

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

ISABELA RODRIGUES ANJONA

**ESTUDO DO EFEITO ANTINEOPLÁSICO DE NANOCRISTAIS DE ÓXIDO DE
ZINCO DOPADOS COM EURÓPIO**

UBERLÂNDIA
JULHO DE 2018

ISABELA RODRIGUES ANJONA

**ESTUDO DO EFEITO ANTINEOPLÁSICO DE NANOCRISTAIS DE ÓXIDO DE
ZINCO DOPADOS COM EURÓPIO**

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia da Universidade
Federal de Uberlândia para obtenção do grau
de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edgar Silveira Campos
Coorientador: MSc. Cristiane Angélico
Duarte

UBERLÂNDIA
JULHO DE 2018

ISABELA RODRIGUES ANJONA

Estudo do efeito antineoplásico de nanocristais de óxido de zinco dopados com európio

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Banca de avaliação:

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos - UFU
Orientador

Profa. Dra. Natássia Caroline Resende Corrêa - UFU
Membro

Profa. Dra. Anielle Christine Almeida Silva - UFAL
Membro

Uberlândia (MG), 02 de julho de 2018

AGRADECIMENTO

Ao Dr. Noelio Oliveira Dantas e à Dra. Anielle Christine Almeida Silva que contribuíram imensamente para minha formação profissional e pessoal. Obrigada pela paciência, dedicação e confiança ao longo de todos esses anos.

À MSc. Cristiane Angélico Duarte pelos ensinamentos durante a realização deste trabalho, com momentos de risadas que tornaram tudo mais leve.

Aos professores do Curso de Biotecnologia que contribuíram com a minha formação acadêmica. Em especial ao Dr. Jean Venato Santos, Dra. Mariana Mieko Odashima, Dr. Diego Merigue da Cunha, Dr. Nilson Nicolau Júnior e Dr. Carlos Ueira Vieira pelo grande incentivo e encorajamento.

Ao Dr. Rone Cardoso que, nos bastidores da vida, me deu encantadoras doses de incentivo.

À Tatiana Lara Perini Amâncio por esses quatro anos de amparo excepcional. Sua dedicação e cuidado fizeram toda a diferença.

Ao Luiz Ricardo Goulart Filho, Vivian Alonso Goulart e Natássia Caroline Resende Corrêa, do Laboratório de Nanobiotecnologia, por proporcionarem as condições necessárias para a realização deste trabalho.

Ao Antônio por iluminar minha vida nos momentos mais sombrios e por me mostrar a beleza do amor nos detalhes do dia a dia. Sem você nenhuma conquista valeria a pena.

Aos meus pais Marcelo e Eloise e irmã Natalia que me mostraram o caminho da honestidade e persistência.

Aos meus padrinhos, Sérgio e Ivanilda, que me inspiram a fazer o melhor que puder em todas as situações.

Ao Rafael, meu primo, pelo seu apoio, compreensão, carinho e por acreditar em mim.

Aos meus avós, Antônio Carlos e Maria Aparecida, pelo incentivo mesmo que à distância e a toda minha família que torceu por mim e entendeu minha ausência.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram a chegar até aqui meu muito obrigada!

RESUMO

O câncer de mama, de acordo com o INCA, é o tumor maligno mais frequente entre as mulheres, excluindo-se os cânceres de pele não melanoma. Como o tratamento convencional é falho, em vários dos casos, outras ferramentas estão sendo estudadas para o desenvolvimento de novas drogas. A nanotecnologia tem sido explorada em busca de substâncias que sejam mais tecido-específicas e eficientes para o tratamento de cânceres. Diante disso, este trabalho visou sintetizar, caracterizar e investigar o efeito antineoplásico de nanocristais de óxido de zinco dopados com diferentes concentrações de európio. A caracterização física foi feita pelas técnicas de absorção óptica, fotoluminescência, difração de raios-X e espectroscopia Raman. O efeito citotóxico dos nanocristais foi testado na linhagem celular de câncer de mama, BT-549, por meio de teste com iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo. Todas as amostras dopadas apresentaram significância na morte celular em relação ao controle, sendo a melhor delas os NCs de 20 wt% de európio em relação ao zinco. Esse resultado mostra que há um potencial antineoplásico nessas substâncias, podendo ser promissoras para tratamentos futuros.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Nanocristais. Óxido de Zinco. Európio. Câncer.

LISTA DE ABREVIATURAS

AO - Absorção óptica

BSA - Albumina

DRX - Difração de raios-X

Eu - Európio

Eu₂O₃ - Óxido de európio

FDA - Food and drug administration

IP - Iodeto de propídeo

LNMIS - Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores

NANOS - Laboratório de Nanobiotecnologia

NC - Nanocristal

NP - Nanopartícula

PL - Fotoluminescência

RAMAN - Espectroscopia Raman

SFB - Soro fetal bovino

UFU - Universidade Federal de Uberlândia

ZnO - Óxido de zinco

ZnOxEu - Óxido de zinco dopado com európio em distintas concentrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Tumor benigno e maligno.....	8
Figura 2: Uma questão de escala.....	10
Figura 3: Desintegrador ultra-sônico.....	14
Figura 4: BT-549 com 70% de confluência em zoom de 4x.....	15
Figura 5: BT-549 com 70% de confluência em zoom de 2x.....	16
Figura 6: Citômetro Accuri C6.....	17
Figura 7: Gráfico representativo tamanho por granulosidade	17
Figura 8: Gráfico representativo da área por altura.....	18
Figura 9: Histograma representativo	18
Figura 10: Espectros de absorção óptica de nanocristais de ZnO puro e dopados com Eu a temperatura ambiente	19
Figura 11: Espectros de luminescência de nanocristais de ZnO puro e dopados com Eu a temperatura ambiente	20
Figura 12: (a) difratogramas DRX de nanocristais de ZnO puro e dopados com Eu a temperatura ambiente. (b) ampliação do espectro de 40-55o.....	21
Figura 13: (a) espectros Raman de nanocristais de ZnO puro e dopados com Eu a temperatura ambiente. (b) ampliação do espectro de 1250 a 1600 cm-1	22
Figura 14: Significância do controle	23
Figura 15: Significância do 20Eu.....	23
Figura 16: Significância do Eu ₂ O ₃	24

SUMÁRIO

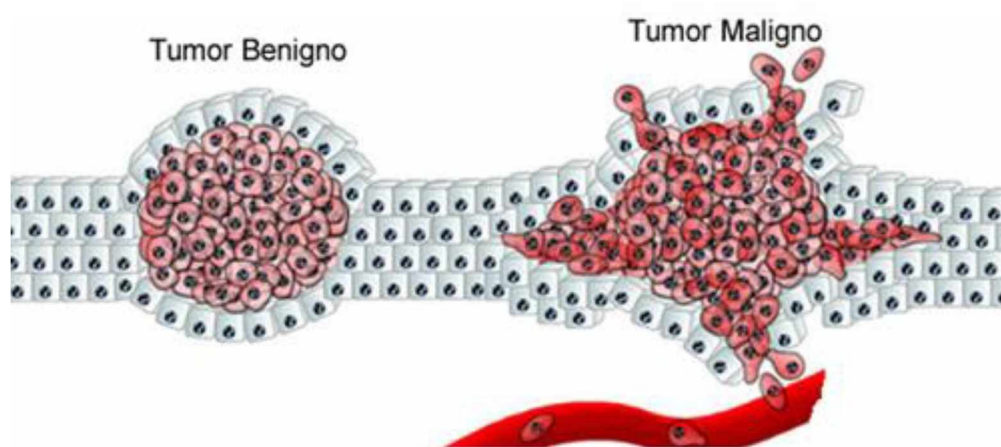
1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Câncer	8
1.2. Nanotecnologia	9
1.3. Nanotecnologia aplicada às terapias antineoplásicas	10
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo geral	12
2.2. Objetivos específicos	12
3. METODOLOGIA	13
3.1. Técnicas de caracterização	13
3.1.1. Absorção óptica	13
3.1.2. Fotoluminescência	13
3.1.3. Difração de raios-X	13
3.1.4. Espectroscopia Raman	14
3.1.5. Preparo dos nanocristais para os ensaios biológicos	14
3.2. Testes biológicos	15
3.2.1. Cultura celular	15
3.2.2. Avaliação de ciclo celular e apoptose por marcação com iodeto de propídeo	16
3.2.3. Citometria de fluxo	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1. Técnicas de caracterização	19
4.2. Testes biológicos	22
5. CONCLUSÃO	25
6. PERSPECTIVAS	26
REFERÊNCIAS	27

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer

Câncer é um termo genérico que faz referência a um conjunto de mais de 100 doenças, todas tendo em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos. As neoplasias malignas são caracterizadas por ter tendência a ser muito agressivo e incontrolável, enquanto um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo risco para a vida da pessoa (Figura 1) (INCA, 2016). O câncer pode afetar quase qualquer parte do corpo e tem muitos subtipos, havendo variedade também na velocidade de multiplicação das células e na capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (metástase) (WHO, 2018).

Figura 1: Tumor benigno e maligno



Fonte: NIEMIES, 2016.

A estimativa mundial mostra que em 2012 ocorreram 14,1 milhões de casos novos de câncer e 8,2 milhões de óbitos. Os tipos de câncer mais incidentes no mundo foram pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão) (FERLAY et al., 2013). Estima-se para o Brasil, biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer para cada ano (INCA, 2016).

Em termos globais, excluindo-se os cânceres de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais frequente e comum tumor maligno entre as mulheres, com uma estimativa, para o ano de 2012, de 1,67 milhão de casos novos diagnosticados o que corresponde a 25,2% de todos os tumores malignos femininos (INCA, 2018). Só no Brasil, no ano de 2015, foram

57.120 novos casos registrados (INCA, 2015), sendo que são estimados outros 59.700 para cada ano do biênio 2018-2019, apresentando um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres (WHO, 2018).

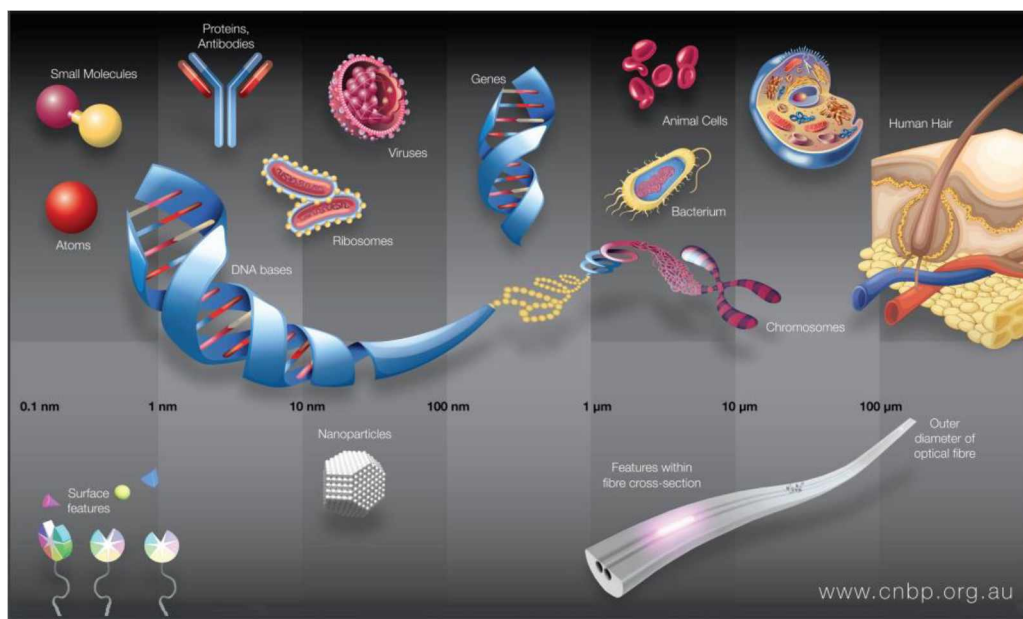
São muitos os fatores envolvidos na etiologia do câncer de mama, como idade da primeira menstruação menor do que 12 anos; menopausa após os 55 anos; nuliparidade; primeira gravidez após os 30 anos; uso de alguns anticoncepcionais e terapia de reposição hormonal na menopausa, especialmente se por tempo prolongado; exposição à radiação ionizante; consumo de bebidas alcoólicas; dietas hipercalóricas; sedentarismo; e predisposição genética (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017a); (INCA, 2017b); (STEWART; WILD, 2014).

O tratamento convencional, com quimioterapia, tem sido ineficiente em vários casos, falhando na produção de uma completa resposta anticâncer. A maior causa disso é a incapacidade de diferenciar, de forma eficaz, células cancerígenas e não cancerígenas, o que pode causar danos aos tecidos normais do corpo. Em acréscimo, é exigida a administração do fármaco em grandes e repetidas doses devido à eliminação rápida ou difusão generalizada da substância anticancerosa entre tecidos não-alvos, o que agrava os problemas relacionados à toxicidade não específica do quimioterápico (DRUMMOND et al., 1999). Esses fatores, além de influenciarem na eficiência do tratamento, levam a menor adesão à terapia (AL-HAJJ et al, 2003).

1.2. Nanotecnologia

A nanotecnologia é um conjunto de técnicas que possibilitam trabalhar a níveis atômicos, moleculares e supramoleculares, sendo definida como a manipulação da escala nanométrica (1-100 nm), conforme a Figura 2 (NEL et al., 2006).

Figura 2: Uma questão de escala



Fonte: Nanoscale BioPhotonics ARC Centre of Excellence.

Mencionada pela primeira vez em 1959 pelo físico Feynman em uma palestra realizada para a Sociedade Americana de Física, intitulada “Há muito espaço lá embaixo” (TOUMEY, 2009), a nanotecnologia é uma ferramenta que permite criar novos sistemas biológicos (RASMUSSEN et al, 2010) (ROCO, 2003). Isso se dá porque, quando o tamanho da partícula é reduzido à escala nanométrica, a razão superfície volume aumenta e aparecem novas e interessantes propriedades físicas e vantagens biológicas (ALATA, 2004) (CAVALCANTE, 2014). Assim, as características físico-químicas únicas dos nanomateriais tornam possível o desenvolvimento de dispositivos biodegradáveis, biocompatíveis e funcionalizados para aplicação na biomedicina (ZHANG et al, 2013).

1.3. Nanotecnologia aplicada às terapias antineoplásicas

Baseado na necessidade de desenvolvimento de novos fármacos anticancerosos, com novos mecanismos de ação e que sejam mais tecido-específicos, a nanotecnologia tem sido explorada (ROCO, 2003).

O ZnO é um dos cinco compostos de zinco listado como seguro pelo FDA, órgão de Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (PREMANATHAN et al, 2011). Devido às suas potenciais aplicações biológicas, os nanocristais de óxido de zinco têm recebido crescente atenção. Estudos recentes mostraram que estes apresentam alto grau de seletividade para células de câncer, podendo ultrapassar os índices de alguns agentes

quimioterapêuticos (RASMUSSEN et al., 2010). Essa capacidade de destruição seletiva de células tumorais e seu potencial para desenvolvimento de agentes anticancerígenos (MISHRA et al., 2011) fazem parte da base teórica para desenvolvimento deste projeto.

O elemento Európio (Eu), com número atômico 63, foi descoberto por Paul Émile Lecop de Boisbaudran em 1880. As propriedades ópticas do íon Európio são amplamente estudadas e empregadas como em luminóforos e tem sido um dopante preferido para intensificar a emissão vermelha em imagiologia celular (BEAUREPAIRE, E., et al., 2004). O íon Európio apresenta alta luminescência na região vermelha (ONO, 1995).

A possibilidade da utilização de nanocristais para futuro tratamento de câncer depende da biocompatibilidade destes com as células normais do corpo e sua ação nas células tumorais. Neste trabalho, sintetizamos, caracterizamos e investigamos o efeito antineoplásico de NCs de óxido de zinco dopados com diferentes concentrações de európio.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Sintetizar, caracterizar e investigar o efeito antineoplásico de nanocristais de óxido de zinco dopados com diferentes concentrações de európio.

2.2. Objetivos específicos

- Sintetizar os nanocristais puros e dopados via coprecipitação;
- Caracterizar os nanocristais de ZnOxEu por AO;
- Caracterizar os nanocristais de ZnOxEu por PL;
- Caracterizar os nanocristais de ZnOxEu por DRX;
- Caracterizar os nanocristais de ZnOxEu por RAMAN;
- Estudar o efeito citotóxico dos NCs de ZnOxEu na linhagem BT-549 de câncer de mama.

3. METODOLOGIA

Os nanocristais de ZnO puros e dopados com Eu foram sintetizados no LNMIS, do Instituto de Física da UFU, via método de coprecipitação, assim como os de óxido de európio. As concentrações de dopagens de Eu utilizadas foram de 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 e 20.0 wt% em relação ao zinco.

3.1. Técnicas de caracterização

Os espectros de AO foram obtidos utilizando um espectrômetro UV-VIS-NIR localizado no LNMIS. Os espectros de RAMAN e luminescência foram obtidos utilizando um espectrômetro LabRam, localizado no laboratório Multiusuário do Instituto de Física da UFU, com o modo raman com linha de excitação de 532 nm e modo de luminescência com linha de excitação de 325 nm. Os difratogramas de raios-X foram obtidos utilizando um difratômetro XRD- 6000, localizado no laboratório Multiusuário do Instituto de Química.

3.1.1. Absorção óptica

Nos espectros de absorção óptica é possível verificar o range de absorção cinética de crescimento e distribuição de tamanhos dos nanocristais. Além disso, com base nesses espectros é possível acompanhar as absorções dos íons dopantes nos nanocristais (DANTAS, 2008b).

3.1.2. Fotoluminescência

Nos espectros de PL observa-se tanto a luminescência dos NCs de ZnO quanto dos íons dopantes (Eu), além de vários outros mecanismos envolvidos nos processos radiativos (SILVA et al., 2014).

3.1.3. Difração de raios-X

Nos difratogramas de raios-X é possível avaliar a cristalinidade, tipo de cristais e distorção na rede cristalina devido a dopantes (SILVA, 2014).

3.1.4. Espectroscopia Raman

A Espectroscopia Raman é utilizada para investigar os modos vibracionais, identificando o tipo de nanocristal formado e os efeitos causados na rede cristalina devido a dopantes (DANTAS, 2008a).

3.1.5. Preparo dos nanocristais para os ensaios biológicos

Foi preparada uma solução estoque de nanocristais em água ultrapura, a uma concentração de 10 mg/mL. Após esse procedimento, um desintegrador ultra-sônico (Hielscher) (Figura 3) equipado com uma ponta de 19 mm de Ti (titânio) foi usado para dispersar os NCs. A sonicação foi então realizada a 32 W de potência acústica durante 10 minutos e com amplitude de 50%. O preparo dos NCS em meio de cultura de células (RPMI [Cultilab] suplementado com SFB a 10%, gentamicina 0,1% e insulina 0,01%, pH 7) foi realizado por diluição da solução estoque na concentração de 100 µg/mL. Devido ao aumento da agregação de NCs em meio de cultura, BSA foi utilizada como agente estabilizador (JI, et al., 2010) (TAUROZZI; HACKLEY; WIESNER, 2013).

Figura 3: Desintegrador ultra-sônico



Fonte: ANJONA, 2018.

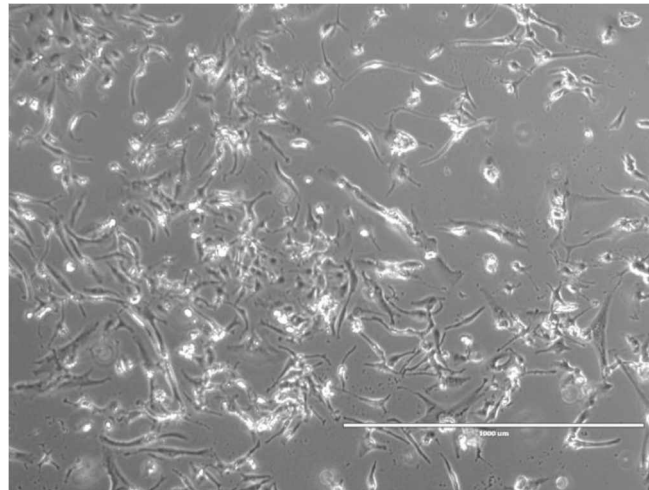
3.2. Testes biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados no NANOS, localizado no Instituto de Biotecnologia da UFU, coordenado pelo prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart. A linhagem BT-549 de câncer de mama foi utilizada.

3.2.1. Cultura celular

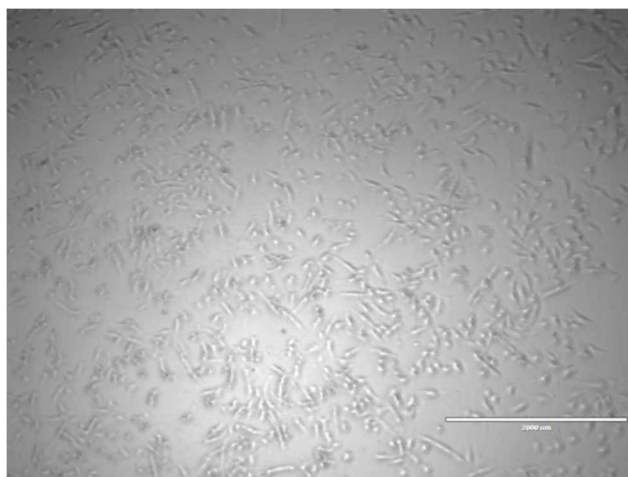
As células BT-549, provenientes do Sweeney Laboratory Research III UC Davis Medical Center, foram cultivadas (de acordo com as boas práticas de cultura celular) em meio RPMI suplementado com 10% de SFB, 0,01% de insulina e 0,1% de gentamicina. Foram cultivadas em garrafas de 75 cm² e mantidas a 37°C, 5% de CO₂ até confluência de 70%.

Figura 4: BT-549 com 70% de confluência em zoom de 4x



Fonte: ANJONA, 2018.

Figura 5: BT-549 com 70% de confluência em zoom de 2x



Fonte: ANJONA, 2018.

3.2.2. Avaliação de ciclo celular e apoptose por marcação com iodeto de propídeo

A utilização de IP foi feita para detectar a ocorrência do processo de apoptose nas células estudadas, na presença de nanocristais de ZnO dopados com diferentes concentrações de Eu. O teste foi feito na linhagem celular BT-549.

O método utilizado emprega IP para coloração nuclear. Essa molécula é usada para distinguir células viáveis das não viáveis, visto que células mortas ou com a membrana danificada permitem a penetração dela, enquanto as viáveis não (KOOPMAN; REUTELINGSPERGER; KUIJTEN, 1994) (RICCARDI; NICOLETT, 2006).

Para a avaliação com IP foram utilizadas seis placas de seis poços, cada um contendo $3,5 \times 10^4$ células. Após 24h de incubação foram adicionados os diferentes tratamentos, sendo eles: ZnO, 0.1Eu, 0.5Eu, 1.0Eu, 5.0Eu, 10.0Eu, 20.0Eu e Eu_2O_3 . O experimento, feito em triplicata utilizou a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ de cada NC. Foi utilizado um controle negativo (todas as células vivas) para comparação dos resultados.

Após 24h de tratamento das células com os NCs, as mesmas foram tripsinizadas e colocadas em tubos de polipropileno e marcadas com IP (5 μL por tubo) na concentração de 1 mg/mL . Em seguida as amostras foram levadas para análise no citômetro.

3.2.3. Citometria de fluxo

Os ensaios de viabilidade foram realizados em citômetro de fluxo modelo Accuri C6, através do programa CFlow Plus (Figura 6), no qual foram analisadas as células de acordo com seu volume e granulicidade usando detecção de até 20.000 eventos.

As análises estatísticas foram feitas pelo programa GraphPad Prism - versão 5.0, pelo método one-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0.05$.

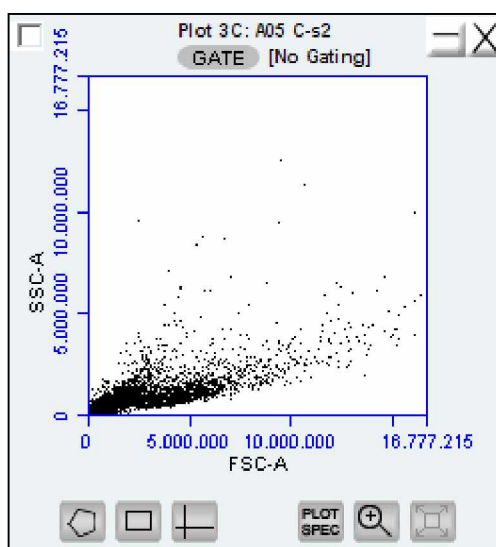
Figura 6: Citômetro Accuri C6



Fonte: ANJONA, 2018.

A Figura 7 mostra o modelo de gráfico obtido ao analisar as amostras pelos parâmetros tamanho e granulosidade.

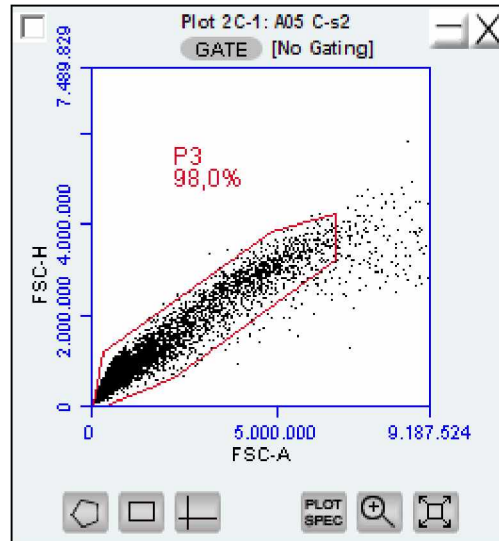
Figura 7: Gráfico representativo tamanho por granulosidade



Fonte: ANJONA, 2018.

A Figura 8 mostra o modelo de gráfico obtido ao analisar as amostras pelos parâmetros área e altura. O gate em vermelho marca a população real a ser analisada, sendo que o que está fora dele são doublets.

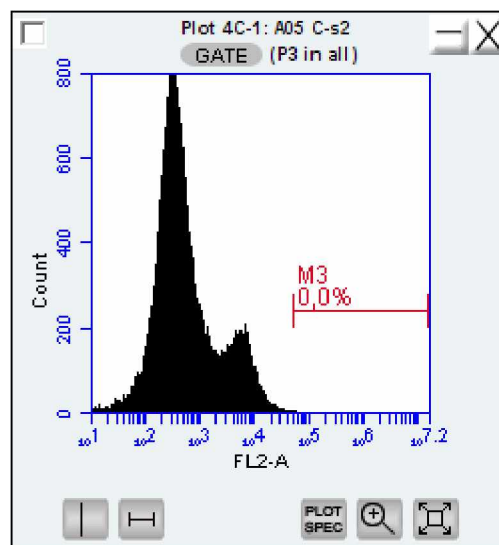
Figura 8: Gráfico representativo da área por altura



Fonte: ANJONA, 2018.

A Figura 9 representa os histogramas obtidos ao analisar as amostras, levando em conta apenas a população demarcada pelo gate na Figura 8. O que está antes de M3 representa as células vivas, enquanto o que está dentro do intervalo M3 representa as células mortas.

Figura 9: Histograma representativo



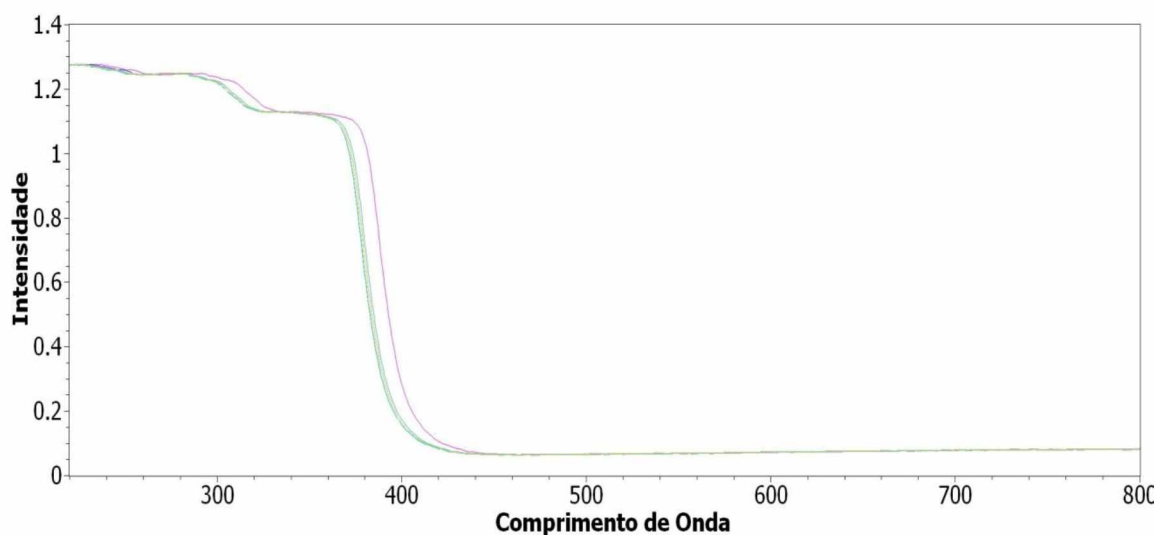
Fonte: ANJONA, 2018.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Técnicas de caracterização

A Figura 10 mostra os espectros de AO dos nanocristais de ZnO puros e dopados com Eu. Nos espectros de absorção óptica dos NCs de ZnO puro observa-se uma banda de absorção localizada no ultravioleta, característica do óxido de zinco. Nos espectros das amostras dopadas com Eu observa-se a mesma banda de absorção do ZnO e algumas alterações. Embora não seja possível observar as absorções dos íons de Eu devido estarem na mesma faixa de absorção do ZnO, essas leves alterações dão indícios da sua incorporação.

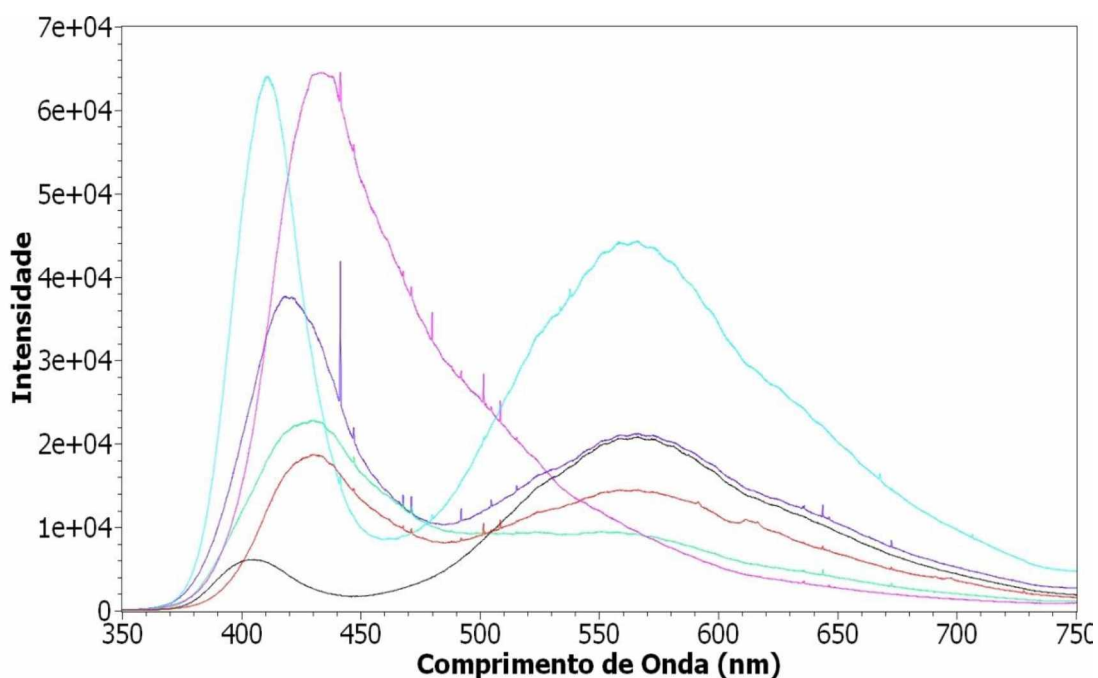
Figura 10: Espectros de absorção óptica de nanocristais de ZnO puro e dopados com Eu a temperatura ambiente



Fonte: ANJONA, 2018.

A Figura 11 mostra os espectros de PL dos nanocristais de ZnO puros e dopados com Eu. Nos espectros de luminescência dos NCs de ZnO puro observa-se uma banda de emissão localizada no ultravioleta, característica do óxido de zinco. Nos espectros das amostras dopadas observa-se todas as emissões relacionadas aos íons de Eu que aumenta a intensidade com o aumento da concentração, confirmando a presença desse íon nos nanocristais de ZnO.

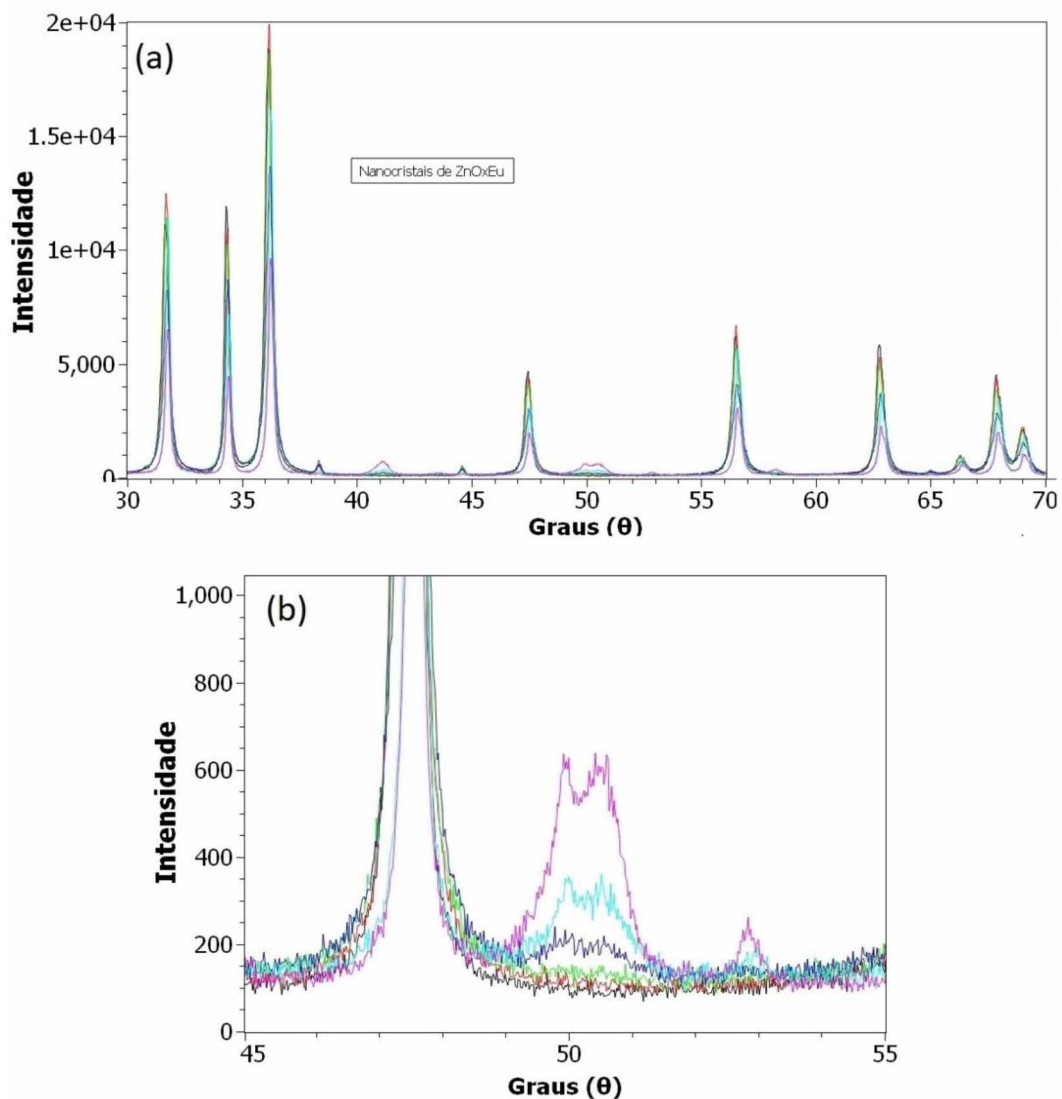
Figura 11: Espectros de luminescência de nanocristais de ZnO puro e dopados com Eu a temperatura ambiente



Fonte: ANJONA, 2018.

A Figura 12 mostra os difratogramas de DRX dos nanocristais de ZnO puros e dopados com Eu. Nos difratogramas dos NCs de ZnO puro observou os picos de difração de Bragg característicos do óxido de zinco com estrutura wurtzita, confirmando a formação de nanocristais de ZnO de acordo com o cartão padrão JCPDS 36-1451. Nos difratogramas das amostras dopadas observou os mesmos picos de difração de Bragg confirmando que a dopagem não alterou a estrutura do ZnO. Nas dopagens de 5, 10 e 20 observou picos de difração característicos de Eu_2O_3 com base no cartão JCPDS 34-0392 (Figura 12b).

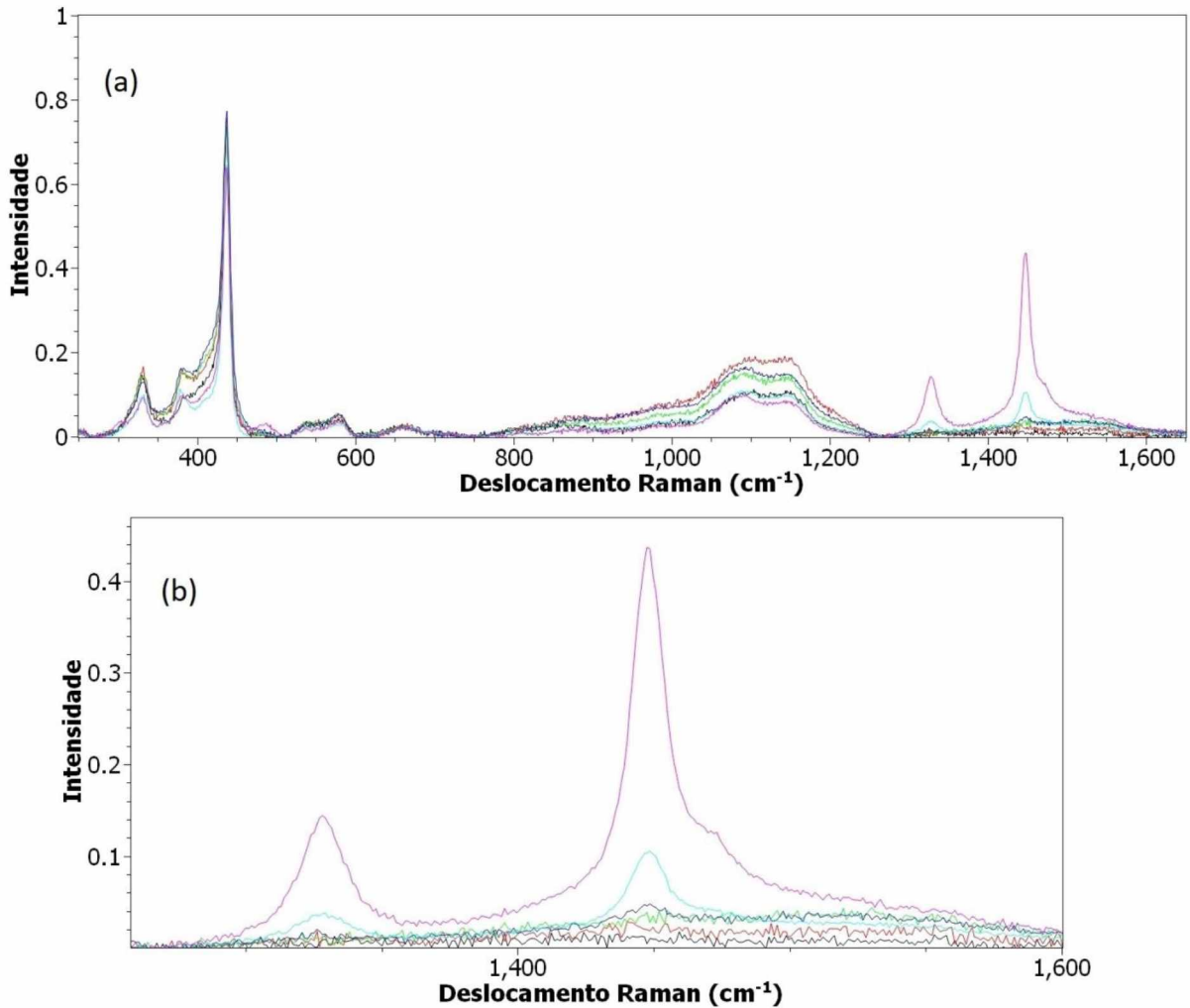
Figura 12: (a) difratogramas DRX de nanocristais de ZnO puro e dopados com Eu a temperatura ambiente. (b) ampliação do espectro de 40-55o



Fonte: ANJONA, 2018.

A Figura 13 mostra os espectros de Raman dos nanocristais de ZnO puros e dopados com Eu. Nos espectros dos NCs de ZnO puro e das concentrações de 0,1 a 1 % de Eu observa os modos vibracionais característicos do óxido de zinco na fase wurtzita. Já nos espectros das amostras de 5, 10 e 20 % de Eu verificou bandas relacionadas os modos vibracionais característicos do óxido de európio (Eu_2O_3) (Figura 13(a)). Na Figura 13 (b) a ampliação dos espectros na faixa de 1250 a 1600 cm^{-1} observa-se claramente as bandas do (Eu_2O_3).

Figura 13: (a) espectros Raman de nanocristais de ZnO puro e dopados com Eu a temperatura ambiente. (b) ampliação do espectro de 1250 a 1600 cm^{-1}



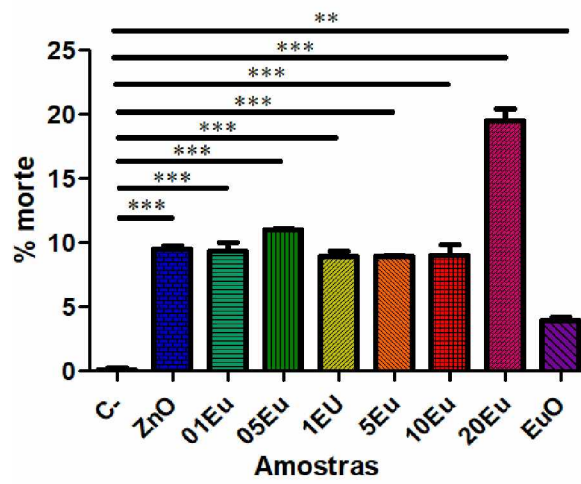
Fonte: ANJONA, 2018.

4.2. Testes biológicos

O controle negativo, por não conter tratamento com nenhum NC, apresentou morte celular nula ou quase nula, resultado já esperado. As amostras de ZnO, 0.1Eu, 0.5Eu, 1.0Eu, 5.0Eu e 10.0Eu provocaram morte em torno de 10% das células totais. Enquanto isso, os NCs de 20Eu e o Eu_2O_3 apresentaram resultados diferentes dos demais, com 20% e 4%, respectivamente.

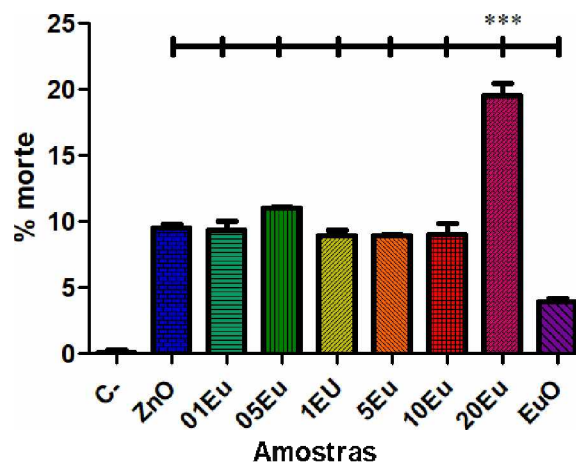
A Figura 14 mostra a significância entre o controle e as demais amostras. A menor delas se deu em relação ao Eu_2O_3 . De forma semelhante as Figuras 15 e 16 exibem, respectivamente, a significância do NC de 20Eu e de Eu_2O_3 em relação às outras amostras.

Figura 14: Significância do controle



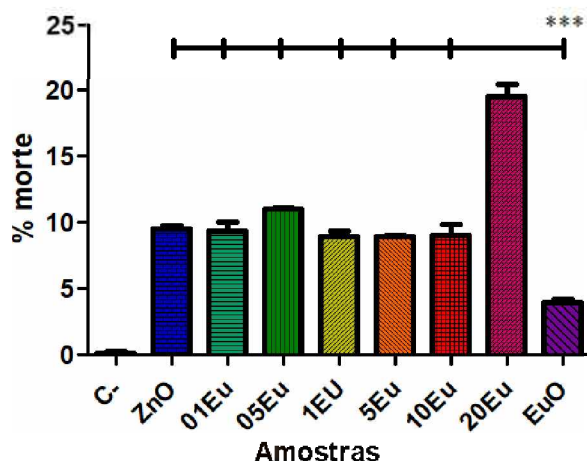
Fonte: ANJONA, 2018.

Figura 15: Significância do 20Eu



Fonte: ANJONA, 2018.

Figura 16: Significância do Eu_2O_3



Fonte: ANJONA, 2018.

Em consonância com este trabalho, outros autores mostraram que NPs de ZnO possuem a capacidade de induzir a geração de espécies reativas de oxigênio, o que pode levar à morte da célula (XIA T., KOVOCHICH M., BRANT J., et al, 2006; RYTER S.W., KIM H.P. HOETZEL A., et al, 2007; LONG T.C., SALEH N., TILTON R.D., et al, 2006; LOVRIC J. et al, 2005; LEWINSKI N., COLVIN V., DREZEK R., 2008). De modo semelhante a estes, pesquisadores viram que as células cancerígenas de linhagem linfocítica são 28-35 vezes mais suscetíveis à morte induzida por NPs de ZnO (HANLEY C. et al, 2008; WANG H. et al, 2009; HANLEY C. et al, 2009).

Wahab e demais autores investigaram a citotoxicidade das NPs de ZnO em células de câncer de fígado (HepG2) e células de câncer de mama (MCF 7) e observaram que a partir da concentração de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a viabilidade celular é reduzida para menos que 10% (WAHAB et. al., 2014). Ostovsky et al (2009) examinaram o efeito citotóxico de NPs de ZnO em linhagens celulares de câncer de mama e de próstata. Nas células de mama foi observada indução na morte celular na linhagem tumoral MCF-7 e sem mudanças significativas na viabilidade celular da linhagem normal MCF10 A. O mesmo foi observado no tratamento das células de próstata, sendo que os NCs induziram grande efeito citotóxico na linhagem celular tumoral PC3, o que não foi observado na linhagem celular normal RWPE-1.

5. CONCLUSÃO

Através da análise de citotoxicidade dos NCs de ZnO dopados com diferentes concentrações de Eu, foi possível identificar que os NCs dopados com 20 wt% apresentaram uma boa taxa de morte na linhagem tumoral BT-549. Dessa forma, esses NCs podem se tornar um alvo no tratamento do câncer. Porém, há a necessidade da realização de outros testes para comprovar o seu efeito antineoplásico e garantir a biocompatibilidade evitando, assim, o ataque da droga às células normais do organismo.

6. PERSPECTIVAS

Para a continuação deste trabalho serão realizados testes que objetivam investigar o potencial antitumoral dos NCs de ZnOxEu em outras linhagens de câncer, além de testes de viabilidade celular em células não cancerosas, para melhor análise da biocompatibilidade.

REFERÊNCIAS

ALATA, O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. **Journal of Nanobiotechnology**. v.2, n.3, 2004.

AL-HAJJ, M. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2003.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2017**. Atlanta: 2017a. Disponível em: <<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>>. Acesso em julho/2018.> Acesso em:

BEAUREPAIRE, E., et al., **Functionalized Fluorescent Oxide Nanoparticles**: Artificial Toxins for Sodium Channel Targeting and Imaging at the Single-Molecule Level. *Nano Letters*, 2004. p. 2079-2083.

CAVALCANTE, N. B. Atividade antibacteriana e antifúngica de NPs de prata produzidas por *Curvularia inaequalis* (Shear) Boedijn. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Centro, Petrolina, 2014.

DANTAS, N. O. et al. Raman investigation of ZnO and Zn_{1-x}Mn_xO nanocrystals synthesized by precipitation method. **Journal of Non-Crystalline Solids**. v. 354, n. 42-44. 2008a. p. 4827-4829,

DANTAS, N. O. et al. Structural and magnetic properties of ZnO and Zn_{1-x}Mn_xO nanocrystals. **Journal of Non-Crystalline Solids**. v. 354, n. 42-44. 2008b. p. 4827-4829

DRUMMOND, A. et al. Preclinical and Clinical Studies of MMP Inhibitors in Cancer. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 878, n. 1. 1999. p. 228-235,

HANLEY C. et al. Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using zinc oxide nanoparticles. **Nanotechnology**. 2008.

HANLEY C., et al. The influences of cell type and ZnO nanoparticle size and immune cell cytotoxicity and cytokine induction. **Nanoscale Res Lett**. 2009.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSE DE ALENCAR GOMES DA SILVA. **Câncer de mama: é preciso falar disso**. 2015. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/publicacoes/cancer_mama_preciso_falar_disso.pdf>. Acesso em: jul. 2018.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSE DE ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2018** – Incidência do câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: jul. 2018.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSE DE ALENCAR GOMES DA SILVA. **O que é câncer?** Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: jul 2018.

INCA -INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Tipos de câncer**. Rio de Janeiro, 2017b. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home>>. Acesso em: jun. 2018.

Jl, Zhaoxia et. al. Dispersion and stability optimization of TiO₂ nanoparticles in cell culture media. **Environmental science & technology**. v. 44, n. 19. 2010. p. 7309-7314.

KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C. P.; KUIJTEN, G. A. **Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis**. **Blood**, 1994.

LEWONSKI N, COLVIN V, DREZEK R. Cytotoxicity of nanoparticles. **Small**. 2008. p. 26–49.

LONG, Thomas C. et al. Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. **Environmental science & technology**. v. 40, n. 14. 2006. p. 4346-4352.

LOVRIC, Jasmina et al. Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. **Chemistry & biology**. v. 12, n. 11. 2005. p. 1227-1234.

MISHRA, Yogendra Kumar et al. Virostatic potential of micro–nano filopodia-like ZnO structures against herpes simplex virus-1. **Antiviral research**. v. 92, n. 2. 2011. p. 305-312.

NEL, Andre et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761. 2006. p. 622-627.

NIEMIES, Alan. **Câncer**. Disponível em: <<http://medsimples.com/cancer/>>. Acesso em: jul. 2018.

PREMANATHAN, Mariappan et al. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 7, n. 2. 2011. p. 184-192.

RASMUSSEN, John W. et al. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. **Expert opinion on drug delivery**, v. 7, n. 9. 2010. p. 1063-1077.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3. 2006. p. 1458

ROCO, Mihail C.. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 3. 2003. p. 337-346.

RYTER, Stefan W. et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress. **Antioxidants & redox signaling**, v. 9, n. 1. 2007. p. 49-89.

ALMEIDA SILVA, Anielle Christine et al. Controlling the cytotoxicity of CdSe magic-sized quantum dots as a function of surface defect density. **Nano letters**, v. 14, n. 9. 2014. p. 5452-5457.

SILVA, Anielle Christine Almeida. Pontos quânticos semicondutores sintetizados via soluções coloidais aquosas: estudos e aplicações nanobiotecnológicas. 2014. 142 f. Tese (Doutorado em Ciências Exatas e da Terra) – Instituto de Física da UFU. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. **World Cancer Report: 2014**. Lyon: IARC, 2014.

ONO, Yoshimasa A. **Electroluminescent displays**. World Scientific, 1995.

TAUROZZI, Julian S.; HACKLEY, Vincent A.; WIESNER, Mark R. A standardised approach for the dispersion of titanium dioxide nanoparticles in biological media. **Nanotoxicology**, v. 7, n. 4. 2013. p. 389-401.

TOUMEY, Chris. Plenty of room, plenty of history. **Nature Nanotechnology**, v. 4. 2009. p.783-784.

WANG, Hua et al. Fluorescent dye encapsulated ZnO particles with cell-specific toxicity for potential use in biomedical applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 1. 2009. p. 11.

WHO Organização Mundial da Saúde (World Health Organization). **Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: jun. 2018.

XIA, Tian et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. **Nano letters**, v. 6, n. 8. 2006. p. 1794-1807.

ZHANG, Yin et al. Biomedical applications of zinc oxide nanomaterials. **Current molecular medicine**, v. 13, n. 10. 2013. p. 1633-1645.