-Mo, **Resumo do 68º Congresso anual da abm**, p. 4186-4194, 2013.

HAMILLA, I. I.; STAHLBERG, T.; MOTTRAM, P. Bioanalytical Applications of Labeling Technologies, **Wallac oy**, Turku, 1995.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p. 3007-3017, 1998.



HE, X. M., CARTER, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin, **Nature**, v. 358, n. 6383, p. 209-215, 1992.

HORIE, M. *et al.* Protein adsorption of ultrafine metal oxide and its influence on cytotoxicity toward cultured cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, p. 543-553, 2009.

HUANG, C. C. *et al.* Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 1, p. 45-55, 2010

JAGADISH, C.; PEARTON, S. J. Zinc oxide bulk, thin films and nanostructures: processing, properties and applications, **Elsevier Ltd**, Amsterdam, 2006

JCPDS – Joint Committee on Powder Diffraction Standards, Powder Diffraction File, International Center for Diffraction Data, Swarthmore, **PA card 36-1451** (1997).

JUNG, S. H. *et al.* Sonochemical preparation of shape-selective ZnO nanostructures. **Crystal Growth & Design**, v. 8, n. 1, p. 265-269, 2008.

KATHIRAVAN, A.; PARAMAGURU, G.; RENGANATHAN, R. Study on the binding of colloidal zinc oxide nanoparticles with bovine serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 934, p. 129-137, 2009.

KELLY, S. M.; PRICE, N. C. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. **Current Protein and Peptide Science**, v. 1, n. 4, p. 349-384, 2000.

KLAUMUNZER, M. *et al.* Transmission electron microscopy and time resolved optical spectroscopy study of the electronic and structural interactions of ZnO nanorods with bovine serum albumin. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 117, p. 9683-9689, 2013.

KRAGH-HANSEN, U. CHUANG, V. T., OTAGIRI, M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 6, p. 695-704, 2002.

KRAGH-HANSEN, U. Structure and ligand binding properties of human serum albumin. **Danish Medical Bulletin**, v. 37, n. 1, p. 57-84, 1990.

LAKOWICZ, J. Principles of fluorescence spectroscopy. **Springer**, New York, 2006.

LIMA, F. F.; ANDRADE, C. T. Síntese e caracterização de copolímeros do tipo aba para encapsulação de hemoglobina bovina. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 956-961, 2012.

LIPPARD, S. J.; BERG, J. M. Principles of bioinorganic chemistry. **University Science Books**, Mill Valley, 1994.

LOVING, G. S.; SAINLOS, M.; IMPERIALI, B. Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 73-83, 2010

LUDWING, R. Scanning electron microscopy: physics of image formation and microanalysis. **Springer-Verlag**, Berlin, 1998.

LYNCH, I.; DAWSON, K. A. Protein-nanoparticle interactions. **Nanotoday**, v. 3, n. 1-2, p. 40-47, 2008.

MADL, A. K.; PLUMMER, L. E.; CAROSINO, C. PINKENTON, K. E. Nanoparticles, lung injury, and the role of oxidant stress. **Annual Review of Physiology**, v. 4, n. 76, p. 447-465, 2014.

MANFRINI, M. A. Dicroísmo circular magnético no espectro de absorção em calcógenos de európio, **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2007.

MARQUEZIN, C. A. Técnicas de fluorescência no monitoramento de membranas modelo, Tese (doutorado), **Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2008.

MAYANARD, A. D. Nanotechnology: assessing the risks. **Nano today**, v 1, p. 22-33, 2006.

MERCURIO, M. E. Investigação de interações hiperfinas em ZnO e  $Zn_{(1-x)}Co_{(x)}O$  pela técnica de correlação angular  $\gamma$ - $\gamma$  perturbada. **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2009

MITZNER, K. D.; STERNHAGEN, J.; GALIPEAU, D. W. Development of a micromachined hazardous gas sensor array. **Sensors and Actuators B; Chemical**, v. 93, n. 1-3, p. 92-93, 2003.

MORENO, F.; JIMENEZ, J. G. Binding of the promen fluorescente probe to human sérum albumin: a fluorescence spectroscopic study. **Chemico-Biological Interactions**, v. 121, p. 237-252, 1999.

NACCACHE, P. H.; SHA'AFI, R. I.; BORGEAT, P. Mobilization, metabolism and biological effects of eicosanois in polymorphonuclear leucocytes, 2<sup>a</sup> ed., **CRC**, Boston, 1990.

NAKANISHI, K., BEROVA, N., WOODY, R. W. Circular Dichroism – Principles and Applicatios, **VCH**, 1994.

NEL, A.; XIA, T.; MADLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, p. 622-627, 2006.

NIE, L. *et al.* Three-dimensional functionalized tetrapod-like ZnO nanostrucutres for plasmid DNA dlivery, **Small**, v. 2, n. 5, p. 621-625, 2006.

OLSON, R E., CHRIST, D. D. Plasma protein binding of drugs. **Annual Reports in Medical Chemistry**, v. 31, p. 327-336, 1996.

OZGUR, U. *et al.* A comprehensive review of ZnO materials and devices. **Journal of Applied Physics**, v. 98, n.4, p41301, 2005.

PAGANINI, P. P. Síntese e caracterização de nanopartículas de óxido misto de estanho/titânio dopadas com lantanídeos para marcação biológica. **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2012.

PALOCCHI, C. *et al.* Lipolytic enzymes with improved activity and selectivity upon adsorption on polymeric nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 10, p. 3047-3053, 2007.

PAN, X., *et al.* Characterizing the interaction between tartrazine and two serum albumins by a hybrid spectroscopic approach, **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 12, p. 6650-6656, 2011.

PANJOTA, P. A. Caracterização do petróleo por técnicas espectroscópicas e sua utilização na avaliação e desenvolvimento de métodos de inferência em processo de refino, **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2010.

PARACATU, L. C. Acido cafeico e seus ésteres: inibição do “burst” oxidativo de neutrófilos e efeito anti-helicobacter pylori. **Universidade Estadual Paulista**, Araraquara, 2012.

PARKER, D. Luminescent lanthanide sensors for pH, pO<sub>2</sub> and selected anions. **Coordination Chemistry Reviews**, v 205, p109-130, 2000.

PEISER, H. S.; ROOKSBY, H. P.; WILSON, A. J. C. X-ray diffraction by polycrystalline materials, **Institute of Physics**, London, 1955.

PEROTTONI, C. A.; JORNADA, J. A. H. Amorfização do ZrW<sub>2</sub>O<sub>8</sub> induzida por altas pressões, **Cerâmica**, n. 51, p. 398-406, 2005.

PIGATIN, L. B. F. Compostos orgânicos de origem agroindustrial e urbana aplicados à produção vegetal e fertilidade do solo. **Universidade de São Paulo**, São Carlos, 2011.

PIS, L.; MAJEK, P.; SADECKA, J. Synchronous fluorescence spectroscopy for differentiating between brandies and wines distillates, *Acta Chimica Slovaca*, v. 4, n. 1, p. 46- 58, 2011.

PODILA, R. *et al.* Evidence for charge-transfer-induced conformational changes in carbon nanostructure-protein corona. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 41, p. 22098-22103, 2012.

PUYANE, R.; GUY, I.; METZ, R. High performance varistor discs obtained from chemically synthesized doped zinc oxide powder. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 13, n.1-3, p. 575-578, 1998.

RAMUSSEN, J. W. *et al.* Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 9, p. 1063-1077, 2010.

RHYS WILLIAMS, A. T. An introduction to fluorescence spectroscopy. **Perkin Elmer Limited**, 1982.

RICEVUTI, G.; MAZZONE, A. The neutrophil revisited. **Inflammation**, v. 13, n. 4, p. 475-482, 1989.

RINALDI, M. *et al.* Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, n. 1-2, p. 107-125, 2007.

RUBIO, S.; GOMEZ-HENS, A.; VALCARCEL, M. Analytical applications of synchronous fluorescence spectroscopy, **Talanta**, v. 33, n.8, p. 633-640, 1986.

SALA, O. I<sub>2</sub> – Uma molécula didática, **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 914-920, 2008.

SANTOS, R. M. S.; SANTOS, M. F.; COSTA, M F. D. Quimiluminescência e bioluminescência. **Química Nova**, v. 16, n. 3, p. 200-209, 1993.

SARKAR, B. Albumin as the major plasma protein transporting metals. **Life Chemistry Reports**, v. 1, p. 165-207, 1983.

SARKAR, B. Metal proteins interactions. **Progress in Food and Nutrition Science**, v. 11, p. 363-400. 1987.

SATO, Y. *et al.* Mechanism of free radical-induced hemolysis of human erythrocytes: hemolysis of water-solution radical initiator. **Biochemistry**, v. 34, n. 28, p. 8940-8949, 1995.

SCHEPETKIN, I.A. Lucigemim as a substrate of microsomal NAD(P)H-oxidoreductases. **Biochemistry (Moscow)**, v. 64, n.1, p. 25-32, 1999.

SCHMITZ, W. O. *et al.* Estresse oxidativa em eritrócitos: efeito antioxidante e antihemolítico do chá verde (*Camellia sinensis*). **Arquivos de Ciências da Saúde UNIPAR**, v. 12, n. 3, p. 175-179, 2008.

SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. Humic substances in the environment. **Marcel Dekker INC**, New York, 1972

SEGAL, A. W.; ABO, A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. **Trends on Biochemistry Siences**, v. 18, p. 43-50, 1993

SHARMA, V.; ANDERSON, D.; DHAWAN, A. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis un human liver cells (HepG2), **Apoptosis**, v. 17, n. 8, p. 852-870, 2012.

SHAW, A. K., PAL, S. K. Spectroscopic studies on the effect of temperature on pH induced folded states of human serum albumin, **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 90, n. 1, p. 69-77, 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G.; MORRIL, T. C. Identificação espectroscópica de compostos orgânicos. **Guanabra-Koogan**, Rio de Janeiro, 1994.

SIMÃO, A. N. C. *et al.* Genistein abrogates prehemolytic and oxidative stress damage induced by 2,2'-Azobis (Amidinopropane). **Life sciences**, v. 78, n. 11, p. 1202-1210, 2006

SIMON-VAZQUEZ, R. *et al.* Conformational changes in human plasma proteins induced by metal oxide nanoparticles. **Colloids and Sufaces B: Biointerfaces**, v. 113, p. 198-206, 2014.

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. Fundamentos de química analítica, tradução da 8ª edição norte-americana, **Thomson Learning**, São Paulo, 2006

SMOLEN, J. E.; BOXER, L. A. Functions of neutrophils, Williams Hematology, 5ª ed, **McGraw-Hill**, 1995.

SOUSA, V. C. *et al.* Combustions synthesized ZnO powders for varistor ceramics. **International Journal of Inorganic Materials**, v. 1, p. 235-241, 1999

SOUZA, M. L.; CORIO P.; TEMPERINI, M. L. A. Aplicação de espectroscopia Raman e infravermelho na identificação e quantificação de plastificantes em filmes comerciais de PVC esticável. **Química Nova**, v. 32, p. 1452-1456, 2009.

STAREK, A. *et al.* Comparison of the in vitro hemolytic effects produced by alkoxyacetic acids on human and rat erythrocytes. **International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health**, v. 21, n. 2, p. 147-155, 2008.

STEVENSON, F. J. Humus chemistry: genesis, composition, reactions, 2<sup>a</sup> ed, **John Willey**, New York, 1994

STOUT, G. H.; JENSEN, L. H. X-Ray structure determination: a practical guide, Second Edition. **Wiley-interscience**, Whashington, 1989.

SUDLOW, G., BIRKETT, D. J., WADE, D. N. The characterization of two special drug binding sites on human serum albumin, **Molecular Pharmacology**, v. 11, n. 6, p. 824-832, 1975.

SUE, K.; KIMURA, K.; ARAI, K. Hydrothermal synthesis of ZnO nanocrystals using microreactor. **Material Letters**, v. 58, p. 3229-3231, 2004.

SURYANARAYANA, C. Mechanical alloying and milling. **Progress in Materials Science**, v. 46, p. 1-184, 2001.

TANTRA, R.; TOMPKINS, J.; QUINCEY, P. Characterisation of the de-agglomeration effects of bovine serum albumin on nanoparticles in aqueous suspension. **Colloids and Surfaces B**, v. 75, p. 275-281, 2010.

TEIXEIRA, E. M. Refinamento de tamanho de partícula e microdeformação de amostras policristalinas através de perfis de difração de raios-X utilizando as teorias cinemática e dinâmica. **Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2013.

TRINDADE, M. B. Purificação, caracterização e estudos estruturais de duas novas lectinas ligantes de quitina das sementes do gênero *artocarpus*, Tese (doutorado), **Universidade de São Paulo**, São Carlos, 2005.

UVERSKY, V. N.; DUNKER, A. K. Intrinsically disordered protein analysis, v. 1. **Springer**, New York, 2012.

VAN DYKE, K.; CASTRANOVA, V. Cellular chemiluminescence. **Boca Raton**, v.1, p. 162-192, 1987.

VERHOC, J.; VISSER, M. R. Neutrophil phagocytosis and killing normal functions and microbial evasion. The neutrophil, **IRL Press**, Oxford, 1993.

VORUM, H. Reversible ligand binding to human serum albumin: theoretical and clinical aspects. **Danish Medical Bulletin**, v. 46, n. 5, p. 379-399, 1999

WAKEHAM, S. G. Synchronous fluorescence spectroscopy and its application to indigeous and petroleum-derived hydrocarbons in lacustrine sediments. **Environmental Science & Technology**, v. 11, n. 3, p. 272-276, 1977.

WEINTRAUB, B. *et al.* Density-controlled, solution-based growth of ZnO nanorod arrays via layer-by-layer polymer thin films for enhanced field emission. **Nanotechnology**, v.19, p435302, 2008.

YAGI, K. Increased lipid peroxides initiate athrrogenesis. **Bio Essays**, v. 1, p. 58-60, 1984.

YAMASAKI, K.;CHUANG, V. T. G.; MARUYAMA, T.; OTAGIRI, M. Albumin–drug interaction and its clinical implication. **Elsevier: Biochimica et Biophysica Acta**, v.1830 (12) p. 5.435-5.443, 2013.

YAN, Y.; MARRIOT, G. Analysis of protein interactions using fluorescence technologies. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 2, p. 27-31, 2004.

ZAK, A. K. *et al.* Sonochemical synthesis of hierarchial ZnO nanostructures. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 20, p. 395-400, 2013.

ZHANG, Y. Z., *et al.* Fluorescence study on the interaction of bovine serum albumin with p-aminoazobenzene. **Journal of Fluorescence**, n. 18, p 109-118, 2008.



ZHANG, Z. et al. ZnO hollow nanofibers: fabrication from facile single capillary electrospinning and applications in gas sensors. **The Journal of Physical Chemistry C**, n. 113, p. 19397-19403, 2009

ZHOU, M. *et al.* A stable non-fluorescent derivate of resorufin fot the fluorometricdetermination of trace hdrogen peroxide: applications in detectinghte activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. **Analytical Biochemistry**, v. 253, n. 2, p. 162-168, 1997.

**Apêndice A – Modelo do Termo de consentimento livre e esclarecido e  
Termo de doação assinado pelos doadores**

**Termo de doação de material biológico**

Eu,.....,  
 RG ....., nacionalidade .....,  
 maior e responsável, estado civil .....,  
 profissão....., residente no endereço  
 .....  
 ....., na  
 cidade de ....., no estado  
 ....., no pleno gozo de minhas  
 faculdades mentais e de minha livre e espontânea vontade autorizo Luana  
 Chiquetto Paracatu a retirar amostra de meu sangue que será doado para a  
 pesquisa de Bruna Pastrello intitulada: “Estudos biológicos de nanopartículas:  
 Interação com proteínas e avaliação de “burst” oxidativo de leucócitos”, sob a  
 responsabilidade de Bruna Pastrello, que ocorrerão uma vez por semana  
 durante os meses necessários para a conclusão dos resultados (cerca de dois  
 meses). Declaro ainda que esse termo será assinado uma única vez e servirá  
 para todas as coletas.

Bauru, ...../...../.....

.....

Assinatura



**Universidade Estadual Paulista**

**Faculdade de Ciências de Bauru**

Av. Eng. Luiz Edmundo Carrijo Coube, 14-01, Vargem Limpa, CEP:17033-360 - Bauru, SP

Telefone: (14) 3103-6000

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_,  
 RG \_\_\_\_\_, Estado Civil \_\_\_\_\_,  
 Idade \_\_\_\_\_ anos, Residente  
 na \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_,  
 \_\_\_\_\_, nº \_\_\_\_\_, Bairro  
 \_\_\_\_\_, Cidade  
 \_\_\_\_\_, Telefone \_\_\_\_\_,

Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:

1. O trabalho tem por finalidade elucidar a possibilidade de toxicidade/citotoxicidade de óxido de zinco nanoparticulado sintetizados pela pesquisadora Bruna Pastrello (onde houve a síntese do óxido em diferentes morfologias), em leucócitos humanos.
2. Ao participar desse trabalho estarei contribuindo para a pesquisa de um possível carreador de medicamentos.
3. Doarei para a realização dessa pesquisa, 20 mL de sangue, o qual será obtido através de punção venosa, utilizando-se um sistema de coleta a vácuo, em tubos estéreis e descartáveis; que será utilizado exclusivamente para essa pesquisa, não podendo ser reutilizado em pesquisa posterior;
4. A minha participação como voluntário terá a duração de 30 minutos por coleta. As coletas deverão ocorrer uma vez por semana para cada doador. Além disso, estou ciente de que todo o material utilizado é esterilizado e de uso único, pois o mesmo encontrava-se lacrado e foram abertos em minha presença e que depois foram descartados em lixo biológico adequado, segundo portaria da ANVISA (RDC 33/03)

5. Ao participar dessa pesquisa estou ciente de que os riscos do procedimento dessa pesquisa são os mesmos de qualquer coleta de sangue de rotina. Podendo ocorrer reações locais como hematomas e muito raramente inflamação da veia onde foi feita a coleta. Como precaução, serei devidamente orientado por profissionais qualificados quanto aos cuidados necessários para me prevenir dessas reações pós-punção;
6. Para todas as vezes que houver necessidade de retorno (na frequência referente ao item 4), não terei despesas, pois todas as coletas serão doadas pelos membros da equipe de pesquisa e todas as coletas serão realizadas em dias normais de rotina de trabalho.
7. Os procedimentos aos quais serei submetido não provocarão danos físicos (a não ser aqueles citados no item 5) ou financeiros e por isso não haverá a necessidade de ser indenizado por parte da equipe responsável por esse trabalho.
8. Meu nome será mantido em **sigilo**, assegurando assim a minha **privacidade** e se desejar, serei informado sobre os resultados dessa pesquisa.
9. Estou ciente de que o material a ser doado será utilizado **exclusivamente** nesta pesquisa, não podendo ser armazenado para uso posterior sem o meu consentimento;
10. Poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum prejuízo ou penalização;
11. Esse termo será assinado uma única vez e terá validade para todas as doações
12. Qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos poderei entrar em contato com a equipe científica do projeto pelos telefones (para Bruna Pastrello, (14)988124221 (pessoal) ou (14)3103-6434(trabalho), ou para Luana Chiquetto Paracatu (016) 98159-9777 (pessoal) ou (014) 3103-6434 (trabalho))
13. Para notificação de qualquer situação, relacionada com a ética, que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências do Câmpus de Bauru da UNESP, pelo telefone (014) 3103-6075.