



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado e Doutorado



Luiz Affonso Souza Faria

**NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA IMPREGNADAS COM EXTRATO
DE POLPA DE GUAVIRA: PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *in vitro***

Campo Grande – MS
2021

Unidade XI – Instituto de Química – UFMS

Cidade Universitária, s/n * Caixa Postal 549 Fone: 067xx3345-7009 Fax 067xx3345-7010

CEP 79070-900 * Campo Grande (MS) *

<http://www.ufms.br> e-mail: pgquimica.propp@ufms.br



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado e Doutorado



Luiz Affonso Souza Faria

**NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA IMPREGNADAS COM EXTRATO
DE POLPA DE GUAVIRA: PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *in vitro***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Doutorado – da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Doutor em Química (área de concentração: Química dos Materiais).

Orientador: Prof. Dr. Heberton Wender Luiz dos Santos

Campo Grande – MS
2021

Unidade XI – Instituto de Química – UFMS

Cidade Universitária, s/n * Caixa Postal 549 Fone: 067xx3345-7009 Fax 067xx3345-7010

CEP 79070-900 * Campo Grande (MS) *

<http://www.ufms.br> e-mail: pgquimica.propp@ufms.br

*“Hoje eu sei o que é deixar
Que o rio de Deus me leve
Desde a fonte ao mar
Há um rumo pra seguir
Enquanto eu acreditar
O sopro de Deus me move
Se te alegra a minha entrega
Recebe minha vida hoje”
(Rodolfo Abrantes)*

Dedicatória
Dedico a minha mãe Lucimeire Alves de Souza,
minha avó Lidia Alves da Silva e
minha esposa Ana Carolina

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois sem Ele com certeza não teria chegado até aqui;

Agradeço a minha família pelo apoio e incentivo, principalmente a minha mãe Lucimeire Alves de Souza, minha vó Lidia e esposa Ana Carolina de Souza;

Aos amigos do grupo de pesquisa Nano&Photon que me ajudaram a desenvolver esse trabalho quando pensei em desistir Luiz Gomes, Adailton, Luiz Praça, Isaac e Sabrina;

Não posso esquecer a todos que fazem e fizeram parte desse grupo de pesquisa ao longo desse período que estive realizando minha pesquisa;

Aos professores e alunos que fizeram ou fazem parte do LNNA;

Aos amigos do LabMol (alunos da professora Dani) que estiveram comigo nos ensaios *in vitro* aos finais de semana e feriados, de maneira especial a Verônica, Cida e Evelyn pela disponibilidade;

Aos técnicos de laboratório Magali, Osmar e Flávio por todos ensinamentos e paciência comigo quando estava desesperado e pelo convívio alegre e divertido;

Este parágrafo dedico de maneira especial a minha amiga/irmã Kelly que por mais que tenha terminado o mestrado e mudado de cidade, nossa amizade e parceria perdura até hoje, obrigado por tudo migs.

Não posso esquecer meus amigos Marcio, Kristiane, Stéphano e Franciele por tudo, pelas conversas, pelos cafés, ensinamentos e encheções de saco que foram muitas;

A todos os amigos que fiz na UFMS (não irei citar nomes, pois são muitos e aqui não caberia) pela amizade e pelas conversas que tornaram os dias de trabalho mais divertidos;

Ao pessoal de Pequeno Grupo (PG) da igreja que me ajudaram direta ou indiretamente nessa reta final;

Aos meus amigos e irmãos ou conhecidos como “ReBeLdx”: Ton, Paola (Paola di Jesus), Mayara (May di Deus) e Israel (Tindão) que me acolheram quando um certo indivíduo do interior caiu de gaiato aqui em Campo Grande, agradeço pelas viagens e momentos insanos e principalmente por apresentarem hoje a pessoa que é minha esposa;

Ao meu querido amigo Francimar, popular Akira, e sua família pelos churrascos maravilhosos aos finais de semana para sair um pouco da rotina;

A todos os professores do INQUI que passaram um pouco do seu conhecimento em todas as disciplinas que cursei;

À professora Danielle Bogo pela disponibilidade, conversas e ensinamentos no laboratório. Agradeço imensamente pela paciência e dedicação nos delineamentos experimentais e interpretações de resultados e pelas inúmeras vezes que estive na bancada de laboratório para me auxiliar nos experimentos e principalmente por ter feito eu não desanimar, pois as frustrações e desânimo me asolaram e pareciam não ter fim;

Ao professor Marco Utrera pela conversa e ensinamentos que foram essenciais após minha qualificação para o desenvolvimento do trabalho, o meu muito obrigado;

Meu amigo e querido professor Júlio Ferencz que foi parceiro, sentou e corrigiu comigo página por página sobre meus erros de português e concordância na escrita deste trabalho;

Não posso esquecer de agradecer ao meu orientador Heberton Wender pela orientação do doutorado e paciência;

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, (FUNDECT) pela financiamento do Projeto de Pesquisa sem o qual não teríamos recurso para o desenvolvido desse estudo;

Enfim, obrigado a todos que de maneira direta ou indiretamente contribuíram para minha formação.

“Deus escolhe as coisas loucas deste mundo. Deus escolhe os que não são, para confundir aqueles são. Em outras palavras, Deus escolhe a última opção de todas e transforma na primeira opção Dele. O que ninguém enxerga, Ele vê! O que ninguém entende, Ele entendeu! Em quem ninguém investe, Ele investe! Em quem ninguém acredita, Ele acredita! Aquele que todo mundo chama de barro, Ele chama de vaso! Ele é o Senhor, e essa é a coisa mais poderosa pra gente entender nesse meio de um mundo aonde os problemas de transtorno de imagem assolam o coração. Para Jesus não é esse o critério que Ele analisa para escolher alguém!” (Deive Leonardo)

RESUMO

O câncer está entre uma das principais causas de morte no mundo e estudos envolvendo nanopartículas para seu tratamento cada vez mais se destacam no cenário internacional, principalmente, devido a suas características únicas de carregamento e entrega controlada de medicamentos. Dados recentes mostram que o extrato de polpa de guavira (EPG) apresenta atividade antitumoral promissora contra melanoma induzido em camundongos, porém sua insolubilidade no meio biológico mostrou-se um obstáculo para aplicações práticas. Este trabalho tem por objetivo a síntese de nanopartículas de sílica (SiO_2NPs) e sua utilização como carreador de EPG em solução aquosa visando o desenvolvimento de um novo material compósito antitumoral. As SiO_2NPs foram sintetizadas através do método de Stöber modificado e apresentaram morfologia esférica com tamanhos de aproximadamente 100 – 200 nm, em regime de monodispersão. SiO_2NPs puras e funcionalizadas com grupamentos amino (f- SiO_2NPs) foram impregnadas com EPG até as concentrações de 76,32% e 68,50% em massa, respectivamente. Concluiu-se, portanto, que ambas NPs foram capazes de carrear o EPG, porém o processo foi mais eficiente para o caso não-funcionalizado. O EPG puro apresentou atividade antiproliferativa contra as linhagens celulares B16-F10, MCF-7 e NHI/3T3, com GI_{50} de 16,17, 17,90 e 24,98 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, ao passo que as amostras SiO_2NPs e f- SiO_2NPs , sem adição de EPG, apresentaram valores de GI_{50} superiores a 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os testes de atividade antiproliferativa *in vitro* para os compósitos apresentaram efeito inibitório na linhagem B16-F10, onde os compósitos $\text{SiO}_2\text{NPs/EPG}$ e f- $\text{SiO}_2\text{NPs/EPG}$ resultaram em GI_{50} de 66,67 e 82,06 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, o que indica que nestas concentrações estes compósitos possibilitaram a inibição de 50% do crescimento celular. Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho mostraram a obtenção de um novo material compósito, simples e de baixo custo, possuindo propriedades específicas para inibir a proliferação de células tumorais através do carregamento em meio aquoso do composto ativo EPG.

Palavra Chave: Câncer; Melanoma; Nanopartículas de SiO_2 ; Extrato de polpa de Guavira; Nanocarreadores.

ABSTRACT

Cancer is among the leading causes of death in the world and studies involving nanoparticles for its treatment are increasingly highlighted in the international scenario, mainly due to its unique characteristics of carrying and controlled delivery of drugs. Recent data show that guavira pulp extract (EPG) has promising antitumor activity against melanoma induced in mice, but its insolubility in the biological environment evidenced to be an obstacle for practical applications. This work aims at the synthesis of silica nanoparticles (SiO_2NPs) and its use as carrier of EPG in aqueous solution aiming at the development of a new antitumor composite material. SiO_2NPs were synthesized using the modified Stöber method and presented spherical morphology with sizes of approximately 100 - 200 nm, in a monodispersion regime. SiO_2NPs pristine and amino-functionalized (f- SiO_2NPs) were impregnated with EPG up to concentrations of 76.32% and 68.50% by mass, respectively. Therefore, it was concluded that both NPs were able to carry the EPG, but the process was more efficient for the non-functionalized case. Pure EPG showed antiproliferative activity against B16-F10, MCF-7 and NHI/3T3 cell lines, with GI_{50} values of 16.17, 17.90 and 24.98 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively, while the SiO_2NPs and f- SiO_2NPs samples, without the addition of EPG, presented GI_{50} values above 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The in vitro antiproliferative activity tests for the composites showed an inhibitory effect on the B16-F10 strain, where the $\text{SiO}_2\text{NPs}/\text{EPG}$ and f- $\text{SiO}_2\text{NPs}/\text{EPG}$ composites resulted in GI_{50} values of 66.67 and 82.06 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively, which indicates that at these concentrations these composites enabled the inhibition of 50% of cell growth. Thus, the results obtained in this work showed the obtention of a new, simple and low cost composite material having specific properties to inhibit the proliferation of tumor cells by carrying the active compound EPG in aqueous medium.

Keywords: Cancer; Melanoma; SiO_2 Nanoparticles; Guavira Pulp Extract; Nanocarriers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotografia comum da Guavira (<i>Campomanesia adamantium</i> (Cambess.) O. Berg).	20
Figura 2 – Imagem de MEV das SiO ₂ NPS esférica produzidas no trabalho de Stober.....	22
Figura 3 – Esquema representativo dos reagentes e tempos empregados na síntese das SiO ₂ NPs e f-SiO ₂ NPs.....	26
Figura 4 – Esquema representativo do procedimento para obtenção do EPG.	28
Figura 5 – Imagens de MEV das amostras (A) SiO ₂ NPs e (B) f-SiO ₂ NPs.	35
Figura 6 – Distribuição de tamanho e ajuste Gaussiano das amostras (A) SiO ₂ NPs e (B) f-SiO ₂ NPs.	36
Figura 7 - Imagem do Teste de Ninidrina.	38
Figura 8 - Espectros de FTIR das amostras SiO ₂ NPs e f-SiO ₂ NPs.....	39
Figura 9 - Espectro de FTIR do EPG.....	40
Figura 10 – Curvas termogravimétricas (TGA) e suas derivadas (DTG) para as amostras (A) EPG, (B) SiO ₂ NPs e (C) f-SiO ₂ NPs. As curvas pontilhadas e vermelhas indicam a DTG cujo eixo vertical é o da direita do gráfico.	41
Figura 11 – Curvas termogravimétricas dos compósitos SiO ₂ NPs/EPG.	43
Figura 12 - Curvas termogravimétricas dos compósitos f-SiO ₂ NPs/EPG.....	45
Figura 13 - Atividade antiproliferativa das amostras (A) S-250 μ e (B) f-S250 μ frente à linhagem B16-F10 expostas a diferentes concentrações (0,25; 2,5; 25; 250 μ g.mL ⁻¹)	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação das amostras de SiO ₂ NPs impregnadas com EPG em função do volume de EPG adicionado as SiO ₂ NPs (5 mg de SiO ₂).....	29
Tabela 2 - Identificação das amostras de f-SiO ₂ NPs impregnadas com EPG em função do volume de EPG adicionado as f-SiO ₂ NPs (5 mg de f-SiO ₂).....	29
Tabela 3 - Identificação das amostras de SiO ₂ NPs e f-SiO ₂ NPs impregnadas com EPG em função do volume adicionado.....	30
Tabela 4 - Medições das amostras SiO ₂ NPs e f-SiO ₂ NPs para as técnicas: DLS e Pdl.....	37
Tabela 5 - Valores dos potenciais zetas das amostras SiO ₂ NPs e f-SiO ₂ NPs.	37
Tabela 6 - Porcentagem de perda de massa e de EPG adsorvido na SiO ₂ NPs.	44
Tabela 7 - Porcentagem de perda de massa e de EPG adsorvido na f-SiO ₂ NPs.	45
Tabela 7 - Resultados da atividade antiploriferativa (GI ₅₀ µg.mL ⁻¹) para as amostras EPG e DOX.	46
Tabela 8 - Atividade antiproliferativa (GI ₅₀ µg.mL ⁻¹) em linhagens B16-F10, MCF-7 e NHI/3T3 para os compósitos SiO ₂ NPs+EPG.	47
Tabela 9 - Atividade antiproliferativa (GI ₅₀ µg.mL ⁻¹) em linhagens B16-F10, MCF-7 e NHI/3T3 para os compósitos f-SiO ₂ NPs+EPG.	47

LISTA DE SIGLAS

EPG – Extrato de Polpa de Guavira

NPs - Nanopartículas

SiO₂NPs – Nanopartículas de Sílica

f-SiO₂NPs – Nanopartículas de Sílica Funcionalizada

NH₄OH - Hidróxido de Amônio

APTES -(3-aminopropil) trietoxisilano

C₉H₆O₄ - Ninidrina

C₃H₆O - Acetona

C₂H₆O - Álcool Etílico Absoluto

TEOS - Tetraetilortossilicato

DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering*)

d_M – Diâmetro Médio

FTIR – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

c_v – Coeficiente de Variação

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

PZ – Potencial Zeta

UV-Vis - Espectroscopia do Ultravioleta e Visível

SiO₂ – Dióxido de Silício

PDI - Índice de Polidispersividade

TiO₂ – Dióxido de Titânio

ZnO – Óxido de Zinco

B16-F10 – Célula Melanoma Murino

MCF-7 – Célula Adenocarcinoma de Mama

NHI/3T3 – Célula Fibroblasto Murino

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	14
2 – REVISÃO TEÓRICA	16
2.1 – CÂNCER.....	16
2.1.1 – CÂNCER DE PELE - MELANOMA	17
2.2 – FRUTOS NATIVOS DO CERRADO	18
2.2.1 – GUAVIRA	19
2.3 – NANOPARTÍCULAS.....	21
2.3.1 – NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA.....	21
3 - OBJETIVOS	24
3.1 - OBJETIVO GERAL.....	24
3.1.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 - MATERIAIS	25
4.2 - SÍNTESE DAS SiO ₂ NPs.....	25
4.3 – MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA IDENTIFICAÇÃO DO GRUPO AMINO.....	27
4.4 – PREPARO PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO DE POLPA DE GUAVIRA.....	27
4.5 – ESTUDO DE ADSORÇÃO DO EXTRATO DE POLPA DE GUAVIRA (EPG) PELAS SiO ₂ NPs e f-SiO ₂ NPs.....	28
4.6 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA <i>in vitro</i>	30
5 - CARACTERIZAÇÃO.....	32
5.1 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	32
5.2 - ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DLS)	32
5.3 - POTENCIAL ZETA (PZ)	33
5.4 – ESPECTROSCOPIA DO ULTRA-VIOLETA E DO VISÍVEL (UV-Vis) .	33
5.5 - ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	34
5.6 – ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA).....	34
6 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
6.1 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	35

6.2 - ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICA (DLS).....	36
6.3 - POTENCIAL ZETA (PZ)	37
6.4 – TESTE DE NINIDRINA	38
6.5 - ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURRIER (FTIR).....	38
6.6 - ANÁLISE TERMOGRAMÉTRICA (TGA)	40
6.7 – EFEITO ANTIPROLIFERATIVO <i>in vitro</i>	46
7 - CONCLUSÕES	50
PRODUÇÕES CIENTÍFICAS	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 – INTRODUÇÃO

O câncer está entre uma das principais causas de mortes no mundo. Estima-se que até o ano de 2030, 21 milhões de pessoas serão diagnosticadas com esse problema e, desse total, 13,2 milhões de mortes poderão ocorrer.¹ A busca pela cura do câncer é emblemática, uma vez que, a doença é agressiva e muitas vezes letal. Por isso várias pesquisas estão em andamento em todo mundo para encontrar formas de tratamento para os vários tipos de câncer existentes. Alguns estudos referem-se ao uso de compósitos que através da união de duas fases, que possuem propriedades diferentes, imprimem novas características, ou seja, material de melhor qualidade.²

A guavira (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg) é uma fruta do cerrado bastante consumida e bem conhecida na região Centro-Oeste brasileira.³ O extrato de polpa de guavira (EPG) possui diversos nutrientes, destacando-se os flavonóides que, além de contribuir para a saúde humana, apresentam elevadas propriedades farmacológicas (quimiopreventiva e quimioterapêutica) e apresentam resultados significativos em pesquisas de combate ao melanoma, um dos tipos de câncer de pele. A doença destaca-se pela agressividade e pelas poucas opções de tratamento. Assim, pode-se afirmar que a EPG é um agente promissor no tratamento do câncer tipo melanoma.^{4,5}

No entanto, a insolubilidade do EPG no meio biológico mostrou-se um obstáculo para aplicações práticas. Por outro lado, materiais nanoparticulados têm sido propostos no encapsulamento e/ou carreamento e liberação controlada de fármacos (*drug delivery*) em contrapartida ao problema da insolubilidade.^{6,7}

Diante deste cenário, fica evidente a importância do emprego de nanopartículas (NPs) como carreadores de EPG, já que com o elevado avanço da nanotecnologia, a incorporação de componentes biológicos à nanomateriais tornou-se viável.⁸ Estudos sobre nanopartículas de sílica (SiO₂NPs) têm demonstrado que estes materiais são excelentes matrizes para o carreamento de componentes bioativos com potencial antitumoral.⁷ Portanto, este trabalho tem por objetivo a síntese SiO₂NPs e sua utilização como carreador de EPG

em solução aquosa visando o desenvolvimento de um novo material compósito antitumoral ativo e eficaz.

No presente trabalho foram produzidas SiO₂NPs pelo método de Stöber modificado.⁹ A partir da síntese, foram avaliadas suas propriedades morfológicas, ópticas, térmicas, estudo da adsorção do EPG nas SiO₂NPs e realizado testes *in vitro*.

Esta tese está organizada por seções, onde na seção 2 está apresentada a revisão bibliográfica a respeito do câncer, guavira (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg) e das SiO₂NPs, a fim de contextualizar o presente trabalho. A seguir, nas seções 3, 4 e 5, são descritos os objetivos, métodos experimentais empregados e caracterizações utilizadas, respectivamente.

Já na seção 6 são apresentados os resultados de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Potencial Zeta (PZ), Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia na Região do Ultra-Violeta e do Visível (UV-Vis), Análise Termogravimétrica (TGA/DTG), Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) e os testes *in vitro* com células Melanoma Murino (B16-F10), Adenocarcinoma de Mama (MCF-7) e Fibroblasto Murino (NHI/3T3).

Ao término, são apresentadas as conclusões e referências bibliográficas empregadas.

2 – REVISÃO TEÓRICA

2.1 – CÂNCER

O câncer está entre uma das principais causas de mortes no mundo. Estima-se que até o ano de 2030, 21 milhões de pessoas serão diagnosticadas com esse problema e, desse total, 13,2 milhões de mortes poderão ocorrer, conforme dados da Organização Mundial da Saúde (OMS).¹

A palavra câncer origina-se do latim *cancer* que denota de “caranguejo”, ou seja, devido ao seu crescimento infiltrante pode-se comparar às pernas do crustáceo. Entretanto, câncer, referencia ao termo neoplasia, sendo este o nome dado ao conjunto de mais de 100 doenças caracterizadas pela reprodução celular desordenada (associadas ao DNA) que invadem órgãos e tecidos, podendo propagar-se para outras regiões do corpo.¹⁰

O câncer ocorre em três estágios bem determinados: 1) **estágio inicial**, onde têm-se modificações em alguns genes; 2) **estágio de mutação**, no qual as células benignas são transformadas em células malignas, de forma lenta ou gradual e; 3) **estágio de progressão**, que caracteriza-se pela multiplicação descontrolada das células, sendo este um processo irreversível, devido ao crescimento rápido, invasão de tecidos e órgãos e metástases. Após os três estágios, com o câncer já instalado, ocorre o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença.¹¹

As principais abordagens terapêuticas que vêm sendo empregadas são as cirurgias, radioterapia e quimioterapia. A cirurgia, além da erradicação do problema por meio da remoção do tumor, tem como objetivo o aumento da qualidade de vida dos portadores de tumores. A radioterapia, é um tratamento que utiliza radiações ionizantes que destrói ou impedem que as células tumorais se desenvolvam. A quimioterapia foca em atacar pequenos agregados de células tumorais, tumores primários e metástases, pois essas células são mais propensas à ação de drogas por apresentarem taxa de crescimento mais elevada que as células saudáveis.^{12,13}

As causas de câncer são variadas, podendo ser internas ou externas. Cerca de 80% a 90% dos casos estão associados à fatores ambientais (radiação UV e poluentes), mas também pode ocorrer devido aos hábitos alimentares e por fatores hereditários.¹⁴ Alguns desses fatores são bem

conhecidos, tais como: câncer de pulmão ocasionado pelo cigarro, alguns vírus que podem ser causadores da leucemia e a exposição excessiva ao Sol que pode causar o câncer de pele. Assim, um dos tipos de câncer mais comum e que deve receber bastante atenção é o câncer de pele. Além da causa ser um fator externo, exposição à radiação solar, ele representa 25% dos diagnósticos de câncer nos centros de saúde.

2.1.1 – CÂNCER DE PELE - MELANOMA

O câncer de pele é classificado como a neoplasia de maior incidência em todo o mundo, sendo definido pelo desenvolvimento descontrolado e anormal das células que compõe a pele. Essas células formam camadas e, conforme as que forem sendo afetadas, são determinados os diferentes tipos de câncer. Dentre os diversos tipos de câncer existentes, o câncer de pele se caracteriza de duas formas: não melanoma e melanoma.¹⁵

O tipo de câncer mais frequente é o não melanoma e apresenta-se sob a forma de Carcinoma Basocelular (CBC) e Carcinoma Espinocelular (CEC) com 70% e 25% dos casos, respectivamente, conforme dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA).¹ Apesar de grande incidência, ambos apresentam baixa taxa de mortalidade, ou seja, quando diagnosticados no estágio inicial possuem elevado índice de cura. Entretanto, o melanoma – que representa 5% total de cânceres de pele – é um tipo de câncer bastante raro, agressivo, difícil tratamento e a medida que a doença vai avançando, sem o devido tratamento, pode levar o paciente à óbito.¹⁶

A palavra melanoma deriva do grego *melas* - significa escuro, negro - e o sufixo *oma* – tumor. Vale ressaltar que, apesar de seu rápido avanço, o melanoma predomina principalmente em pessoas caucasianas que contém uma quantidade elevada de feomelanina do que eumelanina sendo que essa última confere uma maior proteção contra a formação de melanoma, podendo ocorrer em vários tecidos, tais como: tecido nervoso central, globo ocular, tubo digestivo e, principalmente, a pele.¹⁷

A estimativa para 2030 é de 351 mil casos de pessoas acometidas pelo melanoma em nível mundial com mortalidade de 88 mil, sendo que destes casos, 10 mil ocorrerão no Brasil e 3 mil mortes irão ocorrer, ou seja, isto

representa que quando diagnosticado de forma tardia pode chegar a 30% de mortes.¹

O melanoma é uma doença que se caracteriza em 4 diferentes estágios: 1) **estágio 0** o melanoma se apresenta superficialmente na pele; 2) **estágio I e II** ocorre a penetração nas camadas mais profundas da pele, até atingirem linfonodos e outros tecidos subjacentes; 3) **estágio III** têm-se a disseminação para outros órgãos do corpo; 4) **estágio IV** ocorre a metástase.^{18,19}

Atualmente existem tratamentos que podem melhorar a situação de uma pessoa acometida pelo melanoma. O mais comum é o uso da quimioterapia onde o objetivo primário consiste em destruir através do uso de fármacos às células neoplásicas, preservando as normais. Outras formas de combate ao câncer incluem ainda radioterapia, cirurgia e imunoterapia. Porém, estes tratamentos não atuam de forma específica, sendo que na maioria das vezes são ofensivos, lesando tanto células malignas quanto normais e podem causar diferentes efeitos colaterais.^{20,21}

Assim, é necessário a busca por novos tratamentos menos invasivos que apresentam pouco (ou nenhum) efeito adverso e uma dessas alternativas é o uso de líquens e frutos do cerrado.

2.2 – FRUTOS NATIVOS DO CERRADO

O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e da América do Sul em extensão, possui mais de 12 mil espécies de plantas catalogadas, sendo considerada a mais rica do mundo em biodiversidade com aproximadamente 4 mil plantas endêmicas.^{22,23} Estudos vêm sendo realizados com o intuito de conservar, valorizar e incentivar o uso de plantas silvestres, considerado uma fonte natural de compostos bioativos.^{24,25} Estas, possuem propriedades que lhes conferem atividades, tais como antibacteriana, antifúngica, antiinflamatória, antitumoral, entre outras.²⁶

O elevado interesse em frutos do cerrado se deve ao fato de possuírem propriedades nutricionais e funcionais provenientes dos compostos bioativos presentes em sua composição. Esses compostos podem ser benéficos à saúde e com isso são considerados fortes candidatos como agentes na terapia de distintas enfermidades.^{24,27}

Esses compostos exibem propriedades físico-química distintas interferindo em alvos fisiológicos específicos. Dentre esses compostos, destacam-se os flavonóides, que vêm sendo foco de estudos científicos relacionados às atividades biológicas por meio das chalconas - são precursoras de flavonóides e biossintetizadas em plantas (desempenham papel importante na defesa contra insetos, além de atrativos de polinizadores).²⁸ Os flavonóides apresentam um vasto espectro de propriedades farmacológicas, dentre elas, a capacidade de dificultar o processo de carcinogênese e inibição de crescimento tumoral, de acordo com a característica de cada tipo de célula e dos alvos.^{5,29}

A descoberta de novos fármacos é necessária à medida que a incidência de novos casos de câncer se eleva. Perante esse cenário, faz-se interessante o estudo dos frutos do cerrado como novas fontes de compostos bioativos com potenciais na terapêutica dos cânceres. Várias pesquisas vêm sendo realizadas utilizando frutos do cerrado, tais como: pequi (*Caryocar brasiliensis*), guavira (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg), araticum (*Annona coriacea*), bocaiuva (*Acrocomia aculeata* (Jacq.)Lodd. e bacuri (*Attalea phalerata* Mart.).^{24,27} Aqui neste trabalho, daremos destaque à utilização da guavira (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg), pois apresenta atividade antitumoral contra o câncer do tipo melanoma.⁴

2.2.1 – GUAVIRA

A *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg. (Myrtaceae) é uma espécie vegetal pertencente à família Myrtaceae, encontrada na região central do Brasil nos estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Goiás e de Mato Grosso do Sul até Santa Catarina, chegando até à países como Argentina e Paraguai. Popularmente conhecida como “guabiroba”, “guabiroba-do-mato”, “guariroba” ou “guavira”, e consumida “*in natura*” pela população sul-matogrossense, a guavira possui elevada composição nutricional e uma fonte natural de vitamina C.⁴

Vale ressaltar que a guavira é uma fruta ácida, suculenta e levemente adocicada, possuindo um formato esférico (2,0 a 2,5 cm de diâmetro), de coloração externa que varia do verde escuro ao verde claro e em seu interior possui tonalidade amarela que exala aroma cítrico, Figura 1. Além disso, a guavira é muito utilizada na indústria de alimentos para a fabricação de

sorvetes, doces, refrescos e principalmente como flavonizantes em destilados alcoólicos, devido aos seus atributos de qualidade.^{30,31}

Figura 1 – Fotografia comum da Guavira (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg).



FONTE: Próprio Autor

Apesar dos frutos serem consumidos *in natura*, diversas atividades biológicas estão associadas à presença de compostos fenólicos isolados e, ainda, a casca e as folhas da guavira (usadas sob a forma de chás) possuem propriedades como: anti-diarréica, antirreumática, depurativa (indicada para redução do nível de colesterol no sangue), antioxidante, antimutagênica e antiproliferativa.^{4,32} Considerando as possíveis atividades biológicas desta espécie, o EPG possui diversos nutrientes e apresenta promissora atividade antitumoral, principalmente contra o melanoma.³³ Entretanto, a EPG em questão não possui solubilidade em meio aquoso, o que dificulta a utilização para atividade antitumoral.

Assim, com intuito de melhorar a solubilidade e eficácia, tem-se a utilização de sistemas coloidais nanoparticulados.^{34,35}

2.3 – NANOPARTÍCULAS

O uso de NPs vem ganhando grande atenção da comunidade científica por ser um agente promissor na entrega de fármacos para a terapia do câncer, pois sua superfície é facilmente alterada, de modo a direcionar nanocarregador especificamente para células cancerosas, o que resulta num direcionamento ativo dessas partículas.^{36,37}

Todavia, além das NPs, diferentes materiais têm sido atualmente aplicados como carreadores de fármacos, dentre eles podemos citar: polímeros biológicos, lipossomas, hidrogéis e vírus. Estes veículos, teoricamente, liberam agentes terapêuticos sob a influência de ultrassom, pH, temperatura ou interações químicas, o que ainda continua em estudo na literatura.³⁸⁻⁴⁰

Diversas matrizes são exploradas na literatura para obtenção de NPs e as principais são: (TiO₂), (ZnO) e (SiO₂), sendo que nanopartículas de sílica (SiO₂NPs) têm recebido atenção por apresentarem boa biocompatibilidade em escala nanométrica, grande área superficial e uma boa estabilidade coloidal em meio aquoso.^{38,41,42} Além disso, as SiO₂NPs ainda podem servir como suporte para compostos orgânicos e moléculas bioativas.⁴²

2.3.1 – NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA

A sílica é uma importante matéria prima na produção de silicatos solúveis, silício e seus derivados (carbonetos e silicones), além de ser um material essencial para a indústria de vidros, cerâmicas e refratários. O termo sílica refere-se aos compostos de dióxido de silício (SiO₂) nas suas mais variadas formas, cristalinas e amorfas, sendo um composto formado pelos dois elementos mais fartos na crosta terrestre, oxigênio e silício.⁴³

O conhecimento sobre as propriedades da sílica torna-a relevante no preparo de suportes químicos, principalmente devido a sua estabilidade mecânica e térmica, rigidez, elevada área superficial e propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas.^{41,42}

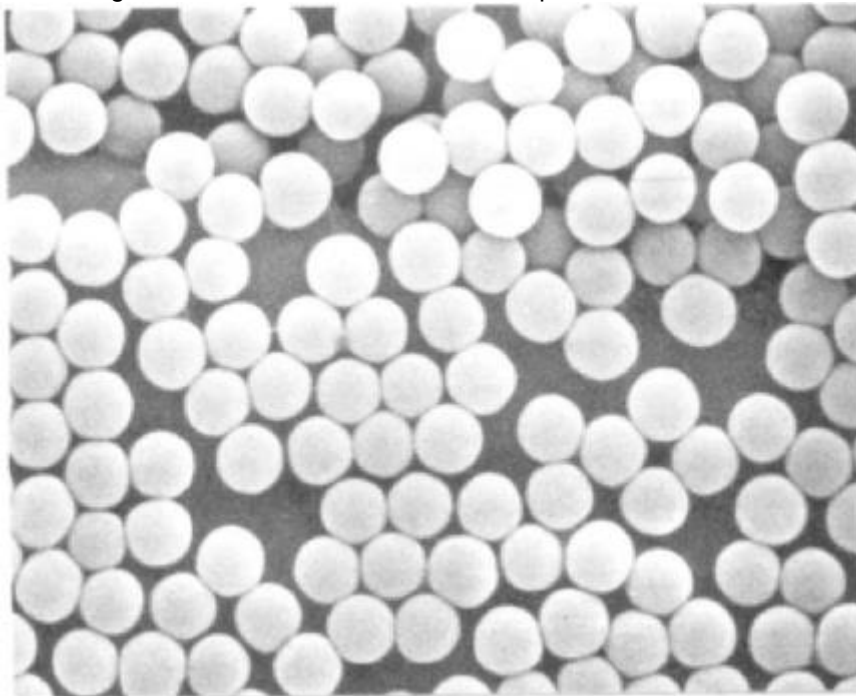
As SiO₂NPs têm sido amplamente utilizadas em aplicações biológicas e médicas. Elas podem ser utilizadas como nanocarreadores para entrega específica de drogas, evitando a resistência aos medicamentos em células cancerosas. Uma das vantagens do uso de sílica é baseada no fato de sua

superfície ser facilmente funcionalizada com diferentes grupos orgânicos, tais como ligantes específicos do câncer.^{39,40,44,45}

A preparação de SiO₂NPs tem se mostrado interessante devido as suas propriedades físicas e químicas, tamanho de partícula ajustável, elevada biocompatibilidade, estabilidade química e podem ser facilmente funcionalizadas. Sendo assim, em 1968, Stöber et al., apresentou uma metodologia eficaz na preparação de partículas de sílica esféricas, que se baseia numa solução contendo um silicato (geralmente o tetraetilortossilicato, TEOS – Si(OR)₄), álcool e um catalisador (ácido ou básico).

Por meio das reações, surge um amplo número de partículas através da nucleação, este período é denominado período de indução, onde a solução se encontra supersaturada, ou seja, essas partículas se agregam para formar partículas estáveis, monodispersas e de tamanho nanométrico (Figura 2).^{9,46}

Figura 2 – Imagem de MEV das SiO₂NPs esférica produzidas no trabalho de Stober.



FONTE: Stober, 1968⁹

As NPs podem variar seu tamanho, o que leva a concluir que, as bordas são ricas em grupos silanol, onde apenas átomos de Si da superfície das SiO₂NPs estariam ligados a grupos OH. Com riqueza em grupos silanóis, a modificação química da superfície da sílica possibilita diversas aplicações, tal como: funcionalização através da imobilização de substâncias orgânicas ligadas covalentemente aos grupos silanóis da superfície das SiO₂NPs.^{47,47}

2.3.1.1 – NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA FUNCIONALIZADA

O uso de SiO₂NPs funcionalizada tem recebido considerável destaque na literatura, pois, além de ajudar na estabilização coloidal, pode aprisionar moléculas de fármacos antitumorais e liberar de forma controlada na presença de um estímulo externo. Como exemplo, pode-se citar a doxorrubicina (DOX), um agente antineoplásico amplamente utilizado para o tratamento de diferentes tipos de câncer.⁴⁷

O uso da DOX é limitado, pois são facilmente absorvidos pelo sangue após sua injeção, potencializando efeitos colaterais. Por isso, visando uma efetiva implementação de terapias antitumorais mais direcionadas e eficientes, onde efeitos colaterais sejam mitigados ao máximo é extremamente importante o desenvolvimento de nanocarreadores de liberação controlada.⁴⁸

A presença de ligantes, grupo amino funcionalizado na superfície da SiO₂NPs, os compósitos SiO₂NPs-fármaco seriam direcionados de forma preferencial ao tumor, fazendo com que o tratamento seja de alto controle e especificidade.⁴⁹

Assim, podem ser concebidos nanosistemas adequados de aprisionamento de fármacos hidrofóbicos para atuarem como veículos. As moléculas dos fármacos hidrofóbicos podem ser encapsuladas dentro das nanopartículas de sílica funcionalizadas através de um método simples e eficaz.⁵⁰⁻⁵² Estes nanocarreadores multifuncionais são de grande interesse e apelo científico, sendo um tópico bastante atual na literatura e um assunto de intenso debate.

3 - OBJETIVOS

3.1 - OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve por objetivo principal a obtenção, caracterização e aplicação de nanopartículas de SiO₂ impregnadas com Extrato de Polpa de Guavira (EPG) para avaliação de sua atividade *in vitro* como agentes antitumorais.

3.1.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese, caracterização e controle de tamanho e distribuição de tamanhos de SiO₂NPs;
- Funcionalização química e caracterização da superfície das SiO₂NPs com grupamentos -NH₂.
- Otimização das propriedades morfológicas dos compostos de SiO₂NPs funcionalizados;
- Desenvolver metodologia para adsorção de EPG na superfície das SiO₂NPs;
- Avaliar a atividade antiproliferativa *in vitro* dos compósitos em linhagens de células neoplásicas.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - MATERIAIS

As nanopartículas (NPs) foram sintetizadas pelo método de Stöber modificado⁷ utilizando os seguintes reagentes: Tetraetilortossilicato (TEOS) da marca Fluka com 98% de pureza; Álcool Etilico Absoluto (C₂H₆O) da marca Dinâmica Química Contemporânea Ltda., com 99,5% de pureza; Acetona P.A. (C₃H₆O) da marca Dinâmica Química Contemporânea Ltda., com 99,5% de pureza; Ninidrina (C₉H₆O₄) da marca Sigma-Aldrich; Hidróxido de Amônio (NH₄OH) da marca Dinâmica Química Contemporânea Ltda.; e 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) da marca Sigma-Aldrich, com 99,5% de pureza.

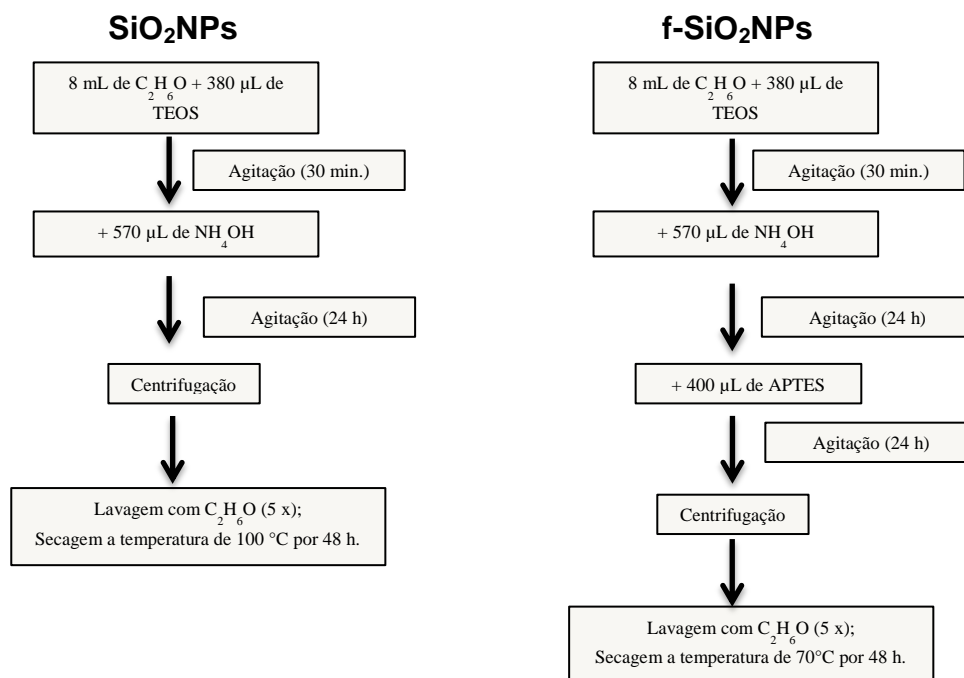
Para a obtenção do Extrato de Polpa de Guavira, utilizou-se os seguintes materiais: Fruta guavira - *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg. e Diclorometano da marca Dinâmica Química Contemporânea Ltda., com 99,5% de pureza.

Para a realização dos testes de avaliação antiploriferativa, foram utilizados os seguintes reagentes: Soro Fetal Bovino (Gibco); Ácido Acético (CH₃COOH) da marca Synth, com 99% de pureza; Dimetilsulfóxido (DMSO) da marca Synth, com 99,5% de pureza; Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) da Sigma-Aldrich; Sulforrodamina B (SRB) da Sigma-Aldrich, com 75% de pureza; Trizma base da marca Sigma-Aldrich; Ácido Tricloroacético (C₂HCl₃O₂) da marca Synth, com 90% de pureza; Doxorubicina (C₂₇H₂₉NO₁₁) e células do tipo Melanoma Murino (B16-F10), Adenocarcinoma de Mama (MCF-7) e Fibroblasto Murino (NHI/3T3).

4.2 - SÍNTESE DAS SiO₂NPs

A rota sintética empregada para obtenção das SiO₂NPs foi proposta por Silva, 2018.⁵³ Na Figura 3 têm-se a representação dos procedimentos para a síntese de cada uma das amostras de NPs.

Figura 3 – Esquema representativo dos reagentes e tempos empregados na síntese das SiO₂NPs e f-SiO₂NPs.



FONTE: Próprio Autor

No primeiro procedimento, foi realizada a síntese de SiO₂NPs, em um balão volumétrico de 50 mL, contendo 8 mL de C₂H₆O e 380 µL de TEOS em agitação por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 570 µL de NH₄OH e mantida a agitação por 24 h. Após esse período, foi realizada a centrifugação dessa solução onde houve a separação do sobrenadante e do precipitado, sendo que o precipitado foi lavado (5x) com C₂H₆O para remoção de resíduos provenientes da síntese. Logo após essa etapa, o precipitado obtido foi levado ao forno tipo mufla até a temperatura de 100 °C para secagem durante 48 h.

Depois, realizou-se a síntese de f-SiO₂NPs, também em um balão volumétrico de 50 mL, onde foi preparada uma solução contendo 8 mL de C₂H₆O e 380 µL de TEOS mantida em agitação por 30 minutos. Após isso, adicionou-se a solução 570 µL de NH₄OH e manteve-se em agitação por 24 h. Em seguida, foram acrescentadas 400 µL de APTES e mantida a solução em agitação por mais 24 h. Ao final, foi realizada a centrifugação dessa solução onde houve a separação do sobrenadante e do precipitado, sendo que o precipitado foi lavado (5x) com C₂H₆O para remoção de resíduos provenientes

da síntese. Logo após essa etapa, o precipitado obtido foi levado ao forno, tipo mufla, a temperatura de 70 °C para secagem durante 48 h.

4.3 – MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA IDENTIFICAÇÃO DO GRUPO AMINO

O teste colorimétrico da ninidrina para determinação qualitativa do grupamento amino foi realizado pela adaptação do método descrito para detecção de aminoácidos.⁵⁴ Em um tubo de ensaio com solução 50 mL de acetona (C₃H₆O) a $1,4 \times 10^{-2}$ mol.L⁻¹ de ninidrina (C₉H₆O₄), adicionou-se 5 mg de f-SiO₂NPs e agitou-se a solução por 5 min em aquecimento (70 °C) para que houvesse a mudança na coloração da solução.

4.4 – PREPARO PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO DE POLPA DE GUAJIRA

Para obtenção do EPG, primeiramente realizou-se a separação da casca e polpa da *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg. Em seguida, a casca foi descartada e a polpa foi colocada em uma estufa de circulação de ar a temperatura de 37 °C para que houvesse a desidratação e secagem completa por um período de 72 h. Após esse período, a mesma foi colocada em um recipiente e posteriormente adicionado 500 mL de diclorometano para que houvesse extração do EPG durante 15 dias. Ao final, obteve-se uma solução que foi filtrada e em seguida, rotaevaporada para eliminação total do solvente (Figura 4).

Figura 4 – Esquema representativo do procedimento para obtenção do EPG.



FONTE: Próprio Autor

4.5 – ESTUDO DE ADSORÇÃO DO EXTRATO DE POLPA DE GUAVIRA (EPG) PELAS SiO_2NPs e $\text{f-SiO}_2\text{NPs}$.

A metodologia utilizada para a adsorção do EPG foi baseado em um trabalho realizado por Silva (2018).⁵³ Foi preparado uma solução estoque de Extrato de Polpa de Guavira (EPG) em meio etanólico na concentração de 1 mg.mL^{-1} (denominado **Solução A**).

A impregnação das SiO₂NPs com EPG foi realizado misturando 5 mg do pó de NPs em diferentes quantidades da **Solução A**, sob agitação por 24h, conforme Tabela 1. Após o período de adsorção, as NPs foram separadas por centrifugação (8000 rpm durante 30 min) e secas, em forno tipo mufla, à temperatura de 40 °C durante 24h. A nomenclatura das amostras obtidas após este procedimento é exibida na Tabela 1.

Tabela 1 - Identificação das amostras de SiO₂NPs impregnadas com EPG em função do volume da Solução A (1 mg/mL de EPG em Etanol) adicionado às SiO₂NPs.

Volume Solução A (mL)	Identificação das amostras
5,0	S-50
7,5	S-75
10,0	S-100
12,5	S-125
17,5	S-175
20,0	S-200

FONTE: Próprio Autor

Para as f-SiO₂NPs, a impregnação com EPG foi realizado misturando-se 5 mg de f-SiO₂NPs em diferentes quantidades da **Solução A**, em procedimento similar ao anterior, Tabela 2. Após o período de adsorção, as NPs foram separadas por centrifugação (8000 rpm durante 30 min) e secas, em forno tipo mufla, à temperatura de 40 °C durante 24 h. A nomenclatura das amostras obtidas após este procedimento é exibida na Tabela 2.

Tabela 2 - Identificação das amostras de f-SiO₂NPs impregnadas com EPG em função do volume da Solução A (1 mg/mL de EPG em Etanol) adicionado às f-SiO₂NPs.

Volume Solução A (mL)	Identificação das amostras
5,0	f-S50
7,5	f-S75
10,0	f-S100
12,5	f-S125
17,5	f-S175
20,0	f-S200

FONTE: Próprio Autor

Um segundo procedimento foi explorado para a impregnação das SiO₂NPs com EPG, também baseado no trabalho realizado por Silva (2018).⁵³ Neste caso, o carregamento das SiO₂NPs e f-SiO₂NPs com EPG foi realizado misturando 5 mg do pó de NPs em 250 µL (0,25 mL) da solução estoque de EPG (Figura 4), e mantida em agitação por 24 h. Após o período de adsorção,

as NPs foram separadas por centrifugação (8000 rpm durante 30 min) e secas, em forno tipo mufla, à temperatura de 40 °C durante 24 h. A nomenclatura das amostras obtidas após este procedimento é exibida na Tabela 3.

Tabela 3 - Identificação das amostras de SiO₂NPs e f-SiO₂NPs impregnadas com EPG em função do volume adicionado

Volume de EPG (mL)	Identificação das amostras
0,25	S-250 μ
0,25	f-S250 μ

FONTE: Próprio Autor

4.6 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *in vitro*

Para o ensaio de atividade antiproliferativa, as células B16-F10 – Melanoma Murino, MCF-7 – Adenocarcinoma de Mama e NHI/3T3 – Fibroblasto Murino, que estavam armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C), foram descongeladas em banho-maria a 37°C e cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI) contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco).

Posteriormente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (5000 células/mL) por 24 h, quando então, as células foram expostas à diferentes concentrações de cada amostra de SiO₂NPs+EPG e f-SiO₂NPs+EPG (0,25; 2,5; 25 e 250 μ g/mL), previamente diluídas em DMSO (0,1%), e, posteriormente, levadas à estufa (35 °C) durante 48 h.⁵⁵ Como controle positivo utilizou-se a doxorrubicina, um composto referência na inativação de células tumorais, nas seguintes concentrações: 0,025; 0,25; 2,50; 25 μ g/mL.

Após esse período, o sobrenadante das células foi descartado para adição da solução de ácido tricloroacético (20%) para fixação das células e, posteriormente, foram mantidas em geladeira durante 30 min a 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas com água deionizada para determinação da proliferação celular, utilizando o método calorimétrico, empregando sulforrodamina B (SRB), descrito por Skehan e colaboradores (1990).⁵⁶

A leitura das absorbâncias nos dois métodos foi feita no comprimento de onda de 540nm em leitor de microplaca Molecular Devices SpectraMax 190®.

Os experimentos foram realizados em triplicata a fim de calcular as médias das absorbâncias que foram subtraídas da solução base para determinação de 3 níveis de efeito:

- concentração de amostra teste que causa 50% de inibição do crescimento celular (GI_{50});
- concentração de amostra que causa inibição total do crescimento (TGI);
- concentração de amostra que causa 50% de morte celular (LC_{50}).

A porcentagem de crescimento celular obtida segundo Monks *et al.* (1991) foi utilizada na elaboração de gráficos por regressão não linear para obtenção da GI_{50} .⁵⁵

5 - CARACTERIZAÇÃO

Os métodos de obtenção do extrato e caracterização empregados foram realizados na Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, no Instituto de Física (INFI), Instituto de Química (INQUI) e Departamento de Tecnologia em Alimentos (DTA), campus de Campo Grande/MS.

5.1 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A morfologia das amostras (SiO_2NPs e $\text{f-SiO}_2\text{NPs}$) foram analisadas utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), que através de imagens constituídas pela contagem de elétrons gerados pela interação de um feixe de elétrons e a amostra. Os elétrons de baixa energia (< 50 eV; elétrons secundários) influenciam na alta resolução da imagem formada. Já os elétrons retroespalhados (> 50 eV) por serem gerados muito próximos à superfície fornecem informações a respeito da topografia da amostra.⁵⁷

As amostras foram suspensas em álcool isopropílico, sob tratamento *via* ultrassom por 5 minutos e, em seguida, uma alíquota de 50 μL foi depositada em um suporte de silício para serem recobertas com uma fina camada de ouro *via* sputtering por 5 minutos, com objetivo de facilitar a condução elétrica nas amostras, por meio do equipamento Denton Vacuum Desk III. Para determinação do diâmetro das amostras foi realizada a contagem de 150 partículas, a partir de 4 imagens geradas por MEV. Utilizou-se um MEV da marca JEOL, modelo JSM6380-LV operando com 20 kV.

Foi realizada a estimativa do tamanho individual de várias partículas, com auxílio de softwares. Conhecendo esses valores, obteve-se o valor da dispersão da distribuição de tamanhos dado pela razão d_M/σ (conhecido como coeficiente de variação, c_v). Esse procedimento foi feito para todas as amostras com base nas imagens geradas por MEV.

5.2 - ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DLS)

Os diâmetros hidrodinâmicos das partículas em suspensão, foram determinados pelo espalhamento de luz dinâmico (DLS). As informações a respeito da distribuição de tamanhos das partículas por meio do índice de polidispersividade (Pdl), que refere-se a variedade de tamanho da amostra

relativo a sua distribuição por intensidade, também é fornecido por essa técnica.

Outro fator relevante do Pdl, é que este deve possuir valor abaixo de 0,7 para que as partículas sejam consideradas monodispersas.⁵⁸ Para cada análise, utilizou-se a diluição das amostras em água DI na proporção de 1:1. As amostras (SiO₂NPs e f-SiO₂NPs) foram analisadas em triplicata a temperatura de 25 °C, permitido 1 minuto de estabilização da temperatura antes das medições. As medidas foram realizadas em um equipamento Zetasizer Nano ZS da marca Malvern.

5.3 - POTENCIAL ZETA (PZ)

O Potencial Zeta (PZ) é utilizado como referência para indicar o potencial associado à superfície das partículas, bem como para estipular a estabilidade das amostras (SiO₂NPs e f-SiO₂NPs) em meio aquoso. As medidas foram realizadas através da introdução de uma suspensão da amostra dispersa em água DI por meio ultrassônico durante 10 minutos.

Em seguida, a solução foi colocada em uma cubeta contendo dois eletrodos para realização das medidas em triplicata a partir de 12 corridas cada, à temperatura de 25 °C Logo, a partir da medida da mobilidade eletroforética, pode-se obter o valor do potencial.⁵⁹ As medidas foram realizadas em um equipamento Zetasizer Nano ZS da marca Malvern.

5.4 – ESPECTROSCOPIA DO ULTRA-VIOLETA E DO VISÍVEL (UV-Vis)

A espectrofotometria na região de luz visível e ultravioleta (UV-Vis) foi empregada para a determinação quantitativa de compostos contendo grupos absorventes. O método se inicia quando um feixe de luz é incidido através da amostra e uma parte promove a transição eletrônica (absorção), e a outra parte é transmitida. A luz transmitida pode ser expressa tanto como transmitância quanto como absorbância. A transmitância (T) é dada pela razão entre as intensidades de luz incidente (I_0) e transmitida (I), onde $T = I/I_0$. A absorbância (A) relaciona-se com T pela seguinte relação matemática: $A = \log(1/T) = -\log(T)$. No entanto, o modo mais comum de avaliar o espectro de UV-Vis é através da lei de Lambert-Beer que relaciona a distância percorrida pelo feixe de

luminoso através da amostra, a concentração da solução absorvente e a absorvidade.⁶⁰

Esta técnica foi realizada com uma cubeta com caminho óptico de 2 mm e comprimento de onda de radiação variando de 200 a 900 nm em um equipamento Lambda 265 da PerkinElmer.

5.5 - ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Com o intuito de detectar prováveis reações químicas ou decomposição via identificação de alterações relativas a cada grupo funcional presente, utilizou-se a técnica de absorção em infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Quando um material é exposto à radiação infravermelha e a frequência da radiação incidente torna-se igual à frequência de vibração da molécula, transições vibracionais/rotacionais podem ocorrer no material. A faixa do espectro eletromagnético empregada na técnica corresponde à do infravermelho médio, 2,5 até 25,0 μm .⁶⁰ As medidas foram realizadas por refletância total atenuada (ATR – *Attenuated Total Reflection*) com 10 varreduras num equipamento Spectrum 100 da marca PerkinElmer.

5.6 – ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

Em análises térmicas, uma grandeza ou característica da amostra é monitorada durante seu aquecimento ao longo do tempo e/ou temperatura. Por meio da Análise Termogravimétrica (TGA) é possível identificar as mudanças de massa da amostra em função da temperatura, que ocorrem por meio dos processos de evaporação, desidratação, decomposição e oxidação.

As medidas de TGA foram realizadas em atmosfera de ar sintético (80% N_2 + 20% O_2), dentro da faixa de 25 °C até 900 °C, com razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ em intervalos de 1 °C por medida em um analisador térmico Netzsch (STA 449 F3 Jupiter) que foi configurado para coletas de dados simultânea de ambas as análises TGA.

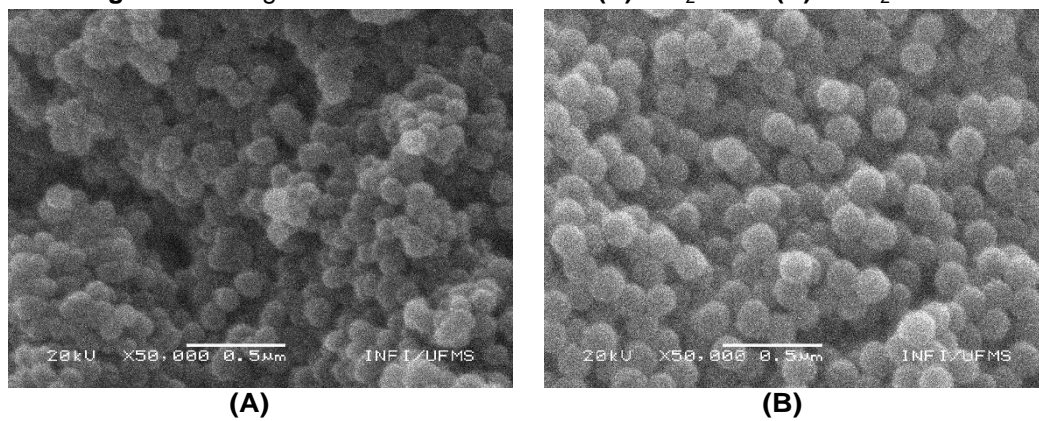
6 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção são apresentados os resultados das caracterizações para as nanopartículas de sílica, extrato de polpa de guavira, compósitos e, também, o ensaio de atividade antiproliferativa.

6.1 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Utilizou-se a MEV para estudo da morfologia e tamanho das nanopartículas. A Figura 5 exibe as micrografias de MEV das amostras SiO₂NPs antes e após a funcionalização com grupamentos amino. Para todas as amostras, as imagens revelam partículas nanométricas com geometria esférica bem definida, confirmando a efetividade do processo de síntese.⁷

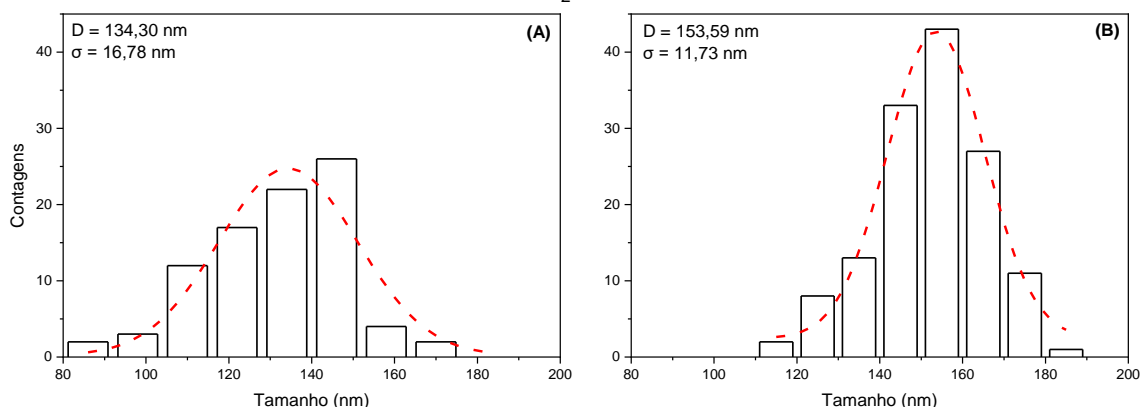
Figura 5 – Imagens de MEV das amostras **(A)** SiO₂NPs e **(B)** f-SiO₂NPs.



FONTE: Próprio Autor

Os histogramas de distribuição de tamanho das SiO₂NPs e f-SiO₂NPs estão representados na Figura 6.

Figura 6 – Distribuição de tamanho e ajuste Gaussiano das amostras **(A)** SiO₂NPs e **(B)** f-SiO₂NPs.



FONTE: Próprio Autor

A Figura 6-A evidencia que as SiO₂NPs possuem diâmetro médio de 134,30 nm e um desvio padrão de 16,78 nm (12,49%). Após a funcionalização, a amostra f-SiO₂NPs apresentou diâmetro médio de 156,59 nm e uma variância (sigma) de 11,73 nm (7,49%). Isso mostra que o tamanho médio das nanopartículas aumentaram em ~16,6% em relação ao caso sem funcionalização, conforme apresentado na Figura 6-B. Este aumento de tamanho já era esperado, já que existem relatos na literatura onde a funcionalização de SiO₂NPs com grupos amino acarretam no aumento de tamanho das NPs. Este fato pode ser atribuído à interação dos grupos silanóis com o grupo amino.⁷ Além do aumento de tamanho, as f-SiO₂NPs apresentaram menor sigma, mostrando que sua dispersão de tamanhos é menor comparada ao caso sem funcionalização.

Vale ressaltar que NPs com diâmetros inferiores a 80 nm podem apresentar elevada toxicidade e, de acordo com os histogramas apresentados, o tamanho médio das NPs são superiores a 80 nm, ou seja, encontram-se em um intervalo de tamanhos com possível ausência de toxicidade.^{38,61,62}

6.2 - ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICA (DLS)

Para avaliar as dimensões das partículas em suspensão e identificar os efeitos de aglomeração, utilizou-se a técnica DLS, cujos resultados podem ser vistos na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados de DLS e Pdl das amostras SiO₂NPs e f-SiO₂NPs.

Amostra	SiO ₂ NPs (nm)	f-SiO ₂ NPs (nm)
DLS	175,31	230,20
Pdl	0,26	0,14

FONTE: Próprio Autor

Observou-se que o tamanho médio das amostras aumentou de 175,3 nm para 230,2 nm com a funcionalização, ou seja, um acréscimo de 31% no tamanho hidrodinâmico médio foi obtido após a funcionalização. Este resultado esta de acordo com a literatura,⁶³ uma vez que o tamanho hidrodinâmico é analisado levando-se em conta a presença de moléculas orgânicas ligadas à superfície das partículas inorgânicas, e reforça a tese que a funcionalização de fato ocorreu.

O índice de polidispersão (Pdl) é outro fator que deve ser analisado, pois através dele é possível identificar o regime de dispersão das partículas. Através dos resultados obtidos por meio do Pdl deduz-se que as amostras são monodispersas pois apresentam valores abaixo de 0,7.⁵⁸

6.3 - POTENCIAL ZETA (PZ)

A técnica de PZ foi utilizada com intuito de determinar a carga superficial das partículas, cujos resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores dos potenciais Zeta das amostras SiO₂NPs e f-SiO₂NPs.

Amostra	SiO ₂ NPs (mV)	f-SiO ₂ NPs (mV)
Potencial Zeta	-28,6	30,2
Desvio Padrão	3,9	6,5

FONTE: Próprio Autor

Uma carga negativa foi observada para as SiO₂NPs, o que se deve à presença da hidroxila (-OH) dos grupos silanóis presentes em sua superfície, de acordo com resultados obtidos da literatura.^{64,65}

Para a amostra f-SiO₂NPs, houve a mudança de sinal da carga, que se tornou positiva, indicando a presença dos grupos amino na superfície das partículas, conforme relatos da literatura.⁶⁵

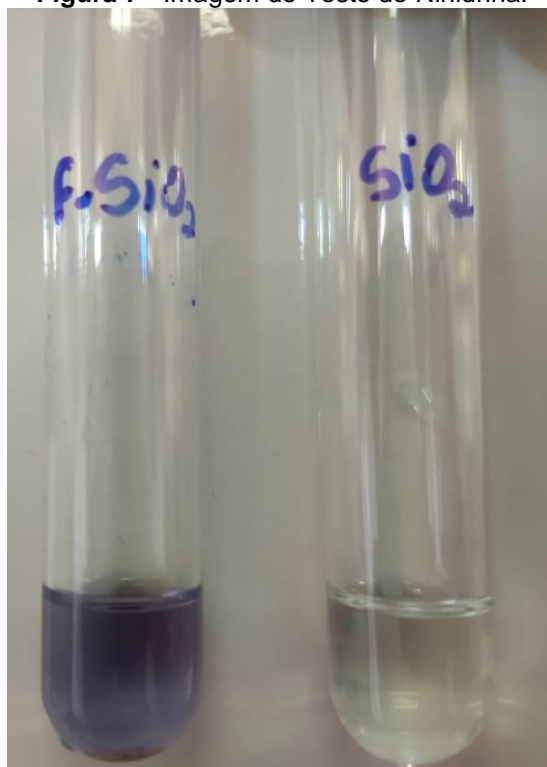
A ponto de comparação, De Oliveira e colaboradores (2016) realizaram a síntese de SiO₂NPs utilizando o método de Stöber modificado e obtiveram os

seguintes resultados $-31,3 \pm 0,9$ mV e $37,1 \pm 1,1$ mV para as SiO_2NPs e $\text{f-SiO}_2\text{NPs}$, respectivamente.⁷ Pode ser notado que os resultados obtidos no presente trabalho estão próximos aos reportados na literatura, indicando que a funcionalização foi realizada com sucesso.

6.4 – TESTE DE NINIDRINA

Além das mudanças de cargas, o grupo amino também pode ser observado, qualitativamente, pelo teste da ninidrina após a funcionalização. Foi observado uma mudança na tonalidade na solução de acetona com ninidrina (Figura 7), de incolor (SiO_2NPs) para um tom azulado ($\text{f-SiO}_2\text{NPs}$), o que indica que a funcionalização foi realizada com sucesso.⁵⁴

Figura 7 - Imagem do Teste de Ninidrina.



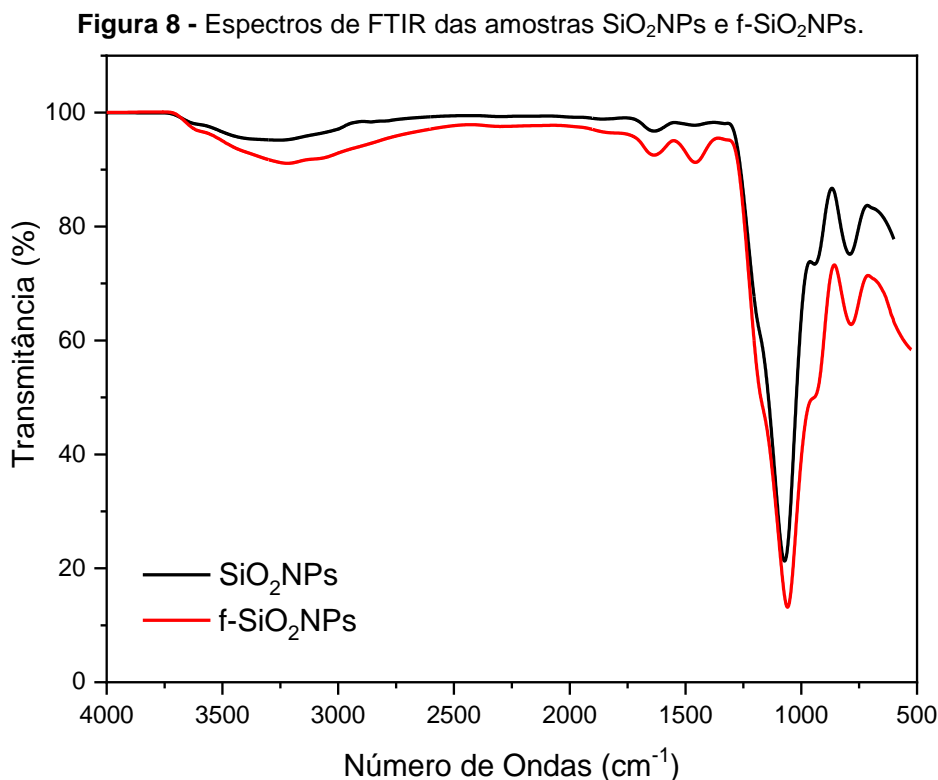
FONTE: Próprio Autor

6.5 - ESPECTROSCOPIA DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURRIER (FTIR)

Para determinação das características estruturais, principalmente no que se refere a grupos funcionais e ligações presentes, utilizou-se a técnica de FTIR. A Figura 8 apresenta os espectros de FTIR das amostras SiO_2NPs e $\text{f-SiO}_2\text{NPs}$ e, como pode ser visto, as bandas vibracionais correspondentes aos

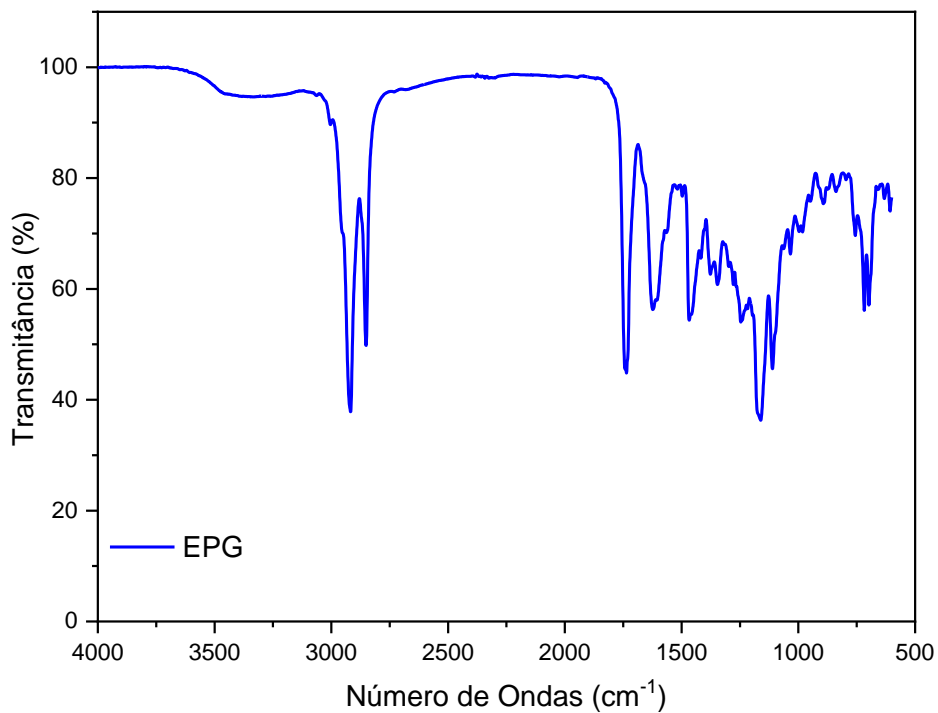
grupos silanol e siloxano confirmam a presença de sílica (795 , 950 e 1072 cm^{-1}).^{66,67}

Além disso, as bandas de 1632 e $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$ podem ser atribuídas à água adsorvida na amostra (bem como aos possíveis resíduos de NH_4OH da síntese).^{65,65} Para f-SiO₂NPs, o pico a 1450 cm^{-1} (vibração assimétrica de N-H) indica a presença de grupo amino, reforçando que funcionalização foi bem sucedida.^{68,69}



FONTE: Próprio Autor

A Figura 9 contém o espectro FTIR da EPG, onde pode-se observar bandas localizadas em: 698 cm^{-1} , que refere-se à presença de compostos fenólicos (referente às ligações do anel aromático); em 1161 cm^{-1} , correspondentes às ligações glicosídicas (C-O-C); em 1623 e 1736 cm^{-1} , correspondendo aos grupos carboxílicos livres e grupos carboxílicos, respectivamente; e em 2918 cm^{-1} , correspondendo às ligações CH dos grupos alquila.^{70,71} Pode ser observado também um ombro em 3004 cm^{-1} , que está associada ao grupo acila presente em óleos vegetais comestíveis.³¹

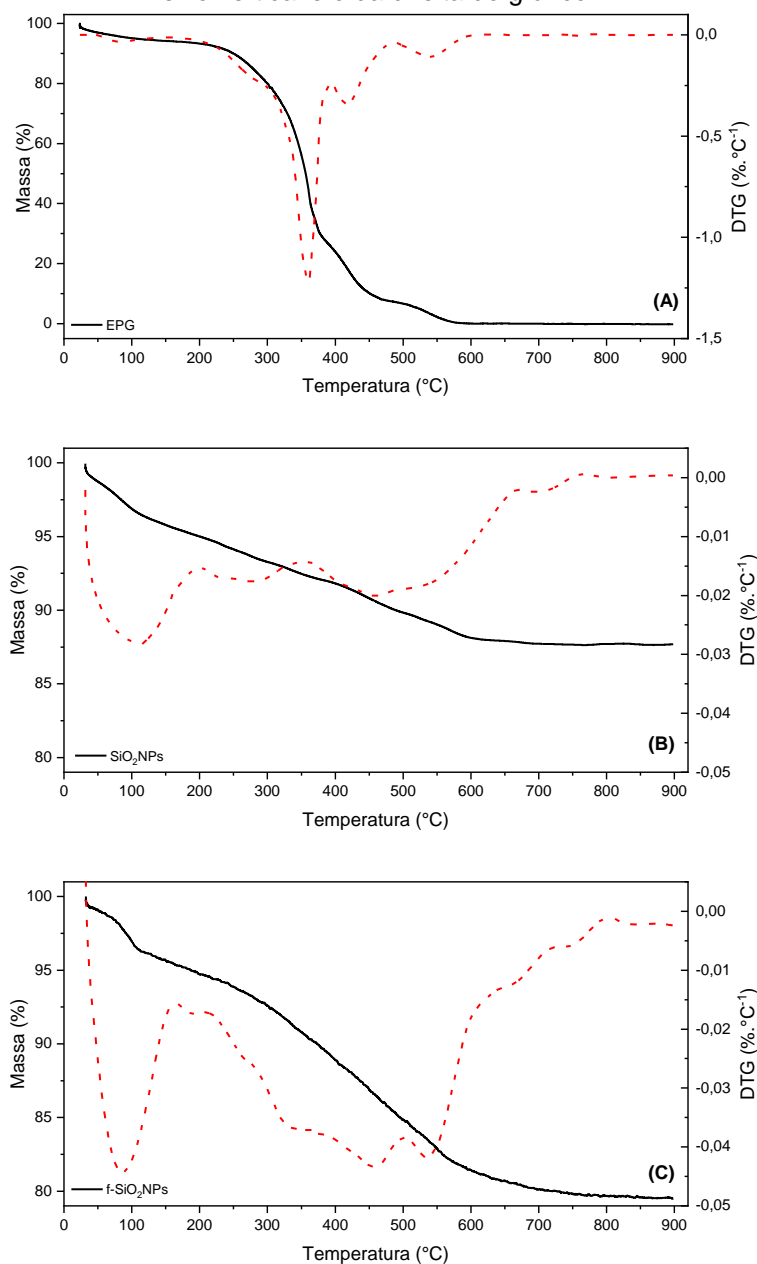
Figura 9 - Espectro de FTIR do EPG.

FONTE: Próprio Autor

6.6 - ANÁLISE TERMOGRAMÉTRICA (TGA)

A técnica de termogravimetria (TGA) foi utilizada com a finalidade de determinar a estabilidade térmica dos compósitos e materiais puros, assim como as etapas de decomposição térmica e a quantificação da EPG adsorvida pelas SiO₂NPs.

Figura 10 – Curvas termogravimétricas (TGA) e suas derivadas (DTG) para as amostras **(A)** EPG, **(B)** SiO₂NPs e **(C)** f-SiO₂NPs. As curvas pontilhadas e vermelhas indicam a DTG cujo eixo vertical é o da direita do gráfico.



FONTE: Próprio Autor

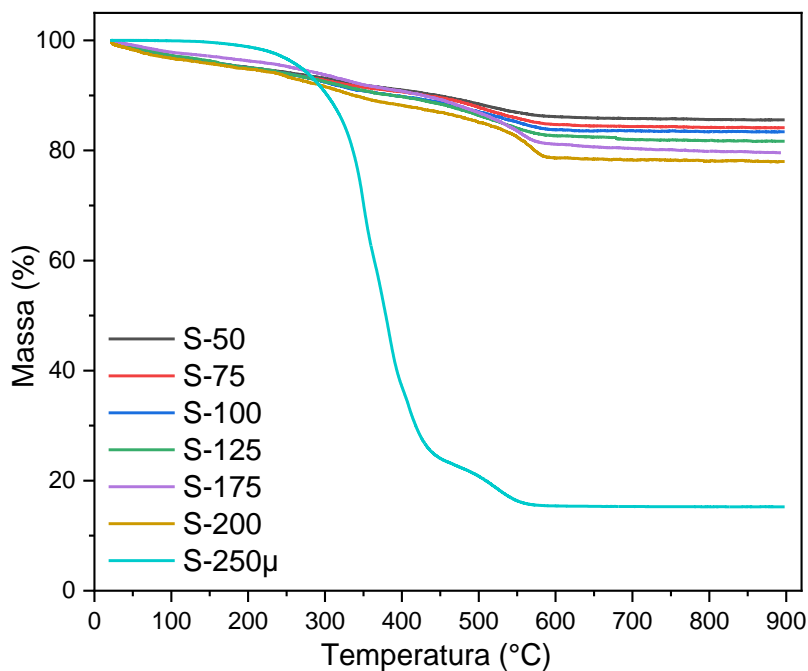
A Figura 10-A apresenta a curva termogravimétrica da EPG que revela uma perda de massa de 5,54% até a temperatura de 150 °C, característica da eliminação de água. Uma segunda perda de massa de 67,66%, entre 150 - 390 °C, pode ser atribuída à decomposição do antioxidante vitamina C presente na *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg.⁷² Um terceiro evento com 19,03% de perda de massa, entre 390 - 480 °C, foi observado e pode estar relacionado à eliminação dos ácidos palmítico e oleico.³¹ Por fim, uma perda de massa estimada de 7,5%, entre 480 - 600 °C, pode ser associado à queima de

resíduos orgânicos.⁷² É importante ressaltar que ao atingir 600 °C praticamente toda a massa de EPG foi eliminada.

A Figura 10-B contém as curvas de TGA/DTG das SiO₂NPs. Como resultado, uma perda de massa de 4,22% pode ser observada até 150 °C, processo decorrente da eliminação de água fisicamente adsorvida.⁷³ Uma segunda perda de massa de 3,61%, entre 150 – 370 °C, pode ser atribuída a eliminação de água que está ligada mais internamente aos grupos silanóis.⁷⁴ Um terceiro evento de perda de massa de 4,01%, entre 370 - 600 °C, pode estar associado a eliminação de compostos orgânicos remanescentes da síntese.^{53,75} De 600 a 740 °C, uma pequena perda de massa (0,51%) é atribuída à decomposição dos grupos silanóis em água.⁷⁵

Para as f-SiO₂NPs, Figura 10-C, a perda de massa pela eliminação da água adsorvida foi de 3,77%.⁷ Posteriormente, uma segunda perda de massa de 10,82%, entre 150 – 500 °C, pode ser atribuída a queima do APTES.⁷⁶ Além disso, um terceiro evento de 5,15% de perda de massa, entre 500 – 830 °C, pode ser atribuída a eliminação dos grupos silanóis em água.^{75,76}

A determinação da quantidade de EPG nos compósitos SiO₂NPs/EPG e f-SiO₂NPs/EPG foi obtida por meio da massa residual da EPG em 900 °C, tomando como partida a massa inicial em 150 °C, após eliminação de água adsorvida (Figuras 11 e 12).

Figura 11 – Curvas termogravimétricas dos compósitos SiO₂NPs/EPG.

FONTE: Próprio Autor

Na Figura 11 apresenta um gráfico comparativo das variações de massa dos compósitos SiO₂NPs/EPG. As curvas mostram comportamento semelhantes entre si, com quantidade total de perda de massa que aumenta para maiores quantidades de EPG nos compósitos. Isso fica ainda mais evidente no caso da amostra S-250μ, pois a mesma foi preparada seguindo outra metodologia para adsorção, adicionando-se 250 μL do EPG puro, ao invés de EPG etanólico. O resultado mostra ainda que, nesse caso, a quantidade de EPG adsorvida é relativamente maior que nos casos anteriores. Além disso, percebe-se que a curva das amostras de S-50 à S-200 se assemelham à curva da amostra SiO₂NPs pura, ao passo que a curva TG da amostra S-250μ se assemelha à curva do EPG puro. A Tabela 6 contém os valores quantificados de massa de EPG nos compósitos.

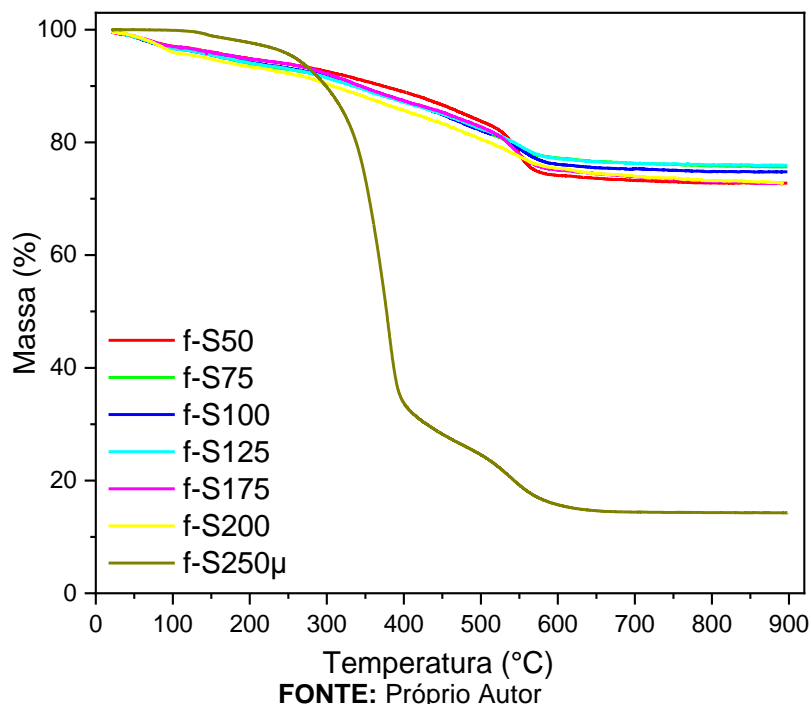
Tabela 6 - Porcentagem de perda de massa entre 150 e 900 °C e resultados calculados de porcentagem de EPG nos compósitos SiO₂NPs/EPG. As medidas foram feitas em triplicada, tal que a porcentagem de EPG fosse estatisticamente computada, com seu valor médio e respectivo desvio padrão da média.

Amostras	Perda de Massa 150 – 900C (%)	EPG na SiO₂NPs (%)
S-50	10,54	2,41 ± 1,0
S-75	12,02	3,83 ± 1,0
S-100	12,77	4,66 ± 1,9
S-125	14,63	6,52 ± 2,0
S-175	17,61	9,52 ± 1,0
S-200	17,81	9,81 ± 2,0
S-250μ	84,41	76,32 ± 1,0

FONTE: Próprio Autor

A partir das análises destes resultados, demonstrou-se que a porcentagem de EPG adsorvido na superfície das SiO₂NPs aumentou com o incremento no volume de EPG, indicando que o EPG de fato ficou impregnado na superfície das NPs e não livre na solução após a centrifugação e recuperação do pó dos compósitos. Assim, a amostra com maior concentração de EPG (S-250 μ) mostrou uma adsorção de EPG de 76,32%, indicando a alta capacidade de adsorção das SiO₂NPs.

A Figura 12 apresenta comparativamente as variações de massa dos compósitos f-SiO₂NPs/EPG. Os resultados obtidos são qualitativamente semelhantes ao anteriormente apresentado e os valores quantificados estão explicitos na Tabela 7.

Figura 12 - Curvas termogravimétricas dos compósitos f-SiO₂NPs/EPG.**Tabela 7** - Porcentagem de perda de massa entre 150 e 900 °C e resultados calculados de porcentagem de EPG nos compósitos f-SiO₂NPs/EPG. As medidas foram feitas em triplicada, tal que a porcentagem de EPG fosse estatisticamente computada, com seu valor médio e respectivo desvio padrão da média.

Amostras	Perda de Massa 150 – 900C (%)	EPG na f-SiO ₂ NPs (%)
f-S50	23,34	7,11 ± 2,4
f-S75	19,82	3,73 ± 1,2
f-S100	20,82	4,61 ± 2,0
f-S125	19,53	3,44 ± 2,0
f-S175	23,21	7,01 ± 3,5
f-S200	21,91	5,82 ± 2,5
f-S250µ	84,65	68,50 ± 1,0

FONTE: Próprio Autor

Estes resultados mostram que a primeira metodologia utilizada para impregnação das f-SiO₂NPs com EPG não foi eficiente, já que valores oscilantes sem variação significativa de porcentagem de EPG foram obtidos com o aumento da quantidade da Solução A (1 mg/mL de EPG em Etanol). No entanto, a segunda metodologia (amostra f-S250µ) mostrou-se adequada e resultou em alta capacidade de adsorção de EPG na f-SiO₂NPs, com 68,50% de EPG no compósito.

Neste trabalho, a funcionalização da sílica com grupamentos amino mostrou-se prejudicial para a adsorção de EPG, já que uma menor quantidade do último composto foi aderido á sílica nesse caso, mesmo utilizando as mesmas condições experimentais. Isso mostra que, além da possível impregnação nos poros das SiO₂NPs mesoporosas, o EPG deve se ligar preferencialmente aos grupos OH⁻ da sílica pura do que aos grupos NH₂.

6.7 – EFEITO ANTIPROLIFERATIVO *in vitro*

A triagem da atividade antiproliferativa foi realizada utilizando as linhagens B16-F10 – melanoma murino, MCF7 – Adenocarcinoma de Mama e NHI/3T3 – Fibroblasto Murino. De acordo com Itharat *et al.* (2004)⁷⁷, são considerados índices de forte atividade antineoplásica, amostras-teste com GI₅₀ ≤ 30 µg.mL⁻¹ possuem excelente atividade.

A Tabela 8 apresenta os valores de GI₅₀ obtidos nos testes antiproliferativos para as três linhagens celulares escolhidas, dentre elas, duas tumorais e uma normal. Como pode-se observar, as amostras EPG e DOX apresentaram valores de GI₅₀ menores que 30 µg.mL⁻¹ contra as linhagens testadas, apresentando efeito inibitório na viabilidade das células.

Tabela 8 - Resultados da atividade antiproliferativa (GI₅₀ µg.mL⁻¹) para as amostras EPG e DOX.

	B16-F10	MCF-7	NHI/3T3
Amostras	GI₅₀	GI₅₀	GI₅₀
	(µg.mL⁻¹)	(µg.mL⁻¹)	(µg.mL⁻¹)
EPG	16,17	17,90	27,98
DOX	0,0025	0,0025	2,5

FONTE: Próprio Autor

Além disso, é possível verificar que o EPG apresentou GI₅₀<30 µg.mL⁻¹, demonstrando excelente atividade antiproliferativa nas linhagens celulares B16-F10, MCF-7 e NHI/3T3.⁷⁸ Em um estudo realizado por Lima e Silva (2018), a atividade antiproliferativa de extratos de polpa e casca de guavira em diclorometano mostrou valores de GI₅₀ entre 23,67 e 27,90 µg.mL⁻¹ contra linhagens B16-F10 e MCF-7, respectivamente, ou seja, índices próximos ao encontrado nesse experimento.⁴

Após a adsorção do EPG nas SiO₂NPs e f-SiO₂NPs, os resultados de atividade antiproliferativa foram obtidos contra as mesmas linhagens celulares estudadas e estão apresentados nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Atividade antiproliferativa (GI₅₀ µg.mL⁻¹) em linhagens B16-F10, MCF-7 e NHI/3T3 para os compósitos SiO₂NPs/EPG.

Amostras	B16-F10 GI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	MCF-7 GI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	NHI/3T3 GI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
SiO ₂ NPs	>250	>250	>250
S-50	>250	>250	>250
S-75	>250	>250	>250
S-100	>250	>250	>250
S-125	>250	>250	>250
S-175	>250	>250	>250
S-200	>250	>250	>250
S-250µ	66,67	-	-

FONTE: Próprio Autor

Tabela 10 - Atividade antiproliferativa (GI₅₀ µg.mL⁻¹) em linhagens B16-F10, MCF-7 e NHI/3T3 para os compósitos f-SiO₂NPs/EPG.

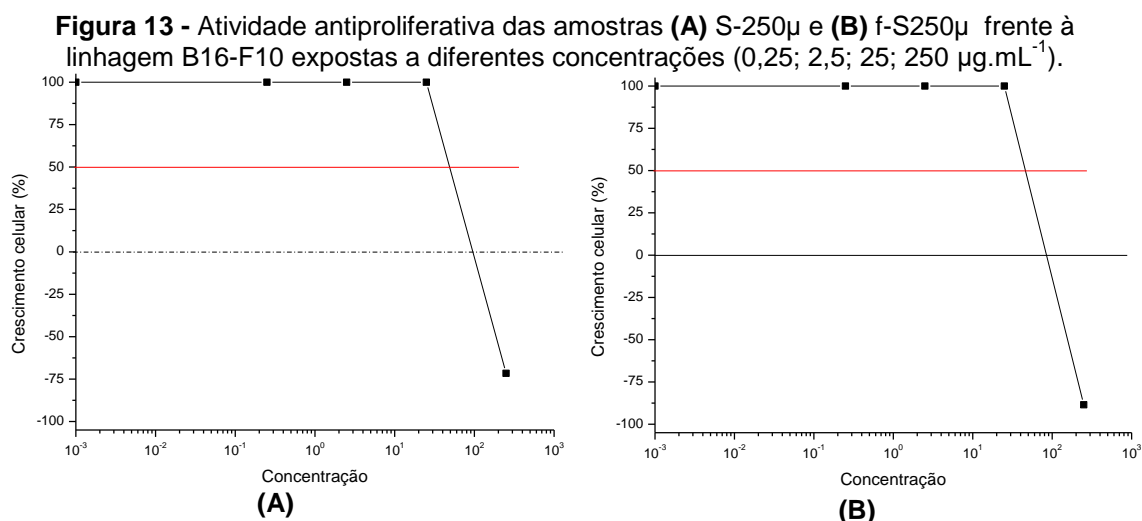
Amostras	B16-F10 GI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	MCF-7 GI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	NHI/3T3 GI ₅₀ (µg.mL ⁻¹)
f-SiO ₂ NPs	>250	>250	>250
f-S50	>250	>250	>250
f-S75	>250	>250	>250
f-S100	>250	>250	>250
f-S125	>250	>250	>250
f-S175	>250	>250	>250
f-S200	>250	>250	>250
f-S250µ	82,06	-	-

FONTE: Próprio Autor

Como podemos observar pelos resultados apresentados nas Tabelas 8 e 9, os compósitos SiO₂NPs/EPG e f-SiO₂NPs/EPG preparados a partir da Solução A (primeira metodologia de impregnação) não apresentaram atividade antiproliferativa, pois a GI₅₀, mesmo em elevadas concentrações do compósito, foi superior a 250 µg.mL⁻¹ nas 3 linhagens testadas. Desta maneira, os compósitos seriam considerados inativos, de acordo com Monks et al (1991).⁵⁵ No entanto, esse efeito negativo pode estar mascarado pelo fato de, neste

caso, a concentração de composto ativo (EPG) ser baixa (< 10% em massa). Uma simples renormalização da massa mostra que, mesmo para a maior concentração estudada de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, por exemplo, temos presente no compósito S-200 – que contém 9,81% de EPG em massa – apenas $24,53 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de EPG. Assim, a massa de composto ativo nos testes foi pequena e, uma vez que os testes com SiO_2NPs puras mostraram que as mesmas são inativas contra as linhagens estudadas ($\text{GI}_{50} > 250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ demonstrando que não há nenhum efeito citotóxico), a não observância de um efeito antiproliferativo é facilmente justificada. Portanto, os resultados não indicam ineficácia dos compósitos mas sim que a massa necessária de EPG ainda não havia sido atingida. Estes testes precisam ser repetidos para concentrações de compósito maiores que $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para comprovação dessa hipótese.

Assim, os testes de atividade antiproliferativa *in vitro* foram refeitos para a linhagem B16-F10 tomando como agentes antiproliferativos os compósitos S-250 μ e f-250 μ , as quais possuem elevada concentração de EPG, mais especificamente 76,32 e 68,50%, respectivamente. Os resultados mostraram que os compósitos possuem GI_{50} de 66,67 e 82,06 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Os resultados da proliferação celular em função das concentrações das amostras, S-250 μ e f-250 μ , estão apresentados nas Figuras 13 para melhor visualização.



FONTE: Próprio Autor

Os resultados indicam que nestas concentrações estes compósitos possibilitaram a inibição de 50% do crescimento celular das células de

melanoma B16-F10, e demonstra ainda que ambas as amostras SiO₂NPs e f-SiO₂NPs funcionaram como excelentes carreadores para os testes *in vitro* em meio aquoso. Além disso, a amostra não funcionalizada mostrou ser um melhor meio para o aprisionamento e carreamento do EPG visando aplicações antitumorais. Os resultados aqui apresentados são promissores e mostram a obtenção de um novo material compósito de baixo custo e simples obtenção capaz de inibir a proliferação de células tumorais através do carreamento em meio aquoso do composto ativo EPG, um extrato de um fruto razoavelmente abundante na região do Cerrado brasileiro.

7 - CONCLUSÕES

No presente trabalho, sintetizou-se nanopartículas de SiO₂ nanométricas, esféricas e monodispersas, com diâmetros hidrodinâmico médios de 175,3 nm e 230,2 nm para as amostras SiO₂NPs e f-SiO₂NPs. Foi observado um acréscimo de 31% no tamanho hidrodinâmico médio após a funcionalização. O processo de funcionalização foi bem sucedido, conforme confirmado através da análise da carga superficial (PZ), onde a presença dos grupos amino na superfície da sílica causou uma mudança de sinal da carga superficial das NPs. Vale ressaltar que a funcionalização também pôde ser confirmada por FTIR através do pico em 1450 cm⁻¹, referente ao grupo amino, assim como pelo teste da Ninidrina, onde observou-se a mudança de coloração da amostra.

Com os resultados obtidos por meio de TGA, foi possível determinar que SiO₂NPs puras e funcionalizadas com grupamento amino (f-SiO₂NPs) foram impregnadas com EPG. Foi possível obter 76,32% e 68,50% de EPG adsorvido nas amostras S-200µ e f-S200µ, respectivamente, ou seja, uma alta capacidade de adsorção de EPG no compósito.

Os ensaios das atividades *in vitro* em linhagens neoplásicas mostraram que o EPG apresentou atividade antiploriferativa para as três linhagens celulares determinadas, sendo duas tumorais (B16-F10 e MCF7) e uma normal (NHI/3T3), nas concentrações 16,17 µg.mL⁻¹, 17,90 µg.mL⁻¹ e 27,98 µg.mL⁻¹, respectivamente, ou seja, apresentaram GI₅₀<30 µg.mL⁻¹, demonstrando excelente efeito inibitório na viabilidade das células.

Os compósitos SiO₂NPs/EPG e f-SiO₂NPs/EPG preparados a partir da Solução A (primeira metodologia de impregnação) não apresentaram atividade antiproliferativa, pois a GI₅₀, mesmo em elevadas concentrações do compósito, foi superior a 250 µg.mL⁻¹ nas 3 linhagens testadas, ou seja, os compósitos são considerados inativos, o que se justifica pela quantidade do composto ativo (EPG) ser menor que 10% em massa. Assim, os resultados não indicam ineficácia dos compósitos mas sim que a massa necessária de EPG ainda não havia sido atingida.

Os testes de atividade antiproliferativa *in vitro* foram refeitos para a linhagem B16-F10 tomando como agentes antiproliferativos os compósitos S-

250 μ e f-250 μ . Os resultados mostraram que os compósitos possuem GI₅₀ de 66,67 e 82,06 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, o que indicam que nestas concentrações estes compósitos possibilitaram a inibição de 50% do crescimento celular das células de melanoma B16-F10.

Por fim, os resultados obtidos neste trabalho mostraram a obtenção de um novo material compósito, simples e de baixo custo, possuindo qualidades necessárias para inibir a proliferação de células tumorais através do carregamento em meio aquoso do composto ativo EPG.

PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

MENÇÕES HONROSAS

1 – **Faria, L. A.** Synthesis and Characterization of Guavira Pulp Loaded Silica Nanoparticles. I Simpósio Multidisciplinar em Materiais do Centro Oeste, 2018, Caldas Novas/GO. ISMMCO/2018.

2 - **Faria, L. A.** The use of silica nanoparticles as guavira pulp nanocarriers for treatment of skin cancer. II Simpósio Multidisciplinar em Materiais do Centro Oeste, 2019, Caldas Novas/GO. ISMMCO/2019.

REFERÊNCIAS

1. Janeiro, R. De, Helena, M. & Oliveira, R. *Instituto Nacional de Câncer (INCA)*. (2011).
2. Ferlay, J. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* **136**, E359–E386 (2015).
3. Sá, S. *et al.* Phytochemistry and antimicrobial activity of *Campomanesia adamantium*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **28**, 303–311 (2018).
4. Lima e Silva, M. C. B. *et al.* Antiproliferative Activity of Extracts of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg and Isolated Compound Dimethylchalcone Against B16-F10 Murine Melanoma. *J. Med. Food* **21**, 1024–1034 (2018).
5. Raffa, D., Maggio, B., Raimondi, M. V., Plescia, F. & Daidone, G. Recent discoveries of anticancer flavonoids. *European Journal of Medicinal Chemistry* **142**, 213–228 (2017).
6. Watermann, A. Mesoporous Silica Nanoparticles as Drug Delivery Vehicles in Cancer. *Nanomaterials* **7**, 189 (2017).
7. de Oliveira, L. F. *et al.* Functionalized Silica Nanoparticles As an Alternative Platform for Targeted Drug-Delivery of Water Insoluble Drugs. *Langmuir* **32**, 3217–3225 (2016).
8. Brakmane, G., Winslet, M. & Seifalian, A. M. Systematic review: the applications of nanotechnology in gastroenterology. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **36**, 213–221 (2012).
9. Takeuchi, Y. Sagittal plane spinal mobility is associated with dynamic balance ability of community-dwelling elderly people. *J. Phys. Ther. Sci.* **29**, 112–114 (2017).
10. Almeida, V. L. de *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim. Nova* **28**, 118–129 (2005).
11. Oliveira, P. A. *et al.* Chemical carcinogenesis. *An. Acad. Bras. Cienc.* **79**, 593–616 (2007).
12. Paul Symonds, R. & Foweraker, K. Principles of chemotherapy and radiotherapy. *Curr. Obstet. Gynaecol.* **16**, 100–106 (2006).

13. Wu, L., Li, X., Janagam, D. R. & Lowe, T. L. Overcoming the blood-brain barrier in chemotherapy treatment of pediatric brain tumors. *Pharm. Res.* **31**, 531–540 (2014).
14. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
15. Cezar-Vaz, M. R. *et al.* Skin cancer in rural workers: nursing knowledge and intervention. *Rev. da Esc. Enferm. da USP* **49**, 0564–0571 (2015).
16. Rajkumar, S. & Watson, I. R. Molecular characterisation of cutaneous melanoma: creating a framework for targeted and immune therapies. *Br. J. Cancer* **115**, 145–155 (2016).
17. Schatton, T. & Frank, M. H. Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment Cell and Melanoma Research* **21**, 39–55 (2008).
18. MacKie, R. M. *et al.* Incidence of and survival from malignant melanoma in Scotland: An epidemiological study. *Lancet* **360**, 587–591 (2002).
19. Park, H. Y., Kosmadaki, M., Yaar, M. & Gilchrist, B. A. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**, 1493–1506 (2009).
20. Gupta, A. K. & Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials* **26**, 3995–4021 (2005).
21. Nie, S. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science (80-.)*. **275**, 1102–1106 (1997).
22. Sano, E. E., Rosa, R., Brito, J. L. S. & Ferreira, L. G. Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. *Environ. Monit. Assess.* **166**, 113–124 (2010).
23. Fank-de-Carvalho, S. M., Somavilla, N. S., Marchioretto, M. S. & Bão, S. N. Plant Structure in the Brazilian Neotropical Savannah Species. in *Biodiversity in Ecosystems - Linking Structure and Function* (InTech, 2015).
24. Bailão, E. F. L. C., Devilla, I. A., da Conceição, E. C. & Borges, L. L. Bioactive compounds found in Brazilian cerrado fruits. *International Journal of Molecular Sciences* **16**, 23760–23783 (2015).
25. Bortolotto, I. M. *et al.* A knowledge network to promote the use and valorization of wild food plants in the Pantanal and Cerrado, Brazil. *Reg.*

- Environ. Chang.* **17**, 1329–1341 (2017).
26. Viscardi, D. Z. *et al.* Anti-inflammatory, and antinociceptive effects of *Campomanesia adamantium* microencapsulated pulp. *Rev. Bras. Farmacogn.* **27**, 220–227 (2017).
 27. Oliveira, V. B., Yamada, L. T., Fagg, C. W. & Brandão, M. G. L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. *Food Res. Int.* **48**, 170–179 (2012).
 28. Wei, H. *et al.* Chalcone derivatives from the fern *Cyclosorus parasiticus* and their anti-proliferative activity. *Food Chem. Toxicol.* **60**, 147–152 (2013).
 29. Ravishankar, D., Rajora, A. K., Greco, F. & Osborn, H. M. I. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 2821–2831 (2013).
 30. Vallilo, M. I., Lamardo, L. C. A., Gaberlotti, M. L., De Oliveira, E. & Moreno, P. R. H. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O.Berg. *Cienc. e Tecnol. Aliment.* **26**, 805–810 (2006).
 31. Machate, D. J. *et al.* Fatty acid profile and physicochemical, optical and thermal characteristics of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg seed oil. *Food Sci. Technol.* **40**, 538–544 (2020).
 32. Biavatti, M. . *et al.* Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J.F. Macbr. aqueous extract: weight control and biochemical parameters. *J. Ethnopharmacol.* **93**, 385–389 (2004).
 33. Fundect. Líquens e frutos do cerrado são testados para tratamento de câncer. Available at: <https://www.ufms.br/liquens-e-frutos-do-cerrado-sao-testados-para-tratamento-de-cancer/>. (Acessado: 1º maio 2018)
 34. Adair, J. H. & Parette, M. P. Nanoparticulate Alternatives for Drug Delivery - ACS Nano (ACS Publications). **4**, 4967–4970 (2010).
 35. Cui, J., Yan, Y., Wang, Y. & Caruso, F. Templated assembly of pH-labile polymer-drug particles for intracellular drug delivery. *Adv. Funct. Mater.* **22**, 4718–4723 (2012).
 36. Kerr, J. F. R., Winterford, C. M. & Harmon, B. V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer Therapy. *Cancer* **73**, 2013–2026

- (1994).
37. Jain, S., Hirst, D. G. & O'Sullivan, J. M. Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy. *British Journal of Radiology* **85**, 101–113 (2012).
 38. Napierska, D. *et al.* Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells. *Small* **5**, 846–853 (2009).
 39. Möller, K., Kobler, J. & Bein, T. Colloidal suspensions of mercapto-functionalized nanosized mesoporous silica. *J. Mater. Chem.* **17**, 624–631 (2007).
 40. Nieto, A., Colilla, M., Balas, F. & Vallet-Regí, M. Surface electrochemistry of mesoporous silicas as a key factor in the design of tailored delivery devices. *Langmuir* **26**, 5038–5049 (2010).
 41. Zhou, S., Wu, L., Sun, J. & Shen, W. The change of the properties of acrylic-based polyurethane via addition of nano-silica. *Prog. Org. Coatings* **45**, 33–42 (2002).
 42. Slowing, I. I., Vivero-Escoto, J. L., Wu, C. W. & Lin, V. S. Y. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* **60**, 1278–1288 (2008).
 43. Gomes, L. S., Furtado, A. C. R. & Souza, M. C. De. A Sílica e suas Particularidades. **10**, (2018).
 44. Lü, Y. *et al.* Functionalization of Cubic I a 3d Mesoporous Silica for Immobilization of Penicillin G Acylase. *Adv. Funct. Mater.* **17**, 2160–2166 (2007).
 45. Slowing, I., Trewyn, B. G. & Lin, V. S. Effect of Surface Functionalization of MCM-41-Type Mesoporous Silica Nanoparticles on the Endocytosis by Human Cancer Cells. 14792–14793 (2006).
 46. Hench, L. L. & West, J. K. The sol-gel process. *Chem. Rev.* **90**, 33–72 (1990).
 47. Mornet, S., Vasseur, S., Grasset, F. & Duguet, E. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. *J. Mater. Chem.* **14**, 2161 (2004).
 48. Duran, J. D. G., Arias, J. L., Gallardo & Delgado, V. A. Magnetic Colloids As Drug Vehicles. *J. Pharm. Sci.* **101**, 2271–2280 (2012).

49. Kesse, S. *et al.* Mesoporous Silica Nanomaterials: Versatile Nanocarriers for Cancer Theranostics and Drug and Gene Delivery. *Pharmaceutics* **11**, 77 (2019).
50. Salgueiriño-Maceira, V., Correa-Duarte, M. A., Spasova, M., Liz-Marzán, L. M. & Farle, M. Composite Silica Spheres with Magnetic and Luminescent Functionalities. *Adv. Funct. Mater.* **16**, 509–514 (2006).
51. MCCARTHY, J. & WEISSLEDER, R. Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1241–1251 (2008).
52. Yoon, T.-J. *et al.* Multifunctional Nanoparticles Possessing A “Magnetic Motor Effect” for Drug or Gene Delivery. *Angew. Chemie Int. Ed.* **44**, 1068–1071 (2005).
53. Silva, M. F. & Luiz, H. W. Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Sílica como Nanocarreador do Composto RM78 e Investigação de sua Atividade Anticolinesterásica. Dissertação de Mestrado - UFMS (2018).
54. Yemm, E. W., Cocking, E. C. & Ricketts, R. E. The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst* **80**, 209 (1955).
55. Monks, A. *et al.* Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **83**, 757–766 (1991).
56. Skehan, P. *et al.* New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107–1112 (1990).
57. Dedavid, B. A., Gomes, C. I. & Machado, G. Microscopia Eletrônica de Varredura - Aplicações e preparo de amostras. Porto Alegre: Edipucrs, 2007. 60 p.
58. Malvern. Zetasizer Nano Series (2009) - pdf.
59. Ehlers, H., Heinämäki, J. & Yliruusi, J. Particle size and packing characterization by diffuse light transmission. *Particuology* **10**, 619–627 (2012).
60. Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R. Princípio de Análise Instrumental. 6. ed. Cengage Learning, 2008.
61. Yu, K. O. *et al.* Toxicity of amorphous silica nanoparticles in mouse keratinocytes. *J. Nanoparticle Res.* **11**, 15–24 (2009).
62. Kim, I., Joachim, E., Choi, H. & Kim, K. Toxicity of silica nanoparticles

- depends on size, dose, and cell type. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **11**, 1407–1416 (2015).
63. Lu, H.-T. Synthesis and characterization of amino-functionalized silica nanoparticles. *Colloid J.* **75**, 311–318 (2013).
 64. Shariati, B. *et al.* Interaction of silica nanoparticles with tau proteins and PC12 cells: Colloidal stability, thermodynamic, docking, and cellular studies. *Int. J. Biol. Macromol.* **118**, 1963–1973 (2018).
 65. Nakanishi, K., Tomita, M. & Kato, K. Synthesis of amino-functionalized mesoporous silica sheets and their application for metal ion capture. *J. Asian Ceram. Soc.* **3**, 70–76 (2015).
 66. Hu, D. *et al.* A novel hybrid filler of halloysite nanotubes/silica fabricated by electrostatic self-assembly. *Mater. Lett.* **188**, 327–330 (2017).
 67. Rahman, I. A., Jafarzadeh, M. & Sipaut, C. S. Synthesis of organo-functionalized nanosilica via a co-condensation modification using γ -aminopropyltriethoxysilane (APTES). *Ceram. Int.* **35**, 1883–1888 (2009).
 68. Zhang, Q. *et al.* Redox- and enzyme-responsive fluorescent porous silica nanocarriers for drug delivery. *Sensors Actuators B Chem.* **276**, 370–377 (2018).
 69. Du, X. *et al.* Developing Functionalized Dendrimer-Like Silica Nanoparticles with Hierarchical Pores as Advanced Delivery Nanocarriers. *Adv. Mater.* **25**, 5981–5985 (2013).
 70. Santos, M. S. *et al.* Polissacarídeos Extraídos da Gabiroba Propriedades Químicas e Perfil Reológico. **20**, 352–358 (2010).
 71. Santos, S. *et al.* frutos de C ampomanesia Xanthocarpa B . (Gabiroba) Physicochemical characterization , extraction and analysis of pectins from fruit of C ampomanesia Xanthocarpa B . (Gabiroba). 101–106
 72. Juhász, M., Kitahara, Y., Takahashi, S. & Fujii, T. Thermal stability of vitamin C: Thermogravimetric analysis and use of total ion monitoring chromatograms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **59**, 190–193 (2012).
 73. Kayaci, F., Umu, O. C. O., Tekinay, T. & Uyar, T. Antibacterial Electrospun Poly(lactic acid) (PLA) Nanofibrous Webs Incorporating Triclosan/Cyclodextrin Inclusion Complexes. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 3901–3908 (2013).
 74. Makarovskiy, I. *et al.* Novel Triclosan-Bound Hybrid-Silica Nanoparticles

- and their Enhanced Antimicrobial Properties. *Adv. Funct. Mater.* **21**, 4295–4304 (2011).
75. Liou, T.-H. Evolution of chemistry and morphology during the carbonization and combustion of rice husk. *Carbon N. Y.* **42**, 785–794 (2004).
76. Zhang, Y. *et al.* High efficiency reductive degradation of a wide range of azo dyes by SiO₂-Co core-shell nanoparticles. *Appl. Catal. B Environ.* **199**, 504–513 (2016).
77. Itharat, A. *et al.* In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. *J. Ethnopharmacol.* **90**, 33–38 (2004).
78. Fouche, G. *et al.* In vitro anticancer screening of South African plants. *J. Ethnopharmacol.* **119**, 455–461 (2008).