



Laís Helena Moreira da Costa

Os efeitos da funcionalização simples, Janus e tripla de nanopartículas de ouro na incorporação celular.

Tese de Doutorado

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química.

Profa. Ana Maria Percebom

Orientadora

PUC-Rio

Rio de Janeiro, novembro de 2023



Laís Helena Moreira da Costa

Os efeitos da funcionalização simples, Janus e tripla de nanopartículas de ouro na incorporação celular.

Tese de Doutorado

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da PUC-Rio como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química.

Profa. Ana Maria Percebom

Orientadora

Departamento de Química -PUC-Rio

Prof. Jefferson Ferraz

Pontifícia Universidade Católica - PUC-Rio

Prof. Thenner Rodrigues

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Tiago Albino

Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Tommaso del Rosso

Pontifícia Universidade Católica - PUC-Rio

Rio de Janeiro, 14 de novembro de 2023.

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, da autora e do orientador.

Laís Helena Moreira da Costa

Graduou-se em Química Industrial na UFRRJ (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro) em 2015 e em Licenciatura em Química pela Fundação Técnico Educacional Souza Marques em 2016. Concluiu o Mestrado em Química na PUC-Rio (Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro) em 2018, atuando na área de físico-química.

Ficha Catalográfica

Costa, Laís Helena Moreira da

Os efeitos da funcionalização simples, Janus e tripla de nanopartículas de ouro na incorporação celular / Laís Helena Moreira da Costa; orientadora: Ana Maria Percebom. – 2023.

69 f.: il. color.; 30 cm

Tese (doutorado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Química, 2023.

Inclui bibliografia

1. Química – Teses. 2. Nanopartículas metálicas. 3. Funcionalização. 4. Janus. 5. Plasmônica. 6. Nanopartículas anfífilas. I. Percebom, Ana Maria. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Química. III. Título.

CDD: 540

Dedico este trabalho aos meus pais e meu marido. Sou grata pelo apoio incondicional.

Agradecimentos

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todas as pessoas e instituições que tornaram possível a conclusão desta tese de doutorado. Este trabalho representa o resultado de anos de dedicação e esforço, e não teria sido possível sem o apoio e a colaboração de muitas pessoas incríveis.

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora, Ana Percebom, pela orientação cuidadosa e encorajamento constante ao longo deste projeto. Sua experiência e sabedoria foram fundamentais para o sucesso desta pesquisa.

À minha família, Marcilene (mãe), Paulo (pai) e Alex (marido) minha gratidão é imensa por todo o apoio inabalável, amor e compreensão durante os anos de estudo. Vocês foram a minha força motriz e fonte de inspiração, e este trabalho é dedicado a vocês.

Aos meus colegas de laboratório e amigos, especialmente Francческа e Matheus, agradeço por todas as discussões estimulantes, sugestões valiosas e momentos de descontração que tornaram esta jornada acadêmica mais rica e significativa.

Agradeço à Universidade PUC-Rio por fornecer os recursos e o ambiente de pesquisa necessários para a realização deste estudo. O apoio financeiro e as instalações laboratoriais foram cruciais para a condução das experiências.

Aos colaboradores da pesquisa, Francческа Fornasier, Juliany Rodrigues, Brunno Verçosa, Nilton Silva, José Costa e Débora Barros, minha gratidão pela participação voluntária e pelo tempo dedicado a este estudo. As contribuições foram essenciais para a obtenção de resultados significativos.

Às fontes de financiamento, CNPq, FAPERJ e CAPES, por acreditarem no potencial deste projeto e por fornecerem o suporte financeiro necessário para a sua realização.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer a todos os professores, colegas, amigos e familiares que me apoiaram ao longo desta jornada acadêmica, mesmo nos momentos mais desafiadores.

Este trabalho é resultado do esforço coletivo de muitos, e estou profundamente grato por todas as contribuições que tornaram este projeto uma realidade. Espero que esta pesquisa contribua de forma significativa para o campo do conhecimento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Resumo

Da Costa, Lais Helena Moreira; Percebom, Ana Maria; Os efeitos da funcionalização simples, Janus e tripla de nanopartículas de ouro na incorporação celular. Rio de Janeiro, 2023. 68p. Tese de Doutorado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Desenvolver um sistema que combine direcionamento ativo para células específicas, elevada incorporação celular, capacidade de transdução fototérmica e biocompatibilidade é um desafio para tornar nanopartículas aplicáveis na área da biomedicina. Neste estudo, realizamos a funcionalização de nanopartículas de ouro (AuNP) em algumas etapas, utilizando macromoléculas estrategicamente para conferir-lhes características-chave de agentes teranósticos. O polietileno glicol (PEG), sendo hidrofílico, melhora a estabilidade e a duração em circulação das nanopartículas. Já o poli(ácido láctico) (PLA), que é um polímero hidrofóbico e biodegradável, desempenha um papel importante na interação e incorporação dessas nanopartículas através das membranas celulares. Além disso, a funcionalização com folato pode oferecer um direcionamento ativo, uma vez que as células tumorais geralmente superexpressam proteínas receptoras de folato.

Através da funcionalização única, dupla, Janus e tripla de AuNP esféricas ou cilíndricas com estes ligantes, conseguimos obter diferentes propriedades relacionadas a agregação, estabilidade e ressonância de plásmons de superfície localizada (LSPR). A funcionalização tripla garante simultaneamente uma estabilidade das nanopartículas em meios aquosos e um aumento significativo na incorporação celular. Além disso, a exposição com radiação infravermelha mostra que os nanobastões conseguem elevar a temperatura mais eficientemente do que as nanoesferas devido à sua banda de ressonância plasmônica superficial longitudinal. Os resultados sugerem que essa estratégia de funcionalização pode ser utilizada para ajustar as propriedades desejadas, possibilitando aplicações práticas e eficazes das nanopartículas de ouro em imagiologia e terapia fototérmica em pesquisas na área biomédica.

Palavras-chave:

nanopartículas metálicas, funcionalização, janus, plasmônica, nanopartículas anfífilas

Abstract

Da Costa, Lais Helena Moreira; Percebom, Ana Maria; The effects of simple, Janus, and triple functionalization of gold nanoparticles on cellular uptake. Rio de Janeiro, 2023. 68p. Tese de Doutorado – Departamento de Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Developing a system that combines active targeting to specific cells, enhanced cellular uptake, photothermal transduction capacity, and biocompatibility is a challenge to make nanoparticles applicable in the field of biomedicine. In this study, we carried out the functionalization of gold nanoparticles (AuNP) in several steps strategically using macromolecules to provide key characteristics of theragnostic agents. Polyethylene glycol (PEG), being hydrophilic, enhances nanoparticle stability and circulation lifetime. Polylactic acid (PLA), which is a biodegradable hydrophobic polymer, plays an important role in the interaction and uptake of these nanoparticles through cellular membranes. Furthermore, functionalization with folate can offer active targeting, as tumor cells typically overexpress folate receptor proteins.

By single, double, and triple functionalization of spherical and rod-shaped AuNP with these ligands, we obtained varying properties related to aggregation, stability, and localized surface plasmon resonance (LSPR). Triple functionalization ensured simultaneous stability of the nanoparticles in aqueous media and a significant increase in cellular uptake. Additionally, the incidence of infrared radiation reveals that nanorods can increase the temperature more effectively gold nanospheres due to their longitudinal surface plasmon resonance band. The results suggest that this functionalization strategy can be employed to fine-tune desired properties, enabling practical and effective applications of gold nanoparticles in imaging and photothermal therapy within biomedical research.

Keywords

metallic nanoparticles, functionalization, Janus, plasmonic, amphiphilic nanoparticles

Sumário

1	Introdução	15
1.1	Sistemas de direcionamento específico	16
1.2	Funcionalização de nanopartículas para aplicações biomédicas e o caráter Janus	18
		23
1.3	Nanopartículas de ouro	23
1.4	Polietileno glicol (PEG)	26
1.5	Poliácido láctico (PLA)	27
1.6	Folato	29
1.7	Nanopartículas de ouro funcionalizadas estrategicamente para aplicações biomédicas	31
2	Objetivos	33
3	Metodologia	34
3.1	Materiais	34
3.2	Métodos	34
3.2.1	Síntese de nanopartículas de ouro (esféricas e cilíndricas)	34
3.2.2	Titulação de ácido fólico para obtenção de folato de sódio	37
3.2.3	Funcionalização das nanopartículas	37
3.3	Purificação	38
3.4	Caracterização das nanopartículas antes e após a funcionalização	39
3.4.1	Microscopia de transmissão eletrônica	39
3.4.2	Espectroscopia de ressonância de plásmons de superfície (LSPR)	39
3.4.3	Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	40
3.5	Análises biológicas	40
3.5.1	Cultura celular	40
3.5.2	Análise de viabilidade celular	41
3.5.3	Incorporação celular por citometria de fluxo	41
3.5.4	Incorporação celular avaliada por microscopia óptica	42
3.5.5	Microscopia eletrônica de transmissão por varredura (STEM)	42
3.6	Conversão fototérmica	43
4	Resultados e discussões	45
4.1	Titulação do ácido fólico	45
4.2	Obtenção de nanopartículas de ouro	46
4.3	Funcionalização das nanopartículas	48
4.3.1	Funcionalização simples (com um ligante)	48

4.3.2	Funcionalização múltipla (dois ou três ligantes)	51
4.4	Análises biológicas	56
4.4.1	Análise de viabilidade celular	56
4.4.2	Incorporação celular	57
4.4.3	Microscopia eletrônica de transmissão de varredura (STEM)	59
4.5	Conversão fototérmica	61
5	Conclusão	63
6	Referências bibliográficas	65

Lista de Figuras

Figura 1 - Tipos de nanopartículas Janus. (a) Esférica, (b) Discos, (c) Cilíndrica, (d) Janus haltere, (e) Janus "boneco de neve". (f) Janus com nó vinculado.	20
Figura 2 Representações de tipos de arranjos dos ligantes na superfície do ouro. a) Janus, b) listras, c) ranhuras. Adaptada da referência ¹⁴	20
Figura 3 - Imagens microscopia óptica de campo escuro das células He-La: (A) controle; (B) incubadas com Janus AuNP; e (C) incubadas com AuNP funcionalizadas com PEG. Imagem reproduzida com autorização.	22
Figura 4 - Representação do arranjo dos ligantes. a) AuNP com funcionalização simples e b) AuNP@PEG-PLA	23
Figura 5 - Estrutura molecular do PEG.	27
Figura 6 - Estrutura molecular do PLA.	29
Figura 7 - Estrutura molecular do FOL	30
Figura 8 - Curva de titulação do ácido fólico ($4,5 \times 10^{-4}$ M) com solução de NaOH (0,1M).	45
Figura 9 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das AuNS e o histograma contendo a distribuição de tamanho das nanopartículas	47
Figura 10 - Distribuições de diâmetro hidrodinâmico obtidas por espalhamento de luz hidrodinâmico para (a) AuNS e (b) AuNR, com diferentes funcionalizações simples. Os números correspondem à moda da respectiva população (em nm). Os resultados para AuNR@FOL, AuNS@PLA e AuNR@PLA não são visíveis por estarem fora do intervalo de tamanhos analisável. Para AuNR, os resultados são representados como diâmetros hidrodinâmicos aparentes por não representarem os tamanhos reais devido à sua anisometria que gera dois modos de relaxação.	49
Figura 11 - Espectros de densidade óptica de (a) AuNS e (b) AuNR, com diferentes funcionalizações simples. Os números correspondem ao comprimento de onda da densidade óptica máxima para cada amostra.	51
Figura 12 - Distribuições de diâmetro hidrodinâmico obtidas por espalhamento de luz hidrodinâmico para (a) AuNS e (b) AuNR com diferentes funcionalizações múltiplas. Os números correspondem à moda da respectiva população (em nm). Os resultados para AuNR@FOL-PLA e AuNR@PEG-PLA	

não são visíveis por estarem fora do intervalo de tamanhos analisável. Para AuNR, os resultados são representados como diâmetros hidrodinâmicos aparentes por não representarem os tamanhos reais devido à sua anisometria que gera dois modos de relaxação. 53

Figura 13 - Espectros de densidade óptica de (a) AuNS e (b) AuNR, com diferentes funcionalizações múltiplas. Os números correspondem ao comprimento de onda da densidade óptica máxima para cada amostra. 53

Figura 14 - Avaliação da viabilidade celular usando o ensaio MTS/PMS. (A) células epiteliais renais LLC-MK2 e (B) macrófagos RAW 264.1 tratados com $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AuNS com diferentes funcionalizações por 24, 48 e 72 h de tratamento. 56

Figura 15 - Avaliação da captação celular de AuNS com diferentes tipos de funcionalização por medição da granularidade celular por citometria de fluxo. Células epiteliais renais LLC-MK2 tratadas com $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AuNS por (A) 30 e (B) 60 min. 58

Figura 16 - Microscopia de fluorescência óptica de células epiteliais renais LLC-MK2 tratadas com $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AuNS@FOL-PEG-PLA. (A, C, E). O contraste de fase sobreposto com fluorescência possibilita observar uma marcação vermelha no interior de algumas células 59

Figura 17 - Microscopia eletrônica de transmissão de varredura (STEM) de células epiteliais renais LLC-MK2 tratadas com $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AuNS@FOL-PEG-PLA. (A) Observação da presença de NP distribuídas aleatoriamente pelo citosol celular (setas). Destaque mostrando uma maior ampliação de NP dentro de uma estrutura delimitada por membrana (setas). (B) Observação de NP distribuídas por todo o citoplasma e em organelas que podem ser retículo endoplasmático (setas). Destaque mostrando maior aumento dos NP confirmando sua presença no interior do retículo endoplasmático (pontas de seta). 60

Figura 18 - Variação da temperatura em função do tempo de exposição para AuNP@FOL-PEG-PLA ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) irradiadas por laser de 829,1 nm. 62

Lista de abreviaturas

FOL - Folato

PEG-SH - polietileno glicol terminado em tiol

PLA-SH - poliácido lact terminado em tiol

PEG - polietileno glicol

PLA - poliácido lact

FA - ácido fólico

Au - ouro

AuNR - nanopartícula de ouro cilíndrico

AuNS - nanopartícula de ouro esférica.

STEM - Microscopia eletrônica de transmissão de varredura

AuNP - Nanopartículas de ouro

Au@PEG-NP - nanopartículas núcleo-casca hidrofílicas, que consistem de núcleo de ouro recoberto por polietileno glicol

Au@PEG-PS-JNP - nanopartículas Janus anfifílicas, que consistem de núcleo de ouro recoberto por polietileno glicol e poliestireno

Au@TiO₂-NP - nanopartículas núcleo-casca, que consistem de núcleo de ouro recoberto por uma casca de TiO₂

Au-TiO₂-JNP - nanopartículas Janus, que consistem de núcleo de ouro com um hemisfério recoberto por TiO₂.

CCS -

CTAB - Cloreto de Hexadeciltrimetilamônio

DLS - Espalhamento de luz dinâmico (do inglês, *Dynamic Light Scattering*)

DMSO - Dimetilsulfóxido

D.O. - Densidade óptica

LSPR - Ressonância de plásmons de superfície localizada (do inglês, *Localized Surface Plasmon Resonance*)

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

NP - Nanopartículas

PEG - Polietileno glicol

PLGA-

PS - Poliestireno

R_g - Raio de giro

UV - Ultravioleta

Vis - Visível

1 Introdução

A nanotecnologia é o estudo, manipulação e aplicação de materiais, dispositivos e sistemas em escala nanométrica. O grande interesse por esta área se dá graças a surpreendentes propriedades que a escala proporciona aos materiais. Nanopartículas de ouro (AuNP), por exemplo, têm potencial para aplicações em imagiologia e teranóstica devido às suas propriedades associadas à ressonância plasmônica superficial localizada (LSPR). No entanto, o direcionamento ativo e a maior incorporação celular são essenciais para o sucesso em aplicações reais. Em estudos relatados em artigos científicos recentes, podemos encontrar nanopartículas (NP) de diferentes tipos, como as orgânicas, inorgânicas, magnéticas, entre outras, sendo aplicadas como contraste em imageamento celular, diagnósticos por imagem e em teranóstica, onde há a associação entre diagnóstico e tratamento simultâneos¹ Nestes casos, é interessante o uso de nanopartículas que possam ser facilmente detectáveis, como são as nanopartículas plasmônicas.

Entretanto, para sua utilização em aplicações biomédicas, é necessário garantir que as nanopartículas possuam dimensões e propriedades de superfície adequadas que garantam biocompatibilidade, direcionamento ativo e incorporação celular.

No presente estudo, propomos funcionalizar nanopartículas de ouro com poliácido láctico (PLA) e polietileno glicol (PEG) terminados em tiol para obter NP Janus anfifílicas biocompatíveis e com alta capacidade de incorporação celular. Também avaliamos o uso de nanopartículas previamente incubadas com folato para obter um sistema de direcionamento ativo específico. Finalmente,

combinando diferentes propriedades nos mesmos sistemas, adaptamos esses métodos para nanobastões para garantir uma plataforma multifuncional com aplicação potencial à terapia fototérmica. Os diferentes sistemas obtidos foram caracterizados e usados em testes celulares para verificar sua citotoxicidade e capacidade de incorporação. Os resultados nos permitiram compreender o papel de cada parâmetro controlado, como funcionalizações e formatos das nanopartículas, durante a preparação das amostras. Essas informações são essenciais para otimizar a metodologia de preparar os sistemas, mas também para se obter uma plataforma multifuncional com enfoque no diagnóstico e tratamento do câncer e outras doenças.

1.1 Sistemas de direcionamento específico

Nos primeiros anos do século XX, Paul Ehrlich propôs o conceito de “bala mágica”, para referir-se a agentes inteligentes que afetam apenas a causa das doenças e não têm efeitos nocivos sobre tecidos saudáveis. Este conceito amadureceu através do desenvolvimento de fármacos direcionados a receptores específicos, que atualmente são o foco de pesquisas sobre diversas doenças, principalmente câncer. Os métodos de direcionamento dos fármacos a alvos específicos são geralmente baseados nas diferenças das propriedades físicas e biológicas entre as células cancerígenas e as saudáveis, e podem ser classificados como passivos ou ativos ²³. Os métodos de direcionamento passivos (*passive targeting*) consistem no transporte de fármacos nos interstícios e células dos tumores por simples convecção (movimento de moléculas prevalentemente grandes dentro dos fluidos) ou difusão passiva

(transporte de pequenas moléculas, como oxigênio, através da membrana celular) e não usam uma função química específica. No entanto, tumores possuem uma hipertensão intersticial que dificulta a convecção e torna a difusão o método de direcionamento passivo predominante². Portanto, para o direcionamento passivo de nanopartículas em tratamentos de tumores, destaca-se o efeito de permeabilidade e retenção aumentada, ou EPR, do inglês *Enhanced Permeability Retention*⁴⁵. Devido à vasculatura diferenciada dos tumores, nos quais há anormalidades dos vasos sanguíneos, partículas com tamanhos de 10 – 200 nm tendem a se acumular no espaço intersticial. Além disso, os tumores não apresentam vasos linfáticos funcionais, o que torna a drenagem do tecido ineficiente. Portanto, as nanopartículas que entram no tumor não são removidas eficientemente e permanecem retidas. Para uma elevada concentração de nanopartículas no interior das células cancerígenas, pelo menos três propriedades são particularmente importantes: (i) dimensões maiores que 10 nm para evitar a filtração pelos rins, e menores que 100 nm para evitar uma captura específica pelo fígado⁶; (ii) carga superficial neutra ou negativa para uma eficiente eliminação renal⁷; (iii) ter caráter furtivo, ou do inglês: *stealth effect*,⁸ que significa que a partícula não é reconhecida pelo sistema retículo endotelial, que destruiria qualquer material estranho por opsonização seguida de fagocitose². Como os agentes quimioterápicos normalmente são moléculas de baixo peso molecular, a utilização de veículos nanométricos, tais como lipossomas e nanopartículas poliméricas é promissora porque eles são passivamente direcionados para tumores pelo efeito EPR, levando a uma maior concentração de droga no local do tumor e diminuição da toxicidade em comparação com a administração sistêmica efetiva e local^{9,10}.

Os métodos de direcionamento ativos (*active targeting*) aumentam a especificidade do procedimento e se baseiam principalmente na identificação de um ligante pelo seu alvo. Para isso, a superfície da nanopartícula é funcionalizada com ligantes de direcionamento para promover a interação específica com receptores apropriados expressos no alvo do tratamento. A escolha do ligante é uma etapa importante para garantir que ocorra a ligação a um receptor que seja superexpresso por células tumorais ou pela vasculatura tumoral, mas não por células normais ¹¹.

1.2 Funcionalização de nanopartículas para aplicações biomédicas e o caráter Janus

Para garantir as propriedades desejadas para as nanopartículas, a funcionalização com ligantes de forma planejada é uma etapa muito importante, sobretudo para aplicações biomédicas onde as interações físico-químicas que ocorrem entre os nanomateriais e sistemas biológicos são cruciais para explorar seu potencial. Por exemplo, quando nanopartículas são expostas a fluidos biológicos, as proteínas presentes podem adsorver facilmente na sua superfície, o que interfere negativamente nas interações com as células. Além disso, a funcionalização adequada deve garantir o controle da biodistribuição, toxicidade, depuração e incorporação celular das nanopartículas¹². Quando as nanopartículas são recobertas por ligantes adequados, é possível evitar esta adsorção. Geralmente, busca-se funcionalizar as nanopartículas de modo a torná-las hidrofílicas para garantir a sua estabilidade nos plasma e no soro (meios aquosos). Entretanto, isto desfavorece as interações das nanopartículas

com a membrana celular lipídica, dificultando a penetração. As nanopartículas de ouro, em especial, possibilitam a funcionalização com ligantes de modo a formar monocamadas por autoassociação, ou SAMs, do inglês: *self-assembled monolayers*. Quando misturas de ligantes de natureza química distinta (hidrofílico e hidrofóbico) e com grupos tiol são utilizados para recobrir superfícies de ouro, pode ser observada a segregação de cada ligante de domínios. Os padrões dos domínios formados dependem de dois fatores que competem entre si: a minimização de energia para diminuir o contato entre os ligantes distintos, versus a maximização da entropia proveniente da mistura dos ligantes¹³. Na superfície de nanopartículas de ouro, é possível observar domínios com padrões de ilhas, listras ou com caráter Janus¹⁴. A figura 1 abaixo exemplifica alguns tipos de nanopartículas Janus e na figura 2 representa alguns tipos diferentes de arranjos dos ligantes na superfície da AuNP.

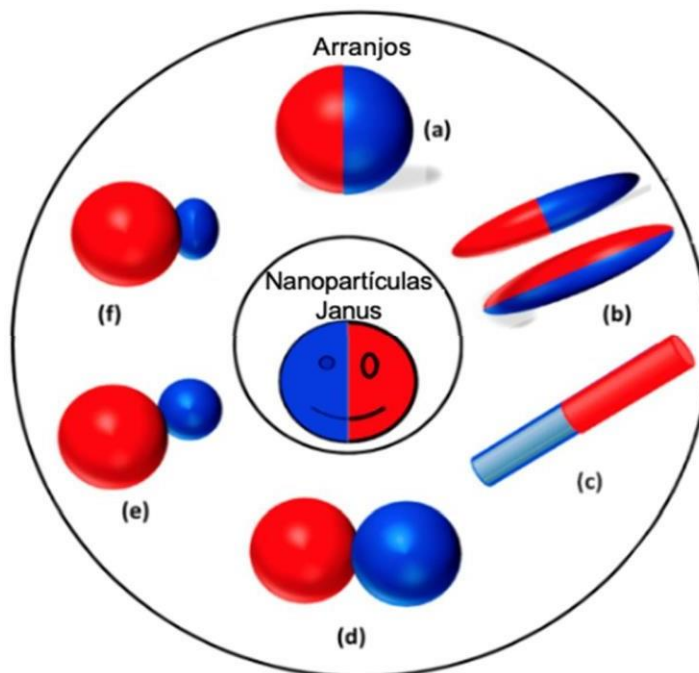


Figura 1 - Tipos de nanopartículas Janus. (a) Esférica, (b) Discos, (c) Cilíndrica, (d) Janus haltere, (e) Janus "boneco de neve". (f) Janus com nó vinculado. Adaptado da referência ¹².

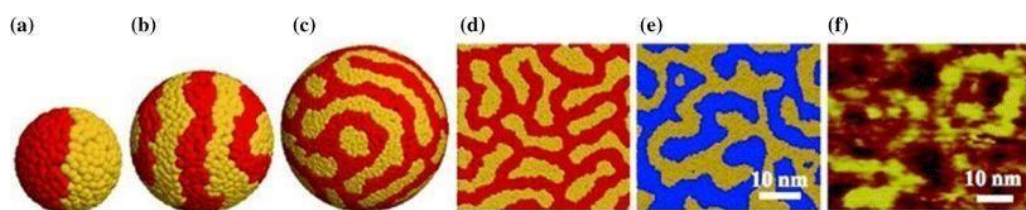


Figura 2 Representações de tipos de arranjos dos ligantes na superfície do ouro. a) Janus, b) listras, c) ranhuras. Adaptada da referência ¹⁴

Nos últimos anos, as NP Janus emergiram como uma nova possibilidade de estruturas coloidais a serem explorados. A nomenclatura Janus é referente ao deus romano de duas faces, já que sua característica essencial é possuir dois

lados ou pelo menos duas superfícies quimicamente diferentes ¹⁵. Um dos tipos mais interessantes de nanopartículas Janus são aquelas formadas por um lado hidrofóbico e por outro lado hidrofílico, proporcionando às NP propriedades análogas às das moléculas de surfactantes, como anfifilicidade, atividade interfacial e autoassociação. Estudos de simulação indicam que o caráter anfílico das nanopartículas Janus deve melhorar a sua internalização em células por favorecer as interações com a membrana celular, que é hidrofóbica ¹⁶⁻¹⁸, sem comprometer a estabilidade em meios aquosos. Recentemente, nosso grupo de pesquisa propôs um método de preparo de nanopartículas de ouro com funcionalização Janus (Janus AuNP) e confirmou experimentalmente que sua internalização em células HeLa é mais eficiente do que a de nanopartículas hidrofílicas, como pode ser observado pelas microscopias da Figura 1¹⁹. Esse método parte de uma dispersão aquosa de AuNP estabilizada por citrato de sódio que é lentamente adicionada a uma solução de polímeros sob agitação vigorosa, contendo dois polímeros, polietilenoglicol (PEG) e poliestireno (PS), terminados em tiol, solubilizados em Tetrahidrofurano, THF, uma vez que o solvente é capaz de dissolver ambos na faixa de concentração utilizada. Os polímeros são adicionados em excesso em relação à superfície de ouro a ser recoberta e, pela presença dos grupos tiol, eles formam ligações S-Au com as nanopartículas. Como um polímero é hidrofílico e o outro é hidrofóbico, as ligações podem se mover na superfície e as cadeias podem se segregar em duas partes ¹³. Uma possível explicação deste fenômeno se baseia na teoria de Flory Huggins, pela qual se espera que a energia livre de mistura de polímeros seja predominantemente dirigida por fatores entálpicos, e não entrópicos devido à alta massa molecular. Desta forma, se os polímeros não apresentam fortes

interações entre si, é esperado que eles se segreguem quando estão em um regime concentrado,^{20,21} como é a concentração local na superfície das nanopartículas.

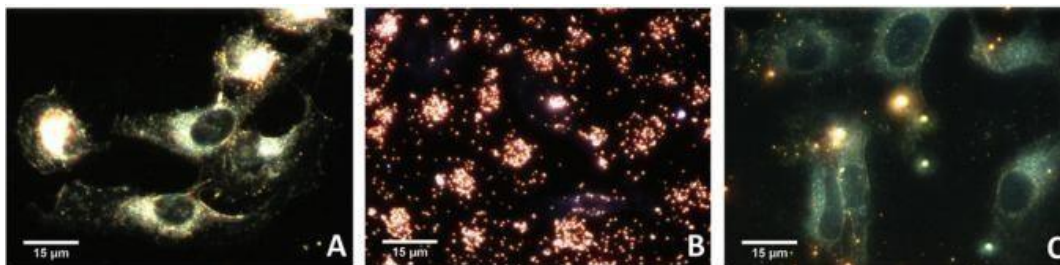


Figura 3 - Imagens microscopia de fluorescência óptica de campo escuro das células He-La: (A) controle; (B) incubadas com Janus AuNP; e (C) incubadas com AuNP funcionalizadas com PEG. Imagem reproduzida com autorização.

A alta incorporação celular mostrada na Figura 3¹⁹ indica o potencial das Janus AuNP como prova de conceito, apesar do PS não poder ser usado em aplicações biomédicas devido a sua toxicidade. Entretanto, se este sistema puder ser estendido para outros polímeros, ele poderia ser usado tanto para diagnósticos, através do efeito de espalhamento das AuNP quanto para tratamento de doenças, graças às propriedades plasmônicas das nanopartículas de ouro.

Abaixo, segue figura 4 que representa alguns tipos de funcionalizações das AuNP com funcionalização simples e dupla (ligantes PLA e PEG), as outras combinações propostas são inéditas e não é possível precisar o arranjo dos ligantes na superfície da nanopartícula de ouro.

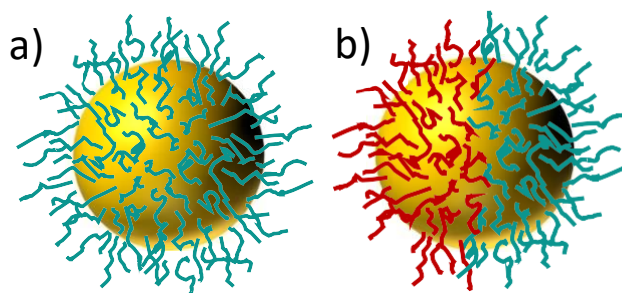


Figura 4 - Representação do arranjo dos ligantes. a) AuNP com funcionalização simples e b) AuNP@PEG-PLA

1.3 Nanopartículas de ouro

Nanopartículas de ouro (AuNP) são interessantes tanto para diagnósticos, quanto para tratamentos médicos ²². Este interesse se deve ao fato de serem relativamente inertes, portanto mais biocompatíveis em comparação a outros metais; à sua química de superfície muito específica que viabiliza a funcionalização planejado; às suas propriedades plasmônicas que garantem características únicas; à grande disponibilidade de métodos para síntese com alto grau de controle de dimensões e formatos; e caracterização através das bandas de LSPR e alta densidade eletrônica, que permite visualizar as AuNP por microscopia eletrônica de transmissão. ²³⁻²⁶.

O ouro apresenta propriedades interessantes quando em escala nanométrica e há uma série de métodos de síntese descritos na literatura que possibilitam o controle do tamanho e formato das nanopartículas ²⁷⁻²⁹. O formato pode ser de esferas, cilindros, cubos, discos, fios, estrelas, prismas triangulares,

entre outros ³⁰. Isso permite controlar facilmente as propriedades ópticas da amostra devido ao efeito de ressonância de plásmons de superfície localizada (do inglês, *Localized Surface Plasmon Resonance*, LSPR). Esta ressonância ocorre a uma determinada frequência em que os elétrons livres da banda de condução sofrem uma oscilação coletiva como resposta à incidência da luz ³¹. A frequência da banda de ressonância é uma importante característica das nanopartículas plasmônicas que pode ser detectada por meio de espectroscopia. Para AuNP esféricas com diâmetro entre 4 e 50 nm, os comprimentos de onda (λ) da banda de ressonância são tipicamente de 510 a 530 nm. Entretanto, nanopartículas cilíndricas apresentam duas bandas de ressonância de plásmons distintas, sendo referentes às oscilações dos elétrons que ocorrem transversalmente e longitudinalmente, podendo chegar a comprimentos de onda até na região do infravermelho³².

Com o desenvolvimento da nanotecnologia, a utilização do ouro em pesquisas no campo da medicina tem aumentado, principalmente envolvendo diagnósticos e terapias de câncer por permitir o desenvolvimento de sistemas para serem usados simultaneamente para imageamento e hipertermia ^{22,33}. O efeito LSPR causa um aumento no espalhamento de energia no comprimento de onda da banda de ressonância de plásmons devido aos fortes campos elétricos gerados na superfície do metal (fenômeno conhecido em inglês como *enhanced resonance scattering*). Isso permite que as nanopartículas plasmônicas sejam usadas como excelentes agentes de contrastes para diagnósticos por imagem, e também para estudos de células e tecidos por microscopia multifóton. Entre as vantagens do uso de nanopartículas como agentes de contraste em relação aos corantes tradicionais, podemos citar a

fotoestabilidade, a alta detectabilidade e a possibilidade de se controlar o comprimento de onda ³⁴.

Além disso, a energia envolvida no LSPR é convertida na forma de calor, o que torna as AuNP interessantes transdutores fototérmicos para provocar um aquecimento localizado, possibilitando tratamento seletivo por hipertermia (terapia fototérmica). Existem diversos métodos de hipertermia, nos quais, lasers, ondas de radiofrequência, campos magnéticos alternados ou ultrassom são usados como fonte de energia para ser convertida em calor, matando as células doentes. As principais desvantagens dos sistemas são a falta de especificidade às células cancerígenas e os efeitos colaterais indesejados no tecido saudável circundante. Para aumentar a especificidade da hipertermia, a aplicação de nanopartículas metálicas que apresentam o efeito LSPR aquecem apenas uma determinada região ou tipo de células é uma boa alternativa. A grande vantagem do ouro em relação aos outros metais é a região do espectro onde o fenômeno ocorre. A radiação na região do ultravioleta é nociva à saúde, e a luz visível é absorvida já nas primeiras camadas da pele. Porém, a radiação na região do infravermelho tem grande penetração nos tecidos para conseguir atingir o órgão doente. As nanopartículas de ouro cilíndricas, ou nanobastões de ouro, são muito interessantes porque o comprimento de onda da banda longitudinal pode atingir a região do infravermelho, e pode ser facilmente controlado por variações na sua razão de aspecto (comprimento/diâmetro). Desta forma, após o direcionamento específico das AuNP cilíndricas, pode ser realizada uma terapia fototérmica com irradiação de infravermelho ^{35,36}.

Em geral, as nanopartículas sem funcionalização não apresentam estabilidade coloidal em meio aquoso e menos ainda em meios fisiológicos,

formando agregados cada vez maiores até precipitar. Uma grande vantagem das AuNP é a forte interação específica entre a superfície de ouro com grupos tiol, que permite a funcionalização deste metal com praticamente qualquer material, de forma muito eficiente, simples e rápida³⁷. Tendo-se em vista que um dos desafios para a real aplicação das AuNP é sua internalização celular e depuração (excreção), e que estas questões podem ser melhoradas através da funcionalização adequada, sugere-se que macromoléculas (com terminações específicas como tiol ou amina) são uma classe de substâncias que podem ser usadas para este fim.

1.4 Polietileno glicol (PEG)

O PEG, cuja estrutura molecular está apresentada na Figura 5, é bastante conhecido na literatura como um dos agentes de funcionalização mais utilizados em aplicações biomédicas para garantir a dispersão e estabilidade em meio aquoso e a biocompatibilidade de nanopartículas³⁸. É também conhecido por ser o melhor tipo de ligante para promover o caráter furtivo (*stealth effect*) por sua capacidade de repelir opsoninas³⁹. A funcionalização eficiente com PEG aumenta o tempo de meia-vida de circulação na corrente sanguínea. As nanopartículas podem ser funcionalizadas com apenas PEG ou em conjunto com outras moléculas como peptídeos⁴⁰, proteínas⁴¹ e até mesmo outros polímeros capazes de proporcionar o caráter Janus¹⁹, auxiliando na internalização na célula alvo, como propomos neste trabalho. Normalmente são utilizadas cadeias de PEG com terminação tiol (-SH) para garantir a forte

interação na superfície do ouro⁴². Entretanto, há outros grupos que podem ser usados como terminações dos ligantes, como por exemplo, os grupos amina.

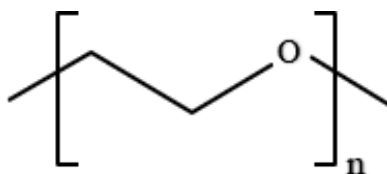


Figura 5 - Estrutura molecular do PEG.

1.5 Políácido láctico (PLA)

Também bastante conhecido na literatura por seu uso seguro em humanos em uma grande variedade de aplicações, o PLA se difere do PEG sobretudo por ser hidrofóbico e biodegradável por hidrólise e atividade enzimática ⁴³. Famoso por possuir propriedades elásticas de grande interesse na área de materiais biomédicos, o PLA, cuja estrutura molecular está representada na Figura 6, é um poliéster alifático obtido a partir da policondensação dos monômeros D- ou L-lactato, ou seja, uma fonte renovável e natural proveniente da fermentação de açúcares, tornando-se acessível para aplicações biomédicas⁴⁴. São seus grupos ésteres hidrolisáveis que o tornam biodegradável e os grupos laterais de metila que o tornam hidrofóbico.

O PLA pode degradar através da hidrólise, onde os grupos ésteres têm suas ligações rompidas na presença da água, resultando em fragmentos de cadeias menores, como os ácidos lácticos. Outro tipo de degradação que pode ocorrer é a biológica, onde a cadeia pode ser decomposta por microorganismos.^{45,46}

O PLA é encontrado em duas formas ópticas: D-lactato e L-lactato, com propriedades físicas e biodegradabilidade distintas, sendo mais usado na forma L ou de mistura DL. As maiores desvantagens do PLA são sua fragilidade mecânica e baixa estabilidade térmica⁴⁷. Para determinadas aplicações, sua hidrofobicidade também pode ser uma desvantagem e, por isso, alterações na arquitetura da macromolécula vêm sendo utilizadas, como a obtenção do copolímero de PLA-PEG⁴⁶. Entretanto, seu uso combinado a nanopartículas de ouro ainda é muito pouco explorado na literatura. Entre os poucos exemplos existentes, podemos mencionar o uso de PLA terminado em tiol na funcionalização de AuNP com tamanhos menores que 10 nm, que são estáveis quando dispersas em solventes apolares ou fracamente polares, como heptano, tolueno e clorofórmio. Estas nanopartículas recobertas por PLA foram então incorporadas em nanocarreadores poliméricos, que são nanopartículas de PLA de cerca de 100 nm. Desta forma, as AuNP podem ser utilizadas para marcar os nanocarreadores possibilitando que sejam rastreados dentro de tecidos⁴⁸. Mais recentemente, para AuNP funcionalizadas com grupos amina foram conjugadas covalentemente com a terminação de ácido carboxílico do polímero hidrofóbico poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA). Após esta funcionalização, as nanopartículas foram incorporadas ao copolímero em bloco anfifílico, PLA-PEG, que é conhecido por se auto-organizar em NP estruturadas, que serviram como modelos de nanocarreadores⁴⁹.

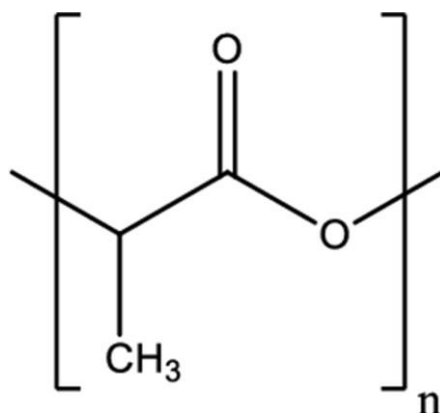


Figura 6 - Estrutura molecular do PLA.

1.6 Folato

Além dos polímeros, outras moléculas de alta massa molecular podem ser usadas na funcionalização de nanopartículas de ouro. Um componente de grande relevância neste cenário é o folato, que possui massa molecular igual a 441,37 g/mol e valores de pKa₁ igual 2,3 e pKa₂ igual a 8,3. Sua estrutura molecular está apresentada na Figura 7. O folato, é uma molécula essencial na via de síntese de DNA, e extremamente necessária para a duplicação de células cancerígenas pois ele atua como um doador de grupos metil, fornecendo unidades de metila necessárias para a síntese de timidina, que é uma das bases nitrogenadas presentes no DNA.⁵⁰

Além disso, o folato está envolvido na síntese de purinas, que são componentes fundamentais das bases nitrogenadas adenina e guanina no DNA. Essas purinas são essenciais para a formação dos nucleotídeos, os blocos de construção do DNA. Por isso, certas células cancerosas super expressam receptores de folato em relação às células normais⁵¹. Esse fenômeno vem

sendo amplamente usado como uma estratégia para direcionamento ativo de fármacos específicos para tratamento de câncer³.

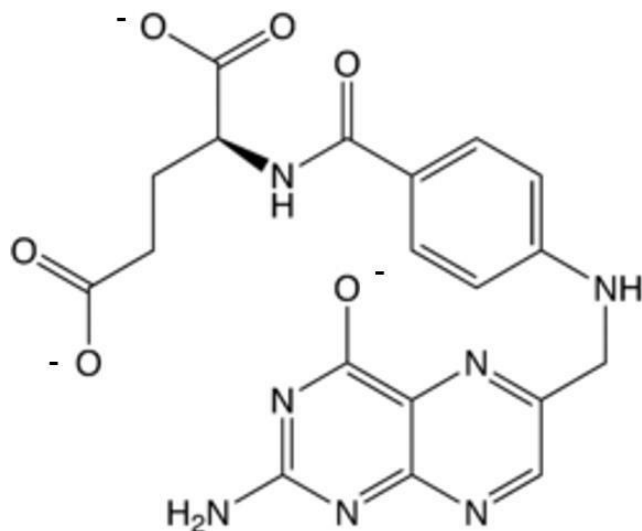


Figura 7 - Estrutura molecular do folato (FOL).

O ácido fólico, bem como uma variedade de seus derivados, liga-se especificamente aos receptores de folato com alta afinidade (K_d próximo de 10^{-10} mol L⁻¹)⁵², permitindo seu emprego como direcionador de diversos fármacos para as células cancerosas, sem causar danos às células saudáveis. Ele tem sido usado em combinação com uma ampla gama de veículos de liberação de drogas incluindo lipossomas, NP de vários tipos e dendrímeros para entregar drogas seletivamente em células cancerígenas usando endocitose mediada por receptores de folato⁵³.

Na literatura já existem trabalhos utilizando ácido fólico ou folatos com nanopartículas de ouro para diversas aplicações biomédicas, sendo elas principalmente para tratamento e diagnóstico de câncer, conforme extensivamente revisado por Samadian *et al.*⁵³. Na maioria dos trabalhos, a

conjugação do ácido fólico combinado a AuNP é baseada em ligações covalentes, principalmente através da formação de ligações amida entre AuNP previamente funcionalizadas com grupos amina e os grupos de ácido carboxílico do ácido fólico ⁵⁴⁻⁵⁶. Também já foi proposta uma síntese de apenas uma etapa de AuNP na presença do ácido fólico, que atua como estabilizante e redutor do HAuCl₄ ⁵⁷. Entretanto, Bhattacharya *et al.* funcionalizaram AuNP com ácido fólico usando apenas interações não-covalentes ⁵⁸. Primeiramente, eles utilizaram PEG com diferentes arquiteturas e com pelo menos duas terminações em grupos tiol ou amina. Após observarem a funcionalização muito mais eficiente das cadeias com duas terminações de tiol (o que provavelmente leva à funcionalização do polímero em forma de alças), as nanopartículas foram incubadas com ácido fólico. Por possuir mais interface disponível, as nanopartículas recobertas com PEG terminados em amina se ligaram (através de interações não covalentes) de forma mais eficiente ao ácido fólico ⁵⁸. Uma alternativa que os autores poderiam ter empregado para melhorar a interação com ácido fólico seria utilizá-lo para incubar as AuNP primeiramente, e apenas posteriormente utilizar o PEG, para evitar a competição com a interação mais forte de tiol e amina.

1.7 Nanopartículas de ouro funcionalizadas estrategicamente para aplicações biomédicas

Embora a nanotecnologia esteja avançando cada vez mais em direção a aplicações práticas na biomedicina, ainda existem desafios a serem superados, sobretudo o de se combinar várias propriedades em um único sistema, como:

estabilidade em meio aquoso, incorporação em membranas celulares, direcionamento ativo, biocompatibilidade, efeito LSPR para aumento de espalhamento e transdução fototérmica, se possível, na região do infravermelho. Uma possível estratégia para garantir todas estas propriedades seria com nanobastões de ouro funcionalizados com macromoléculas biocompatíveis que garantam um caráter anfifílico, como o PEG e o PLA, e que também possuam algum agente direcionador em sua superfície, como o folato. Para isso, é importante encontrar uma estratégia de funcionalização adequada, compreendendo o papel de cada ligante, e caracterizar as propriedades físico-químicas dos materiais obtidos.

2 Objetivos

Objetivo Geral

Este estudo visa a funcionalização estratégica de nanoesferas e nanobastões de ouro utilizando PEG e PLA terminados em tiol para obter Janus AuNP anfifílicas, biocompatíveis e com incorporação celular aumentada. Espera-se que tais sistemas apresentem propriedades desejáveis para diagnósticos por imagem e tratamento fototérmico devido às propriedades plasmônicas. Além disso, o estudo também visa o uso de AuNP previamente incubadas com folato para proporcionar um sistema de direcionamento ativo.

Objetivos Específicos

1. Obter nanoesferas de ouro funcionalizadas com um ou mais ligantes (PEG, PLA e folato), além de obter caracterização físico-química.
2. Estender o método de funcionalização para nanobastões de ouro para garantir as propriedades de superfície em um sistema com banda de ressonância de plasmon na região do infravermelho próximo.
3. Conduzir testes das nanopartículas em células para avaliar sua citotoxicidade, a capacidade de incorporação celular e de transdução fototérmica.

3 Metodologia

3.1 Materiais

Citrato de sódio tribásico di-hidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\geq 99,0\%$), ácido tetracloreáurico (III) tri-hidratado ($\text{HAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99%), nitrato de prata (AgNO_3 , $\geq 99,9999\%$), brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB, $\geq 98\%$), dimetil sulfóxido (DMSO, $> 99,9\%$), poli(L-ácido láctico) terminado em tiol (PLA-SH, 2,5 kDa e $\text{PDI} \leq 1,2$), o-[2-(3-mercaptopropionilamino)etil]-o'-metil-polietilenoglicol (PEG-SH, 5 kDa) e poli(4-estirenosulfonato de sódio) (NaPSS, 70 kDa) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Ácido fólico foi adquirido da Oakwood Chemical (97%) e titulado com uma solução de hidróxido de sódio (da Dinâmica) (NaOH , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) até o ponto de equivalência para obter folato de sódio (FOL). Ácido L-ascórbico foi adquirido da TCI ($> 99,0\%$).

Toda a vidraria utilizada na síntese de nanopartículas foi previamente lavada com água régia (mistura de HCl e HNO_3 na proporção 3:1 v/v) para evitar interferência de possíveis contaminantes metálicos. A água ultrapura foi obtida de um sistema com filtro de 0,2 μm e resistividade acima de $18,2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ e foi utilizada em todos os experimentos.

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese de nanopartículas de ouro (esféricas e cilíndricas)

Para a obtenção de nanopartículas de ouro esféricas, AuNS, (do inglês, *gold nanospheres*) foi utilizado o método de Turkevich ²⁸, no qual se realizou a redução do precursor HAuCl_4 (500 mL, $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) por citrato de sódio ($109 \mu\text{L}$, $2,42 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em água fervente (aproximadamente 95°C) sob agitação vigorosa por 20 minutos. A agitação permaneceu até a dispersão atingir a temperatura ambiente, proporcionando nanoesferas de ouro de aproximadamente 15 nm de diâmetro.

Para a obtenção de nanobastões de ouro (AuNR, do inglês, *gold nanorods*), foi utilizado um método que consiste em duas etapas. Na primeira, foram obtidas pequenas nanopartículas, chamadas de “sementes”, usando um redutor forte: o NaBH_4 . Estas sementes foram então utilizadas na etapa seguinte para nuclear o direcionado crescimento dos nanocilindros usando um redutor fraco: o ácido ascórbico. O crescimento ocorre unidirecionalmente graças ao uso combinado de AgNO_3 e o surfactante brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB)⁵⁹. Devido à preferência de interação destas substâncias em determinadas faces do cristal de ouro, elas ficam impedidas de crescer, levando ao formato anisométrico. Para isso, as sementes de ouro foram preparadas pela redução do HAuCl_4 ($5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) com NaBH_4 ($6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de CTAB ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). Em uma segunda etapa, o HAuCl_4 foi reduzido por ácido ascórbico ($0,0788 \text{ mol L}^{-1}$) na presença de CTAB, desta vez na concentração de ($0,20 \text{ mol L}^{-1}$), AgNO_3 ($0,0040 \text{ mol L}^{-1}$) e 12 mL da dispersão de “sementes” de ouro para obter AuNR com uma banda longitudinal de plásmon em cerca de 800 nm. Os AuNR obtidos foram estabilizados por CTAB, que é tóxico para aplicações biomédicas, o que é uma das principais limitações do uso de AuNR na área. Por isso, foi necessário remover este direcionador de

morfologia antes da etapa de funcionalização para garantir que sua concentração esteja muito abaixo do limite de toxicidade recomendado. O processo de remoção do CTAB é um desafio por dois motivos principais, sendo o primeiro deles devido à força da sua interação com o ouro. O segundo é que o CTAB é responsável também pela estabilidade coloidal de AuNR, e sua remoção poderia levar a uma agregação irreversível. Por isso, realizamos o método que utiliza primeiramente o PSS^{60,6154,55}. Diluiu-se 40 mL da dispersão AuNR em 160 mL de água, que foi centrifugada a uma rotação de 6500 g por 60 min em tubos com membranas filtrantes de celulose. Após separação do sobrenadante, o volume passou a ser de 10 mL, que foram diluídos em 100 mL de água. Na etapa seguinte centrifugou-se novamente a dispersão (6500 g, 60 min) e o concentrado foi redisperso em 100 mL de uma solução de PSS (0,15% m/m). A dispersão foi deixada em repouso por pelo menos 1h até a etapa seguinte.

Novamente, a dispersão foi submetida a centrifugação, desta vez a 7500 g por 30 min, o precipitado foi redisperso em 100 mL de PSS (0,15% m/m). Para substituir o PSS por citrato, um volume de 30 mL da dispersão foi centrifugado a 7500 g por 30 min). Com a remoção do sobrenadante, o material foi concentrado em 0,2 mL, redisperso em 30 mL de solução de citrato de sódio $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e deixado em repouso por 12 h. Finalmente, a última etapa foi repetida para obter a dispersão de AuNR estabilizada em citrato e utilizada nas seções seguintes.

Além de ser biocompatível, o citrato é um estabilizador que apresenta interações fracas com o ouro, podendo ser facilmente substituído pelos polímeros nas etapas seguintes. Embora seja um método trabalhoso e que envolve muitas etapas, o método acima provavelmente ainda é o mais eficiente

entre os descritos na literatura e mais adequado para a estratégia do presente projeto.

3.2.2 Titulação de ácido fólico para obtenção de folato de sódio

Uma solução de ácido fólico $0,03 \text{ g mL}^{-1}$ foi titulada com uma solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, monitorada com um pHmetro da marca Hanna, modelo edge EC, para obter uma solução final de folato de sódio (FOL).

3.2.3 Funcionalização das nanopartículas

O método proposto para obtenção de Janus AuNP¹⁹ foi utilizado como base para que as mesmas características físico-químicas de interesse fossem mantidas (plasmônica e anfifilicidade), porém com alterações para obter novas propriedades importantes para aplicações biológicas, como a biocompatibilidade e a resposta fototérmica na região do infravermelho. Para isso, além da extensão do método para nanobastões, foi fundamental o planejamento estratégico da funcionalização, incluindo a seleção de macromoléculas, solvente e ordem do procedimento.

Foram realizados testes para encontrar um solvente miscível em água, para misturar com a dispersão de nanopartículas, e capaz de dissolver todos os ligantes utilizados: PEG, PLA e FOL. O dimetil sulfóxido, DMSO, foi escolhido, o que foi útil também para os testes com células por ser um solvente que evita a proliferação microbológica.

Suspensões aquosas de AuNS e AuNR a $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foram funcionalizadas utilizando soluções de ácido fólico de sódio (FOL, $7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em água) e polímeros terminados em tiol (PEG-SH e PLA-SH, $1,60 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em DMSO) usando uma adaptação do método de preparação de Janus AuNP¹⁹. As amostras foram preparadas apenas com um dos ligantes, ou dois deles (resultando provavelmente em nanopartículas Janus), ou todos os três. Como a afinidade do FOL pelo ouro não é tão intensa quanto a dos grupos tiol dos polímeros, a concentração de FOL foi a mais alta e ele foi adicionado 15 min antes dos polímeros para garantir a funcionalização. Então, o total de 2,0 mL das soluções dos ligantes desejados foi adicionado a 10,0 mL de DMSO, seguido de 1,0 mL da suspensão de nanopartículas sob agitação magnética, mantida por 15 min. As dispersões finais foram deixadas à temperatura ambiente por 4 h antes da etapa de purificação.

3.3 Purificação

Esta etapa foi essencial para a remoção do excesso de polímeros que não se ligaram às nanopartículas e que poderiam interferir nos resultados de caracterização. As suspensões obtidas na etapa anterior foram centrifugadas até que se separassem do sobrenadante, que foi removido com o excesso de ligantes e substituído por água para a caracterização das nanopartículas ou DMSO para as análises biológicas. Esse procedimento foi repetido duas vezes. Para cada sistema, foi necessário ajustar as condições de velocidade de rotação, temperatura e tempo de centrifugação, porque dependem do tamanho das nanopartículas, do tipo de funcionalização e do solvente em que estão contidas.

O período e a velocidade de rotação da centrifugação foram adaptados para cada sistema até o mínimo necessário para garantir uma separação eficiente do sobrenadante. As nanopartículas foram nomeadas de acordo com seu formato, AuNS ou AuNR, seguido de @ e o nome de seus respectivos ligantes, FOL, PEG, PLA ou uma combinação deles.

3.4 Caracterização das nanopartículas antes e após a funcionalização

3.4.1 Microscopia de transmissão eletrônica

A morfologia das AuNS e AuNR obtidas foi confirmada por microscopia eletrônica de transmissão, realizada com um Talos F200C (Thermo Fischer Scientific) no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) do Brasil (Proposta 20210455). Para isso, a dispersão das nanopartículas foi depositada em uma grade (Electron Microscopy Sciences, CF-400-Cu), e as imagens foram adquiridas com uma tensão de aceleração de 200 kV.

3.4.2 Espectroscopia de ressonância de plásmons de superfície (para LSPR).

Os espectros de densidade óptica das dispersões de nanopartículas antes e após a funcionalização foram obtidos com um espectrofotômetro UV-M51 Bel Photonics ou um Varian Cary 50, usando uma cubeta de quartzo com um caminho óptico de 1,00 cm a 25 °C.

3.4.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

As distribuições e os valores médios do diâmetro hidrodinâmico das AuNP foram obtidos por experimentos de espalhamento dinâmico de luz (DLS) antes e após a funcionalização. As medições foram realizadas em triplicata com um SZ-100 Nanopartica, da Horiba, equipado com um laser de 10 mW com um comprimento de onda de 532 nm, a 25,0 °C e um ângulo de 90 °. O software HORIBA NextGen Project SZ-100 foi utilizado para tratar as funções de autocorrelação com a Transformada Inversa de Laplace (ILT).

3.5 Análises biológicas

Todas as análises biológicas foram realizadas em colaboração com o grupo do Núcleo Multidisciplinar de Pesquisa em Biologia (NUMPEX-Bio) da UFRJ de Duque de Caxias, liderado pela Profa. Dra. Juliany Cola Fernandes Rodrigues.

3.5.1 Cultura celular

As análises biológicas foram realizadas com dois tipos de células: (1) epiteliais renais LLC-MK2 e (2) macrófagos RAW 264.7. As culturas celulares foram mantidas em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Cultilab) a 37 °C com atmosfera de CO₂ a 5% em frascos de cultura de 25 cm²

ou 75 cm² e em placas de cultura de 12 ou 96 poços. O meio de cultura foi suplementado com bicarbonato de sódio (2%), soro fetal bovino (10%, Vitrocell), penicilina (100 U mL⁻¹, Anresco) e estreptomicina (10 mg mL⁻¹, Anresco). Ele foi trocado três vezes por semana e as células foram descartadas quando os frascos atingiram a confluência.

3.5.2 Análise de viabilidade celular

Para esta análise, $1,0 \times 10^5$ células mL⁻¹ foram plaqueadas e após 24 h de crescimento, 2,5 µg mL⁻¹ das diferentes nanopartículas foram adicionados ao respectivo poço. A viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio CellTiter 96® Aqueous MTS (Promega) e analisada após 24, 48 e 72 h de tratamento em triplicata. A reação MTS/PMS foi avaliada por densidade óptica medida em 492 nm em um leitor de microplacas SpectraMax Paradigm e um espectrofluorímetro (Molecular Devices). Os dados foram plotados e submetidos à análise estatística utilizando o software GraphPad Prism.

3.5.3 Incorporação celular por citometria de fluxo

A avaliação da incorporação celular foi realizada por citometria de fluxo. Para isso, as células foram cultivadas em placas de 12 poços. Após 24 h, elas foram refrigeradas a 4 °C por 30 min e então, 2,5 µg mL⁻¹ de nanopartículas foram adicionadas, mantendo a cultura a 4 °C por mais 30 min. As células foram então mantidas a 37 °C por períodos de 30 e 60 min. Após cada período, as

células foram lavadas três vezes em tampão fosfato-salino (PBS) suplementado com glicose (10 mmol L^{-1} PBS-glicose), em pH 7,2, retiradas da placa de cultura com o auxílio de uma solução de tripsina-verseno, lavadas duas vezes em PBS-glicose e ressuspensas em $500 \mu\text{L}$ de PBS-glicose. As células foram avaliadas por citometria de fluxo usando um citômetro Accuri C6 (Becton Dickinson). Foi realizada a leitura de dez mil eventos, determinando o tamanho e a granularidade celular.

3.5.4 Incorporação celular avaliada por microscopia óptica

Após 24 h de crescimento celular, $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de nanopartículas foram adicionados às culturas. As células foram coletadas após períodos de 1, 24 e 48 h de tratamento, lavadas duas vezes com tampão PBS pH = 7,2 e depois fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS por 30 min. Em seguida, as células foram novamente lavadas com tampão PBS duas vezes e depositadas usando lâminas e lamínulas em um meio de montagem. As imagens foram obtidas usando um microscópio óptico de fluorescência Leica DMI 6000.

3.5.5 Microscopia eletrônica de transmissão por varredura (STEM)

Para microscopia eletrônica de transmissão de varredura, as células foram cultivadas em frascos de 25 cm^2 conforme descrito na seção de cultura de células. Após 24 h de cultivo, foi adicionado $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de nanopartículas às

culturas para incubação por períodos de 24 e 48 h. Em seguida, as células controle e incubadas foram lavadas três vezes em PBS pH 7,2 e fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,2 por 1 h. Na sequência, as células foram lavadas três vezes em tampão cacodilato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,2, retiradas do fundo dos frascos de cultura com raspador de células e coletadas em tubo de centrífuga (Eppendorf). Em seguida, as células foram pós-fixadas em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio, 1,25% de ferrocianeto de potássio, 5 mmol L⁻¹ de cloreto de cálcio em 0,1 mol L⁻¹ de tampão cacodilato por 30 min em temperatura ambiente e no escuro. Em seguida, as células foram lavadas no mesmo tampão, desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e embebidas em resina Epon. O ultramicrotomo PT-PC PowerTome foi usado para obter seções de corte ultrafinas, tratados com os corantes acetato de uranila e citrato de chumbo, e observados no microscópio eletrônico de varredura Tescan Vega 3 LMU no modo STEM a 25 kV.

3.6 Conversão fototérmica

As análises de conversão fototérmica foram realizados em colaboração com os Profs. Drs. Nilton P. da Silva e José Mir Justino da Costa do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal do Amazonas – UFAM no Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. As suspensões de nanopartículas triplamente funcionalizadas foram pipetadas em uma cavidade (diâmetro de 6,75 mm e altura de 11,1 mm) de placas de 96 poços com um volume de 260 µL. Então, elas foram irradiadas para

verificar sua resposta em termos de variação de temperatura. Para isso, foi utilizado um laser de diodo (Newport, 525B) com comprimento de onda de 829,1 nm, por 900 s com potência controlada de 439 mW e densidade de potência de $2,91 \text{ W cm}^{-2}$. A potência do laser foi medida com um medidor óptico (THORLABS PM100D com sensor de potência de fotodiodo padrão S121C). O feixe do laser exibia um perfil gaussiano com diâmetro de 3,1 mm (THORLABS - Câmera CMOS USB Compacta de 2,9 mm). O colimador estava perpendicular à placa de 96 poços, coaxial com o poço que continha a amostra, e a uma distância de 135 mm da superfície da amostra. As medições de temperatura foram feitas com uma câmera infravermelha (Teledyne Flir, A325), com uma frequência de aquisição de 1 Hz e um tamanho de pixel de 0,24 mm. A incerteza associada à calibração da câmera foi de 0,1 °C.

4 Resultados e discussões

4.1 Titulação do ácido fólico

Em sua forma protonada, o ácido fólico apresenta menor solubilidade em água do que na forma de sal. Portanto, para garantir uma maior estabilidade das nanopartículas em meio aquoso ao usar esta substância como ligante, o ácido fólico foi convertido em folato de sódio. Para isso, o ácido fólico foi titulado com uma solução de NaOH. Inicialmente, a titulação potenciométrica foi conduzida até o pH 9,5, para determinar os pontos de equivalência. A Figura 8 mostra dois pontos de equivalência, em torno dos valores de pH 5 e 7, que se referem à perda dos dois prótons do ácido fólico. Após esta verificação, uma nova titulação foi conduzida e interrompida em pH = 7 para garantir a neutralização do ácido fólico e obtenção do folato de sódio para as etapas seguintes.

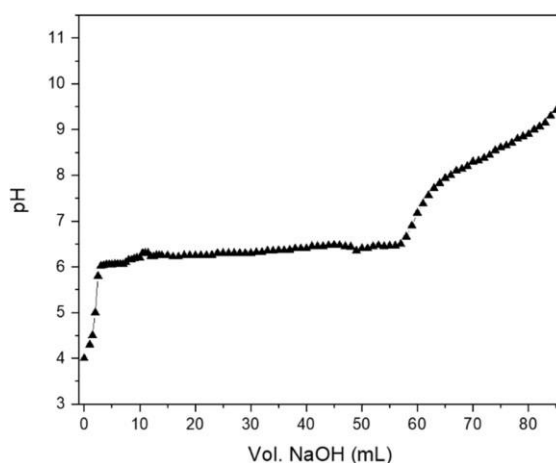


Figura 8 - Curva de titulação do ácido fólico ($4,5 \times 10^{-4} M$) com solução de NaOH (0,1M).

4.2 Obtenção de nanopartículas de ouro

A morfologia e as dimensões das nanoesferas e dos nanobastões, AuNS e AuNR, obtidos por diferentes rotas de síntese foram confirmadas através da microscopia eletrônica de transmissão (Figuras 9 e 10). AuNS apresentaram um diâmetro de 28 ± 5 nm, enquanto os AuNR apresentaram diâmetro de 15 ± 2 e comprimento de 59 ± 6 nm. Tais nanopartículas foram utilizadas para diferentes tipos de funcionalização. Elas também foram caracterizadas por espectroscopia no visível e espalhamento de luz hidrodinâmico antes e após serem funcionalizadas e os resultados comparativos estão apresentados nas próximas seções.

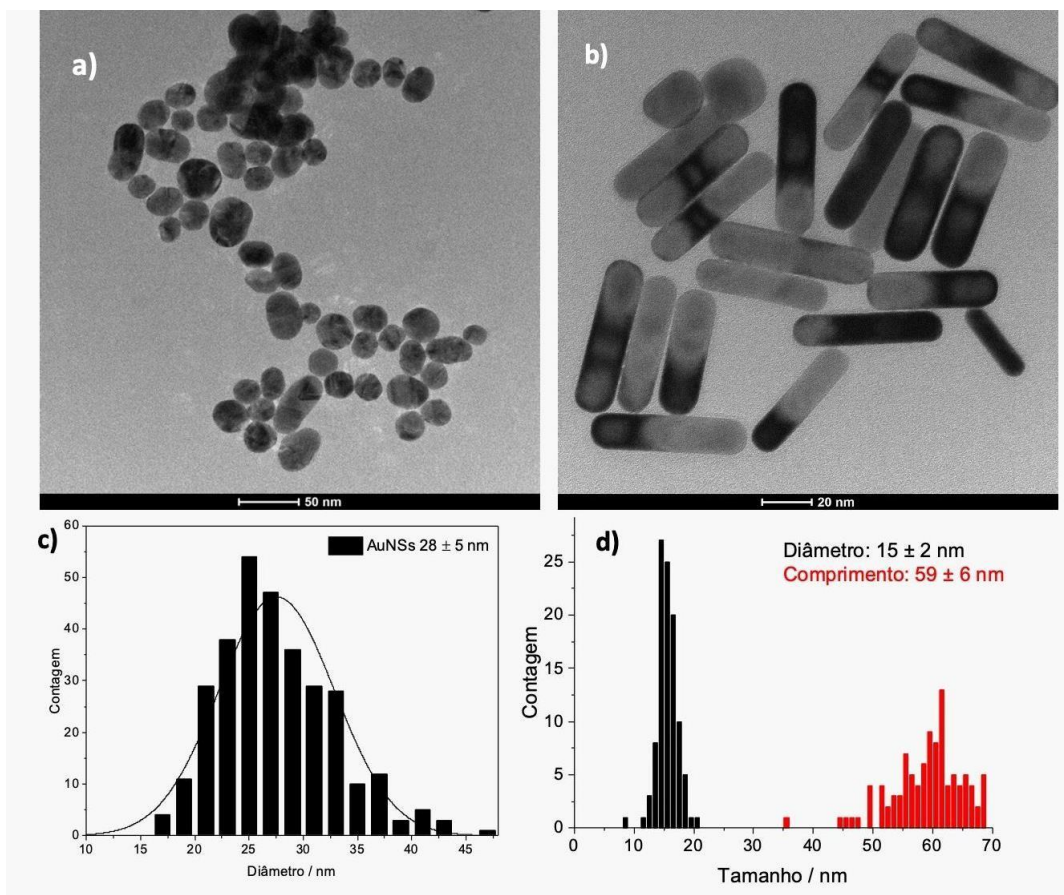


Figura 9 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das AuNS e o histograma contendo a distribuição de tamanho das nanopartículas.

4.3 Funcionalização das nanopartículas

AuNS e AuNR exibiram propriedades físico-químicas diferentes após serem funcionalizadas com FOL, PEG ou PLA ou uma combinação entre eles. Isto ocorre porque as mudanças em suas propriedades de superfície podem também aumentar ou diminuir sua estabilidade em meio aquoso e até mesmo induzir agregação. Essa agregação muda as propriedades ópticas, por exemplo, devido ao acomplamento de plásmons de superfície. A funcionalização também deve interferir nas interações das nanopartículas com as células. Desta forma, torna-se essencial caracterizar as nanopartículas funcionalizadas por apenas um dos ligantes ou por suas diferentes combinações possíveis.

4.3.1 Funcionalização simples (com um ligante)

Dentre os três ligantes utilizados neste estudo, PEG é o mais hidrofílico e PLA é o ligante mais hidrofóbico. Ambos os polímeros são terminados em tiol, garantindo uma forte ligação à superfície do ouro. No entanto, os ânions FOL ligam-se à superfície do ouro principalmente pelos grupos carboxilato, através de interações que são mais fracas que as feitas pelos grupos tiol. Além disso, os grupos carboxilatos são os sítios mais hidrofílicos do folato que contribuiriam na estabilidade em meio aquoso, mas ficam comprometidos ao se ligarem à superfície de ouro.

A observação visual das amostras e os resultados de espalhamento de luz dinâmico (Figura 10) indicam que o PEG evita uma agregação descontrolada

das nanopartículas e as mantem estáveis em meio aquoso, graças à sua hidrofilicidade. É possível notar um aumento no diâmetro hidrodinâmico das AuNS após a funcionalização com PEG, o que pode ser devido à camada de polímeros formada ao redor do núcleo de ouro. Embora esta diferença não seja exatamente o tamanho do polímero, esta distribuição de polímeros como se fossem cabelos ligados às nanopartículas, gera uma grande camada de solvatação que pode alterar a difusão das nanopartículas e resultar em um grande aumento do tamanho hidrodinâmico. Outra possibilidade para a alteração do tamanho hidrodinâmico é a formação de pequenos agregados, porém eles teriam um tamanho controlado e alta estabilidade em meio aquoso.

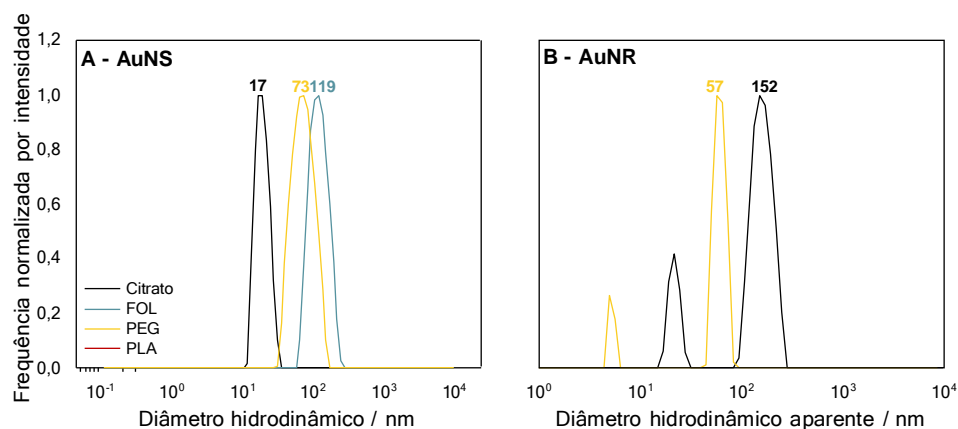


Figura 10 - Distribuições de diâmetro hidrodinâmico obtidas por espalhamento de luz hidrodinâmico para (a) AuNS e (b) AuNR, com diferentes funcionalizações simples. Os números correspondem à moda da respectiva população (em nm). Os resultados para AuNR@FOL, AuNS@PLA e AuNR@PLA não são visíveis por estarem fora do intervalo de tamanhos analisável. Para AuNR, os resultados são representados como diâmetros hidrodinâmicos aparentes por não representarem os tamanhos reais devido à sua anisometria que gera dois modos de relaxação.

Já no caso das AuNR, pode ocorrer a observação de duas populações para nanobastões devido à existência de dois tempos de relaxação relacionados aos modos rotacional e translacional das partículas anisométricas ⁶². No entanto, isso significa que os resultados não representam os tamanhos reais precisos, por isso chamamos de "diâmetro hidrodinâmico aparente", e podem ser usados para comparações entre as amostras. A funcionalização de AuNR com PEG causa uma diminuição no diâmetro hidrodinâmico aparente, ao contrário do observado para AuNS. Este efeito provavelmente se deve porque a troca dos ligantes CTAB por citrato de sódio causa uma certa instabilidade nas AuNR no meio aquoso. Porém, o PEG parece ser capaz de reverter esta instabilidade graças à sua hidrofiliabilidade.

A funcionalização com FOL induz a agregação dos dois tipos de AuNP, causando um aumento significativo no diâmetro hidrodinâmico. Os agregados formados por AuNR@FOL são tão grandes que estão fora da faixa de tamanho analisável por DLS. Embora seja um ligante hidrofílico, o comprometimento dos grupos carboxilatos com a superfície do ouro não permite que eles garantam a estabilidade da nanopartícula em meio aquoso. Devido à hidrofobicidade do PLA, os agregados formados por AuNS@PLA e AuNR@PLA também estão fora da faixa de tamanho analisável por DLS.⁶³

Os espectros de densidade óptica (Figura 11) de AuNP confirmam as observações feitas por DLS. A ligeira mudança na banda de ressonância de plásmon observada após a funcionalização com PEG pode ser devido à mudança do índice de refração ou a uma leve agregação. FOL e PLA causam um alargamento da banda, confirmando a agregação. As características das nanopartículas após a funcionalização simples estão de acordo com o esperado

devido às suas interações intermoleculares. Essa confirmação é essencial para entender os sistemas formados por múltiplos ligantes.

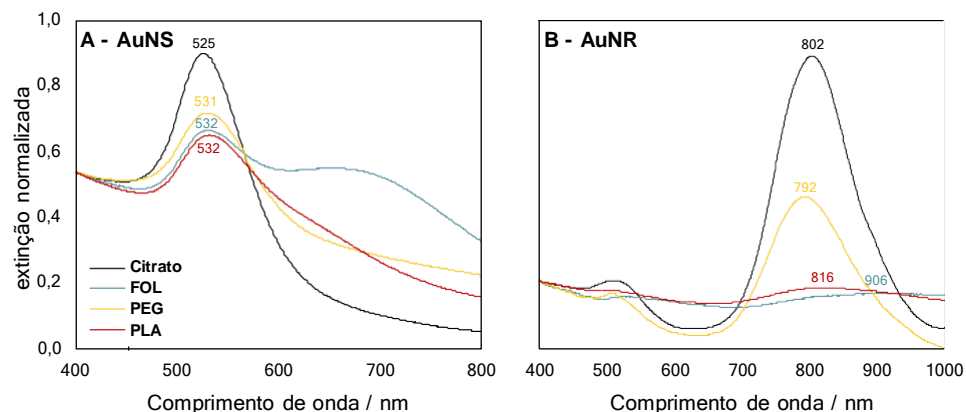


Figura 11 - Espectros de densidade óptica de (a) AuNS e (b) AuNR, com diferentes funcionalizações simples. Os números correspondem ao comprimento de onda da densidade óptica máxima para cada amostra.

4.3.2 Funcionalização múltipla (dois ou três ligantes)

Com base em resultados prévios do grupo, espera-se que a funcionalização de AuNS com dois polímeros forme nanopartículas de ouro com caráter Janus. Embora o escopo deste estudo não envolva a caracterização da distribuição das macromoléculas ao redor das nanopartículas, é esperado que as cadeias de PLA recubram um hemisfério, formando uma face hidrofóbica e as de PEG recubram o outro, formando uma face hidrofílica. Entretanto, a adaptação desse método com dois ligantes, combinando um polímero com uma molécula simples, como o folato, ainda não havia sido descrita na literatura. Esta estratégia poderia ou não formar uma conformação Janus, a depender da

tendência de segregação. Se ela não for suficiente, os ligantes poderiam se distribuir homogeneamente na superfície das nanopartículas. Além do mais, o presente estudo também adaptou a funcionalização pela primeira vez para AuNR. Portanto, para este formato de nanopartículas, não é possível garantir o caráter Janus, mesmo para a combinação de dois polímeros. Considerando que a segregação entre os dois polímeros seja suficiente, além da possibilidade de caráter Janus, os ligantes poderiam formar outras morfologias. Uma hipótese provável é de que um dos polímeros se ligue ao longo do cilindro, enquanto o outro se ligue pelas extremidades, já que as faces cristalográficas do ouro possuem diferentes naturezas químicas. De qualquer forma, a distribuição dos ligantes não é relevante para o presente estudo, mas as propriedades resultantes de tal funcionalização são.

Quando a dupla funcionalização envolve FOL como ligante, a ligação à superfície do ouro é mais fraca do que quando os polímeros são terminados em tiol. Por esta razão, as nanopartículas foram incubadas com FOL antes da adição dos polímeros para garantir que ambos os ligantes se ligassem à superfície do ouro. Os resultados de DLS (Figura 12) e os espectros de densidade óptica (Figura 13) mostraram que as nanopartículas diferem daquelas com uma única funcionalização, confirmando que ambos os ligantes se ligaram à superfície do ouro, embora sua proporção seja desconhecida.

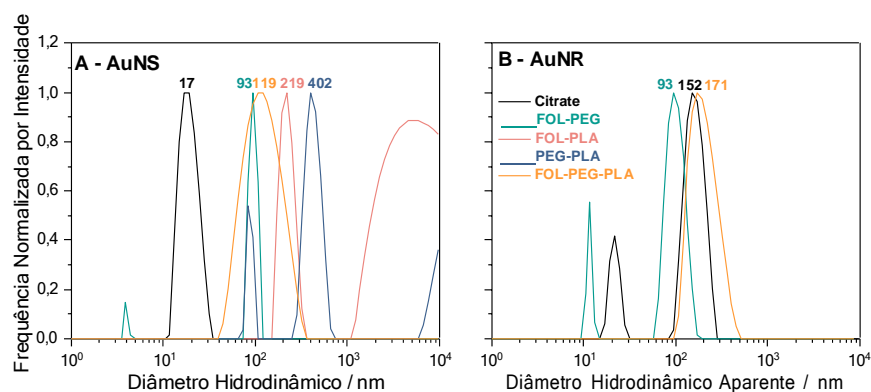


Figura 12 - Distribuições de diâmetro hidrodinâmico obtidas por espalhamento de luz hidrodinâmico para (a) AuNS e (b) AuNR com diferentes funcionalizações múltiplas. Os números correspondem à moda da respectiva população (em nm). Os resultados para AuNR@FOL-PLA e AuNR@PEG-PLA não são visíveis por estarem fora do intervalo de tamanhos analisável. Para AuNR, os resultados são representados como diâmetros hidrodinâmicos aparentes por não representarem os tamanhos reais devido à sua anisometria que gera dois modos de relaxação.

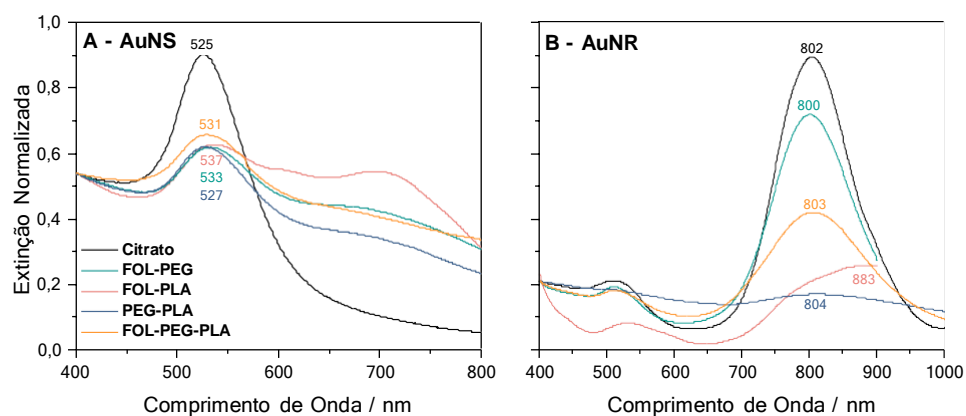


Figura 13 - Espectros de densidade óptica de (a) AuNS e (b) AuNR, com diferentes funcionalizações múltiplas. Os números correspondem ao comprimento de onda da densidade óptica máxima para cada amostra.

Comparando os resultados de DLS de amostras com múltiplas funcionalizações (Figura 12), AuNS@FOL-PEG formam os menores agregados e AuNS@FOL-PLA formam os maiores, o que é esperado devido à hidrofilicidade do PEG, à hidrofobicidade do PLA. AuNS@FOL-PEG e AuNS@FOL-PEG-PLA têm dimensões na mesma faixa (93 e 119 nm, respectivamente) e são estáveis por pelo menos um ano. O diâmetro hidrodinâmico e o espectro das amostras com funcionalização tripla, AuNS@FOL-PEG-PLA, são diferentes das amostras com funcionalização dupla ou simples (Figuras 11-13 a), confirmando que os três ligantes realmente estão presentes na superfície das nanopartículas, conferindo-lhes propriedades diferentes. A mesma tendência de agregação é observada para a funcionalização tripla de nanobastões. Neste caso, a diferença de tamanho dos agregados de AuNR@FOL-PEG-PLA e AuNR@FOL-PEG é maior do que a observada para nanoesferas. As dimensões dos agregados formados por AuNR@PEG-PLA e AuNR@FOL-PLA estão fora da faixa adequada para DLS. O alargamento das bandas de ressonância plasmon de AuNR com funcionalizações múltiplas confirma que, quanto maior a hidrofobicidade dos ligantes, maior a agregação (Figura 13b).

Uma observação interessante e inesperada é que a funcionalização tripla levou à formação de agregados menores e manteve o sistema mais estável em meio aquoso do que a funcionalização com apenas PEG e PLA. Estas propriedades são essenciais para aplicações em células. Além disso, embora se possa esperar que as AuNP@PEG-PLA possam promover a incorporação celular devido à combinação de ligantes hidrofílicos e hidrofóbicos, elas não promoveriam o direcionamento ativo. A funcionalização com FOL deve aumentar

o potencial das nanopartículas para direcionamento ativo, mas os sistemas com funcionalização dupla não satisfazem todas as propriedades físico-químicas necessárias para as aplicações em células. AuNP@FOL-PLA formam agregados tão grandes que não são estáveis em meio aquoso e AuNP@FOL-PEG são estáveis devido à hidrofilicidade do PEG mas não sabemos se o FOL forneceria hidrofobicidade suficiente para aumentar a captação celular. Portanto, a funcionalização com os três ligantes combina estabilidade em meio aquoso, superfície parcialmente hidrofóbica para aumentar a incorporação celular e presença de FOL para promover o direcionamento ativo.

4.4 Análises biológicas

4.4.1 Análise de viabilidade celular

A maioria dos sistemas de AuNS funcionalizadas apresentou baixa ou nenhuma toxicidade para células epiteliais LLC-MK2 e macrófagos RAW264.1 (Figura 14). AuNS@FOL-PLA causou citotoxicidade para células epiteliais somente após 48 h de tratamento e para macrófagos após 24 h de tratamento. No entanto, o efeito foi revertido após 72 h e 48 h, respectivamente, indicando que este é um efeito dependente do tempo.

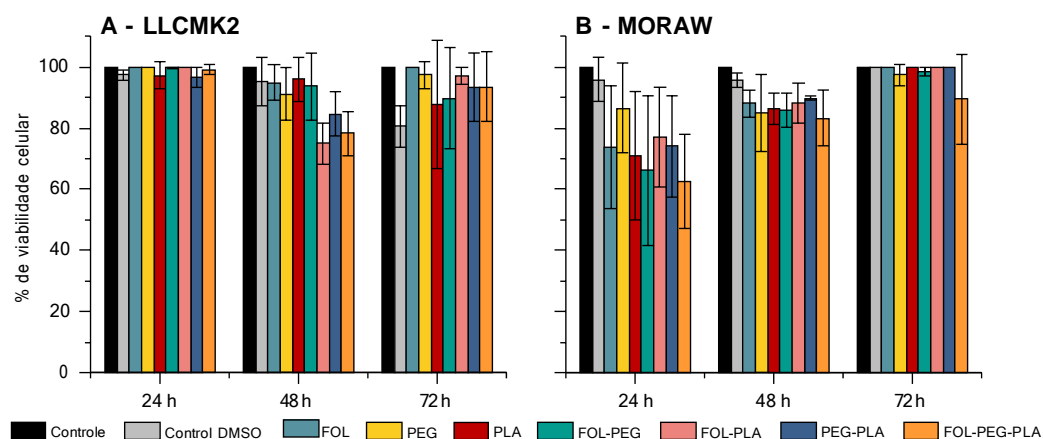


Figura 14 - Avaliação da viabilidade celular usando o ensaio MTS/PMS. (A) células epiteliais renais LLC-MK2 e (B) macrófagos RAW 264.1 tratados com $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AuNS com diferentes funcionalizações por 24, 48 e 72 h de tratamento.

4.4.2 Incorporação celular

A citometria de fluxo foi usada para quantificar a captação celular de AuNP a partir do sinal de espalhamento lateral (do inglês, *side scattering signal*, SSC)⁵⁹. O tipo de funcionalização afetou a captação celular de AuNS pelas células epiteliais, conforme demonstrado pela granularidade celular (Figura 14). Conforme esperado, a funcionalização com PEG dificultou a incorporação celular devido à hidrofilicidade. A incorporação foi reduzida pela metade em relação às AuNS não funcionalizadas e pelo menos 5 vezes menor do que as AuNS funcionalizadas. AuNS@FOL teve uma incorporação ligeiramente maior que AuNS@PLA, apesar da hidrofobicidade do PLA. Em contraste, AuNS@FOL-PLA (Figura 15A) e AuNS@FOL-PEG-PLA (Figura 15B) apresentaram as maiores incorporações em 30 e 60 min, respectivamente. No entanto, AuNS@FOL, AuNS@PLA e AuNS@FOL-PLA são inadequados para aplicações reais devido à sua baixa estabilidade em meio aquoso. AuNS@PEG-PLA, que esperamos ter um caráter Janus, apresentou incorporação celular significativa em ambos os períodos, mas o sistema não possui FOL para direcionamento direto. Portanto, AuNS@FOL-PEG-PLA parece ser o sistema mais promissor investigado no presente estudo.

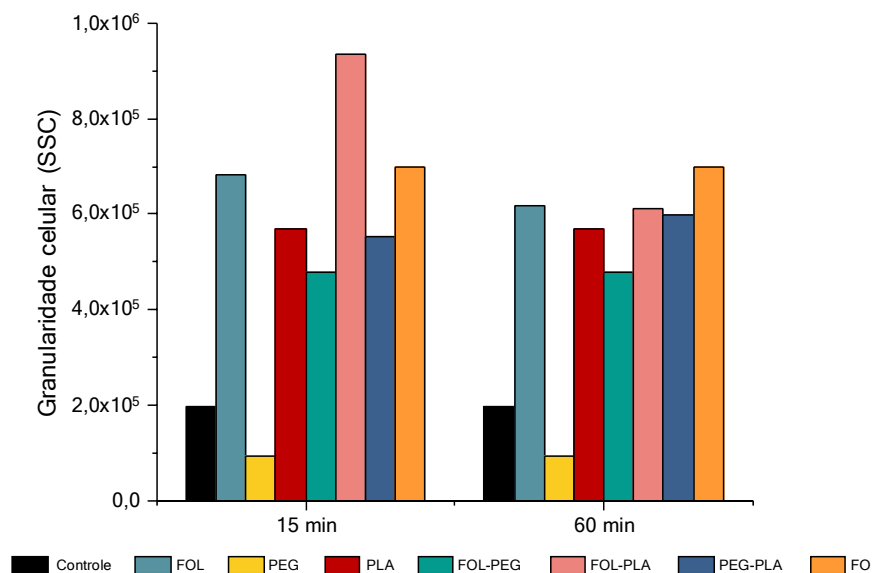


Figura 15 - Avaliação da captação celular de AuNS com diferentes tipos de funcionalização por medição da granularidade celular por citometria de fluxo. Células epiteliais renais LLC-MK2 tratadas com $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AuNS por (A) 30 e (B) 60 min.

A microscopia óptica de fluorescência mostrou a internalização de AuNS@FOL-PEG-PLA após 1, 24 e 48 h de tratamento (Figura 16A-F, setas), confirmando um acúmulo das nanopartículas triplamente funcionalizadas em função do tempo.

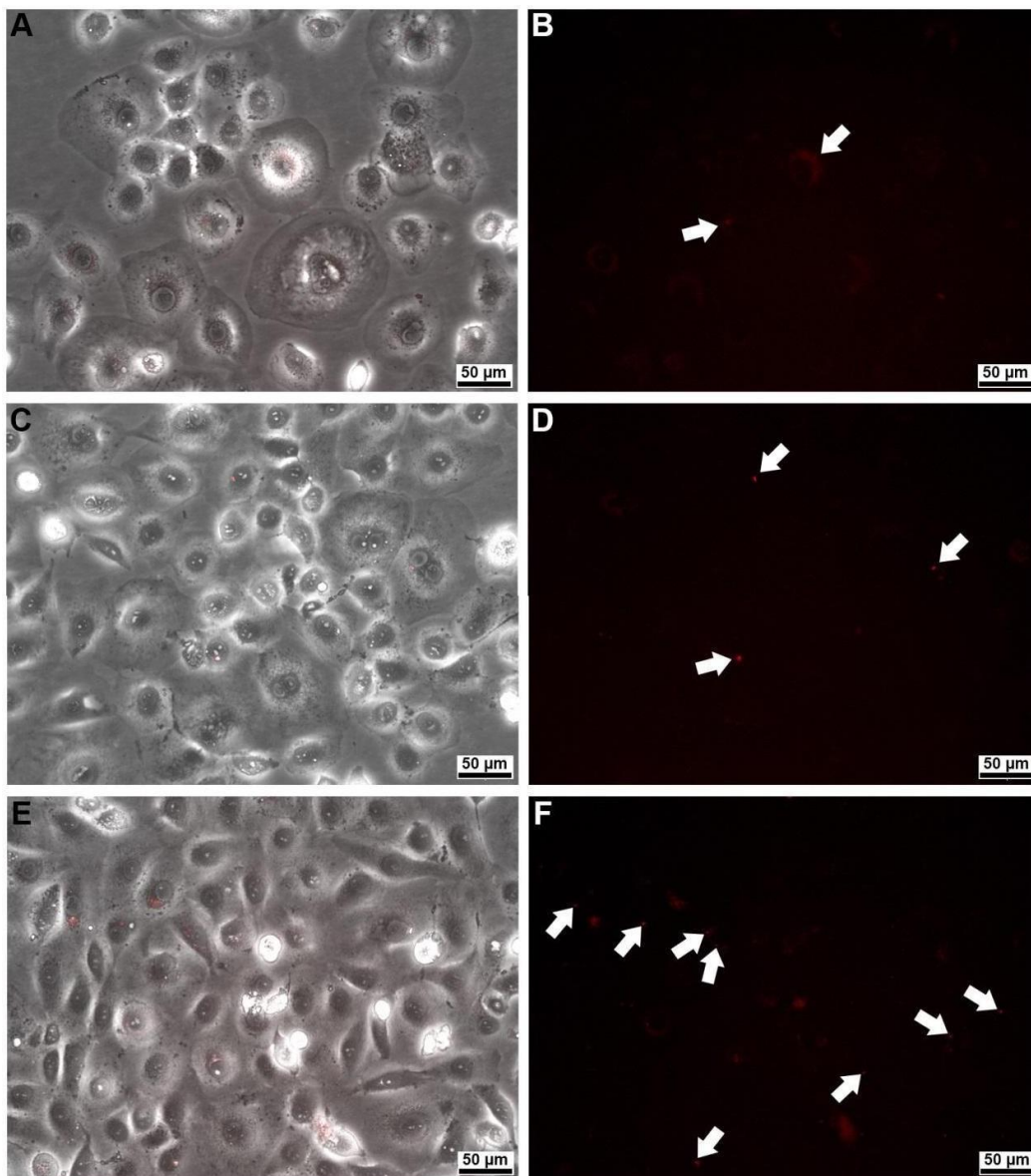


Figura 16 - Microscopia de fluorescência óptica de células epiteliais renais LLC-MK2 tratadas com $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AuNS@FOL-PEG-PLA. (A, C, E). O contraste de fase sobreposto com fluorescência possibilita observar uma marcação vermelha no interior de algumas células

4.4.3 Microscopia eletrônica de transmissão de varredura (STEM)

A microscopia eletrônica de varredura de transmissão confirma a presença de agregados com alta densidade eletrônica que correspondem a agregados de nanopartículas de ouro distribuídas aleatoriamente pelo citosol das células epiteliais LLC-MK2. Os agregados dentro das células confirmam a internalização de AuNS@FOL-PEG-PLA (Figura 17A-B, indicado por setas). Na Figura 17A, as nanopartículas estão presentes em estruturas delimitadas por membranas (Figura 17A, destaque), algumas conectadas com organelas como a mitocôndria e dispersas por todo o citosol (Figura 17A, indicado por setas). Na Figura 17B, as nanopartículas estão presentes no interior do retículo endoplasmático das células (Figura 17B, seta destacada) e no citosol (Figura 17B, setas). Em ambas as micrografias, os agregados tinham tamanhos diferentes, indicando que as nanopartículas estavam agregadas dentro das células.

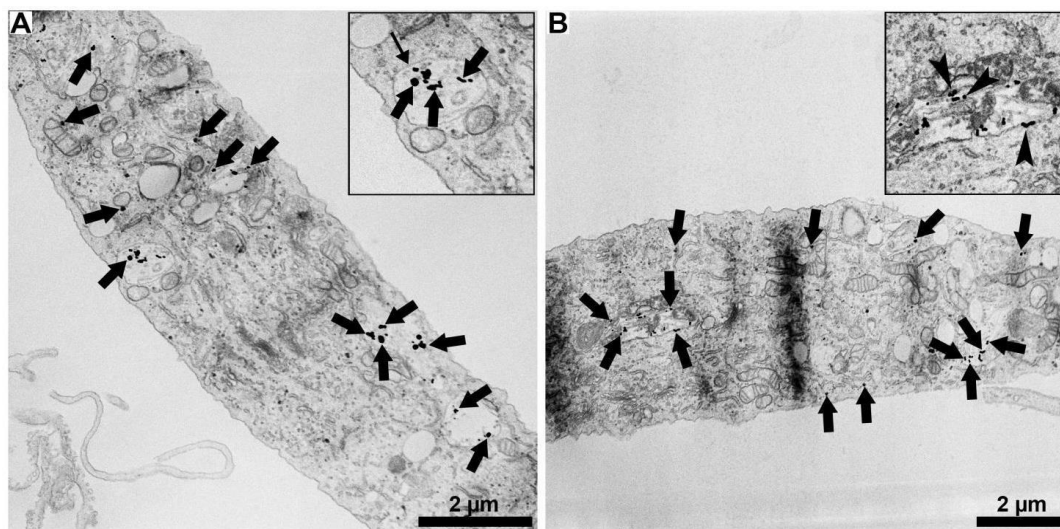


Figura 17 - Microscopia eletrônica de transmissão de varredura (STEM) de células epiteliais renais LLC-MK2 tratadas com $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de AuNS@FOL-PEG-PLA. (A) Observação da presença de NP distribuídas aleatoriamente pelo citosol celular (setas). Destaque mostrando uma maior ampliação de NP dentro de uma estrutura delimitada por membrana (setas). (B) Observação de NP

distribuídas por todo o citoplasma e em organelas que podem ser retículo endoplasmático (setas). Destaque mostrando maior aumento dos NP confirmando sua presença no interior do retículo endoplasmático (pontas de seta).

4.5 Conversão fototérmica

A eficiência das dispersões de AuNP com funcionalização tripla como transdutores fototérmicos foi medida através da sua capacidade de aumentar a temperatura ao ser incidida com radiação infravermelha. Considerando que exista um grande interesse do uso de tal radiação para o tratamento do câncer, os testes foram realizados no comprimento de onda de 829,1 nm e a variação de temperatura observada é mostrada na Figura 15. A variação máxima foi de 2,4 °C para AuNR@FOL-PEG-PLA após 700 s. Embora a banda de ressonância de plásmon de AuNS esteja na região do visível, AuNS@FOL-PEG-PLA também induziu uma variação de 1,9 °C, possivelmente devido ao acoplamento dentro dos agregados formados. Como as amostras produziram calor mesmo em baixa concentração ($[Au^0] = 100 \mu\text{g mL}^{-1}$), os resultados confirmam que tais nanopartículas possuem potencial para tratamento fototérmico, desde que sejam direcionadas e internalizadas seletivamente pelas células cancerígenas.

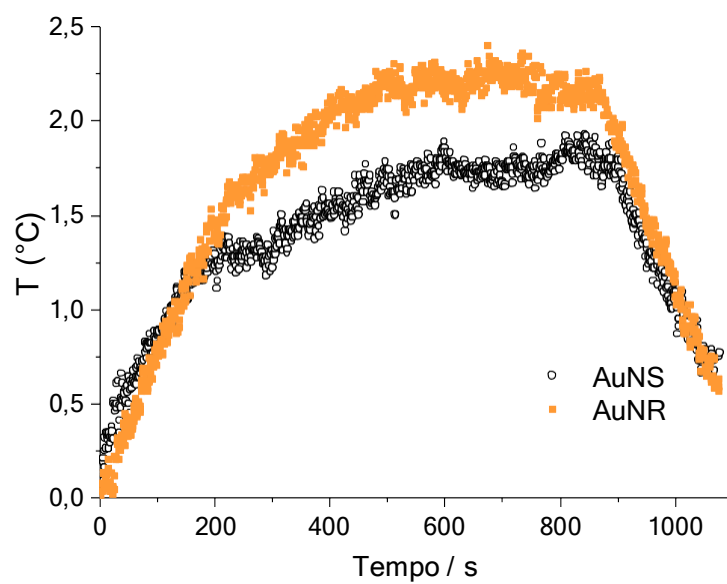


Figura 18 - Variação da temperatura em função do tempo de exposição para AuNP@FOL-PEG-PLA ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) irradiadas por laser de 829,1 nm.

5 Conclusão

A partir das descobertas deste estudo, podemos inferir que as nanoestruturas, quando submetidas a uma funcionalização estratégica, podem exibir propriedades físico-químicas controladas que podem ser aproveitadas para garantir um potencial para aplicações biomédicas. Foi evidenciado que o processo de funcionalização foi eficaz, e o método amplamente reconhecido para nanopartículas esféricas pôde ser estendido com sucesso a nanobastões, embora a conformação e o arranjo estrutural ainda não estejam completamente elucidados.

As propriedades de hidrofiliabilidade e hidrofobicidade do PEG e PLA, respectivamente, foram importantes para garantir a estabilidade no meio aquoso e a incorporação celular. Apesar do folato ser hidrofílico, após se ligar à superfície do ouro, seus grupos carboxilatos ficam comprometidos e ele não contribui para a estabilidade das nanopartículas em meio aquoso. No entanto, ele garante o potencial para direcionamento específico para células que super-expressam receptores de folato, como as células cancerígenas. Portanto, a funcionalização tripla forneceu as propriedades físico-químicas mais adequadas às nanopartículas de ouro, visando aplicações em terapias e diagnósticos, o que foi confirmado pela sua baixa toxicidade e alta incorporação celular. Esta funcionalização foi usada em nanopartículas de dois formatos diferentes: esferas e bastões. A comparação do resultado em aumento de temperatura após incidência com laser de infravermelho indicou que os nanobastões apresentam maior potencial como transdutores fototérmicos do que as nanoesferas.

Essas conclusões reforçam a perspectiva das nanoestruturas funcionalizadas como uma ferramenta promissora para avanços significativos em aplicações biomédicas, principalmente em teranóstica.

Como trabalhos futuros podemos sugerir:

- Novos parâmetros de funcionalização: polímeros com diferentes pesos moleculares, partículas de diferentes tamanhos, diferentes proporções entre ligantes etc.

- Caracterização da morfologia da camada polimérica a fim de elucidar o arranjo espacial dos ligantes nos nanobastões.

- Análise de direcionamento ativo específico em diferentes tipos de células.

6 Referências bibliográficas

- (1) Ling, Y.; Xia, Y. Gold Based Nanocomposites: Fabrication Strategies, Properties, and Tumor Theranostic Applications. *Wuli Huaxue Xuebao/ Acta Physico - Chimica Sinica* **2020**, 36 (9), 1–15. <https://doi.org/10.3866/PKU.WHXB201912006>.
- (2) Danhier, F.; Feron, O.; Préat, V. To Exploit the Tumor Microenvironment : Passive and Active Tumor Targeting of Nanocarriers for Anti-Cancer Drug Delivery. *Journal of Controlled Release* **2015**, 148 (2), 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.027>.
- (3) Samadian, H.; Hosseini-Nami, S.; Kamrava, S. K.; Ghaznavi, H.; Shakeri-Zadeh, A. Folate-Conjugated Gold Nanoparticle as a New Nanoplatfrom for Targeted Cancer Therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* **2016**, 142 (11), 2217–2229. <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2179-3>.
- (4) Maeda, H.; Nakamura, H.; Fang, J. The EPR Effect for Macromolecular Drug Delivery to Solid Tumors : Improvement of Tumor Uptake , Lowering of Systemic Toxicity , and Distinct Tumor Imaging in Vivo ☆ Kallikrein-Kinin Cascade. *Adv Drug Deliv Rev* **2013**, 65 (1), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.10.002>.
- (5) Maeda, H.; Sawa, T.; Konno, T. Mechanism of Tumor-Targeted Delivery of Macromolecular Drugs , Including the EPR Effect in Solid Tumor and Clinical Overview of the Prototype Polymeric Drug SMANCS q. *Journal of Controlled Release* **2001**, 74, 47–61. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(01\)00309-1](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(01)00309-1).
- (6) Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. **2007**, 751–760.
- (7) Ferrari, M. Cancer Nanotechnology: Opportunities and Challenges. *Nat Rev Cancer* **2005**, 5 (3), 161–171. <https://doi.org/10.1038/nrc1566>.
- (8) Zalba, S.; ten Hagen, T. L. M.; Burgui, C.; Garrido, M. J. Stealth Nanoparticles in Oncology: Facing the PEG Dilemma. *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V. November 1, 2022, pp 22–36. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.09.002>.
- (9) Oerlemans, C.; Bult, W.; Bos, M.; Storm, G.; Nijsen, J. . F. W.; Hennink, W. E. Polymeric Micelles in Anticancer Therapy : Targeting , Imaging and Triggered Release. *Pharm Res* **2010**, 27, 2569–2589. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0233-4>.
- (10) Oerlemans, C.; Bult, W.; Bos, M.; Storm, G.; Nijsen, J. . F. W.; Hennink, W. E. Polymeric Micelles in Anticancer Therapy : Targeting , Imaging and Triggered Release. *Pharm Res* **2010**, 27, 2569–2589. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0233-4>.
- (11) Danhier, F.; Feron, O.; Préat, V. To Exploit the Tumor Microenvironment : Passive and Active Tumor Targeting of Nanocarriers for Anti-Cancer Drug Delivery. *Journal of Controlled Release* **2015**, 148 (2), 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.027>.
- (12) Beddoes, C. M.; Case, C. P.; Briscoe, W. H. Understanding Nanoparticle Cellular Entry: A Physicochemical Perspective. *Adv Colloid Interface Sci* **2015**, 218, 48–68. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.01.007>.

- (13) Stranick, S. J.; Parikh, A. N.; Tao, Y.-T.; Allara, D. L.; Weiss, P. S. Phase Separation of Mixed-Composition Self-Assembled Monolayers into Nanometer Scale Molecular Domains. *J Phys Chem* **1994**, *98* (31), 7636–7646. <https://doi.org/10.1021/j100082a040>.
- (14) Pengo, P.; Şologan, M.; Pasquato, L.; Guida, F.; Pacor, S.; Tossi, A.; Stellacci, F.; Marson, D.; Boccardo, S.; Pricl, S.; Posocco, P. Gold Nanoparticles with Patterned Surface Monolayers for Nanomedicine : Current Perspectives. *Biophysics in Europe* **2017**, *46*, 749–771. <https://doi.org/10.1007/s00249-017-1250-6>.
- (15) Walther, A.; Müller, A. H. E. Janus Particles. *Soft Matter* **2008**, *4* (4), 663. <https://doi.org/10.1039/b718131k>.
- (16) Matter, S.; Lehn, R. C. Van; Alexander-katz, A. Penetration of Lipid Bilayers by Nanoparticles with Environmentally-Responsive Surfaces : Simulations and Theory. *Soft Matter* **2011**, *7*, 11392–11404. <https://doi.org/10.1039/c1sm06405c>.
- (17) Gao, Y.; Yu, Y. How Half-Coated Janus Particles Enter Cells. *J Am Chem Soc* **2013**, *135* (51), 19091–19094. <https://doi.org/10.1021/ja410687z>.
- (18) Gao, Y.; Yu, Y. Macrophage Uptake of Janus Particles Depends upon Janus Balance. *Langmuir* **2015**, *31* (9), 2833–2838. <https://doi.org/10.1021/la504668c>.
- (19) Percebom, A. M.; Giner-Casares, J. J.; Claes, N.; Bals, S.; Loh, W.; Liz-Marzán, L. M. Janus Gold Nanoparticles Obtained via Spontaneous Binary Polymer Shell Segregation. *Chemical Communications* **2016**, *52* (23), 4278–4281. <https://doi.org/10.1039/c5cc10454h>.
- (20) Sperling, L. H. *Introduction To Physical Polymer*, 4th ed.; John Wiley: New Jersey, 2006.
- (21) Percebom, A. M.; Costa, L. H. M. Formation and Assembly of Amphiphilic Janus Nanoparticles Promoted by Polymer Interactions. *Adv Colloid Interface Sci* **2019**, *269*, 256–269. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.05.001>.
- (22) Beik, J.; Khateri, M.; Khosravi, Z.; Kamrava, S. K.; Kooranifar, S.; Ghaznavi, H.; Shakeri-zadeh, A. Gold Nanoparticles in Combinatorial Cancer Therapy Strategies. *Coord Chem Rev* **2019**, *387* (4), 299–324. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.02.025>.
- (23) Alkilany, A. M.; Lohse, S. E.; Murphy, C. J. The Gold Standard : Gold Nanoparticle Libraries To Understand the Nano À Bio Interface. *Acc Chem Res* **2012**, *46*, 650–661. <https://doi.org/10.1021/ar300015b>.
- (24) Dreaden, E. C.; Alkilany, A. M.; Huang, X.; Murphy, C. J.; El-Sayed, and Mostafa. The Golden Age: Gold Nanoparticles for Biomedicinew. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7). <https://doi.org/10.1039/c1cs15237h>.
- (25) Li, N.; Zhao, P.; Astruc, D. Anisotropic Gold Nanoparticles : Synthesis , Properties , Applications , and Toxicity Angewandte. *Angewandte Chemie International Edition* **2014**, *53* (7), 1756–1789. <https://doi.org/10.1002/anie.201300441>.
- (26) Bastús, N. G.; Comenge, J.; Puntès, V. Kinetically Controlled Seeded Growth Synthesis of Citrate-Stabilized Gold Nanoparticles of up to 200 Nm: Size Focusing versus Ostwald Ripening. *Langmuir* **2011**, *27* (17), 11098–11105. <https://doi.org/10.1021/la201938u>.

- (27) Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss Faraday Soc* **1951**, *11* (c), 55. <https://doi.org/10.1039/df9511100055>.
- (28) Kimling, J.; Maier, M.; Okenve, B.; Kotaidis, V.; Ballot, H.; Plech, A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J Phys Chem B* **2006**, *110* (32), 15700–15707. <https://doi.org/10.1021/jp061667w>.
- (29) Breßler, I.; Kohlbrecher, J.; Thünemann, A. F. SASfit : A Tool for Small-Angle Scattering Data Analysis Using a Library of Analytical Expressions. *J Appl Crystallogr* **2015**, *48* (5), 1587–1598. <https://doi.org/10.1107/S1600576715016544>.
- (30) Eustis, S.; El-Sayed, M. A. Why Gold Nanoparticles Are More Precious than Pretty Gold: Noble Metal Surface Plasmon Resonance and Its Enhancement of the Radiative and Nonradiative Properties of Nanocrystals of Different Shapes. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35* (3), 209–217. <https://doi.org/10.1039/B514191E>.
- (31) Liz-Marzán, L. M. Nanometals: Formation and Color. *Materials Today* **2004**, *7* (2), 26–31. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00080-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00080-X).
- (32) Liz-Marzán, L. M. Nanometals: Formation and Color. *Materials Today* **2004**, *7* (2), 26–31. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(04\)00080-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(04)00080-X).
- (33) Sardar, R.; Funston, A. M.; Mulvaney, P.; Murray, R. W. Gold Nanoparticles: Past, Present, and Future †. *Langmuir* **2009**, *25* (24), 13840–13851. <https://doi.org/10.1021/la9019475>.
- (34) Thurn, K. ; Brown, E. M. B.; Wu, A.; Vogt, S.; Paunesku, T.; Woloschak, G.; Jo, B. L. Nanoparticles for Applications in Cellular Imaging. *Nanoscale Res Lett* **2007**, *2*, 430–441. <https://doi.org/10.1007/s11671-007-9081-5>.
- (35) Huang, X.; El-sayed, I.; Qian, W.; El-sayed, M. A. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *J Am Chem Soc* **2006**, *128* (3), 2115–2120. <https://doi.org/10.1021/ja057254a>.
- (36) Tong, L.; Wei, Q.; Wei, A.; Cheng, J. Gold Nanorods as Contrast Agents for Biological Imaging : Optical Properties , Surface Conjugation and Photothermal Effects. *Photochem Photobiol* **2009**, *85*, 21–32. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00507.x>.
- (37) Pensa, E.; Corte, E.; Fonticelli, M. H.; Benítez, G.; Rubert, A.; Salvarezza, R. C. The Chemistry of the Sulfur À Gold Interface : In Search of a Unified Model. *Acc Chem Res* **2012**, *45* (8), 1183–1192. <https://doi.org/10.1021/ar200260p>.
- (38) Karakoti, A. S.; Das, S.; Thevuthasan, S.; Seal, S. Minireviews PEGylated Inorganic Nanoparticles. *Inorganic Nanoparticles* **2011**, *50* (9), 1980–1994. <https://doi.org/10.1002/anie.201002969>.
- (39) Donald E. Owens III a, N. A. P. a. Opsonization, Biodistribution, and Pharmacokinetics of Polymeric Nanoparticles. *International journal of Phamaceutics* **2006**, *307* (1), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.010>.
- (40) Liu, Y.; Shipton, M. K.; Ryan, J.; Kaufman, E. D.; Franzen, S.; Feldheim, D. L. Synthesis , Stability , and Cellular Internalization of Gold Nanoparticles Containing Mixed Peptide -

- Poly (Ethylene Glycol) Monolayers. *Anal Chem* **2007**, 79 (6), 2221–2229.
<https://doi.org/10.1021/ac061578f>.
- (41) Leopold, L. F.; Tódor, I. S.; Diaconeasa, Z.; Rugină, D.; Ștefancu, A.; Leopold, N.; Cristina Coman. Assessment of PEG and BSA-PEG Gold Nanoparticles Cellular Interaction. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **2017**, 532 (5), 70–76.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.06.061>.
 - (42) Reznickova, A.; Slavikova, N.; Kolska, Z.; Kolarova, K.; Belinova, T.; Kalbacova, M. H.; Cieslar, M.; Svorcik, V. PEGylated Gold Nanoparticles: Stability, Cytotoxicity and Antibacterial Activity. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **2018**, 560 (5), 26–34.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.09.083>.
 - (43) Elsayy, M. A.; Kim, K.; Park, J.; Deep, A. Hydrolytic Degradation of Polylactic Acid (PLA) and Its Composites. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2017**, 79 (May), 1346–1352. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.143>.
 - (44) Tyler, B.; Gullotti, D.; Mangraviti, A.; Utsuki, T.; Brem, H. Polylactic Acid (PLA) Controlled Delivery Carriers for Biomedical Applications ☆. *Adv Drug Deliv Rev* **2016**, 107, 163–175. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.018>.
 - (45) Tyler, B.; Gullotti, D.; Mangraviti, A.; Utsuki, T.; Brem, H. Polylactic Acid (PLA) Controlled Delivery Carriers for Biomedical Applications ☆. *Adv Drug Deliv Rev* **2016**, 107, 163–175. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.018>.
 - (46) Journal, A. I.; Liang, H.; Friedman, J. M.; Nacharaju, P. Fabrication of Biodegradable PEG – PLA Nanospheres for Solubility , Stabilization , and Delivery of Curcumin. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology An International Journal* **2016**, 1401, 297–304.
<https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1146736>.
 - (47) Vroman, I.; Tighzert, L. Biodegradable Polymers. *Materials* **2009**, 2 (2), 307–344.
<https://doi.org/10.3390/ma2020307>.
 - (48) Qiu, H.; Rieger, J.; Gilbert, B.; Je, R.; Je, C. PLA-Coated Gold Nanoparticles for the Labeling of PLA Biocarriers. **2004**, No. 10, 850–856.
 - (49) Abstiens, K.; Fleischmann, D.; Gregoritz, M.; Goepferich, A. M.; Accepted, J. Gold-Tagged Polymeric Nanoparticles with Spatially-Controlled Composition for Enhanced Detectability in Biological Environments. *ACS Appl Nano Mater* **2019**, 2 (2), 917–926.
<https://doi.org/10.1021/acsanm.8b02165>.
 - (50) Alberts, B. *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed.; 2017.
 - (51) Kamen, B. A.; Capdevila, A. Receptor-Mediated Folate Accumulation Is Regulated by the Cellular Folate Content. **1986**, 83 (16), 5983–5987.
<https://doi.org/10.1073/pnas.83.16.5983>.
 - (52) Chou, L. Y. T.; Ming, K.; Chan, W. C. W. Strategies for the Intracellular Delivery of Nanoparticles. *Chem Soc Rev* **2011**, 40 (1), 233–245.
<https://doi.org/10.1039/c0cs00003e>.
 - (53) Samadian, H.; Hosseini-Nami, S.; Kamrava, S. K.; Ghaznavi, H.; Shakeri-Zadeh, A. Folate-Conjugated Gold Nanoparticle as a New Nanoplatfrom for Targeted Cancer Therapy. *J*

Cancer Res Clin Oncol **2016**, *142* (11), 2217–2229. <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2179-3>.

- (54) Shakeri-Zadeh, A.; Ghasemifard, M.; Ali Mansoori, G. Structural and Optical Characterization of Folate-Conjugated Gold-Nanoparticles. *Physica E Low Dimens Syst Nanostruct* **2010**, *42* (5), 1272–1280. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2009.10.039>.
- (55) Rathinaraj, P.; Lee, K.; Park, S. Y.; Kang, I. K. Targeted Images of KB Cells Using Folate-Conjugated Gold Nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* **2015**, *10* (1). <https://doi.org/10.1186/s11671-014-0725-y>.
- (56) Devendiran, R. M.; Chinnaiyan, S. kumar; Yadav, N. K.; Moorthy, G. K.; Ramanathan, G.; Singaravelu, S.; Sivagnanam, U. T.; Perumal, P. T. Green Synthesis of Folic Acid-Conjugated Gold Nanoparticles with Pectin as Reducing/Stabilizing Agent for Cancer Theranostics†. *RSC Adv* **2016**, *6* (35), 29757–29768. <https://doi.org/10.1039/c6ra01698g>.
- (57) Castillo, J.; Bertel, L.; Páez-Mozo, E.; Martínez, F. Photochemical Synthesis of the Bioconjugate Folic Acid-Gold Nanoparticles. *Nanomaterials and Nanotechnology* **2013**, *3*, 18. <https://doi.org/10.5772/57144>.
- (58) Bhattacharya, R.; Patra, C. R.; Earl, A.; Wang, S.; Katarya, A.; Lu, L.; Kizhakkedathu, J. N.; Yaszemski, M. J.; Greipp, P. R.; Mukhopadhyay, D.; Mukherjee, P. Attaching Folic Acid on Gold Nanoparticles Using Noncovalent Interaction via Different Polyethylene Glycol Backbones and Targeting of Cancer Cells. *Nanomedicine* **2007**, *3* (3), 224–238. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2007.07.001>.
- (59) Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chemistry of Materials* **2003**, *15* (10), 1957–1962. <https://doi.org/10.1021/cm020732l>.
- (60) Leonov, A. P.; Zheng, J.; Clogston, J. D.; Stern, S. T.; Patri, A. K.; Wei, A. Detoxification of Gold Nanorods by Treatment with Polystyrenesulfonate. *ACS Nano* **2008**, *2* (12), 2481–2488. <https://doi.org/10.1021/nn800466c>.
- (61) Mehtala, J. G.; Zemlyanov, D. Y.; Max, J. P.; Kadasala, N.; Zhao, S.; Wei, A. Citrate-Stabilized Gold Nanorods. *Langmuir* **2014**, *30* (46), 13727–13730. <https://doi.org/10.1021/la5029542>.
- (62) Rodríguez-Fernández, J.; Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L. M.; Lang, P. R. Dynamic Light Scattering of Short Au Rods with Low Aspect Ratios. *The Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111* (13), 5020–5025. <https://doi.org/10.1021/jp067049x>.
- (63) Rodríguez-Fernández, J.; Pérez-Juste, J.; Liz-Marzán, L. M.; Lang, P. R. Dynamic Light Scattering of Short Au Rods with Low Aspect Ratios. *Journal of Physical Chemistry C* **2007**, *111* (13), 5020–5025. <https://doi.org/10.1021/jp067049x>.