

PUCRS

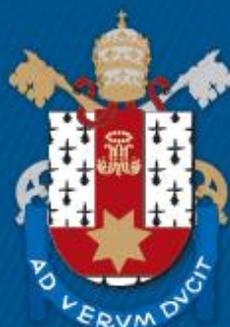
ESCOLA POLITÉCNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIAS DE MATERIAIS  
MESTRADO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

JEANNE LOUISE FERNANDES JESUS

**NANOESTRUTURAS DE ÓXIDO DE ZINCO: SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTITUMORAL EM  
CÂNCER DE BEXIGA**

Porto Alegre  
2021

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul



# **NANOESTRUTURAS DE ÓXIDO DE ZINCO: SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTITUMORAL EM CÂNCER DE BEXIGA**

**JEANNE LOUISE FERNANDES JESUS**  
QUÍMICA LICENCIATURA

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM  
ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

**Porto Alegre**  
**Agosto, 2021**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

ESCOLA POLITÉCNICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

# **NANOESTRUTURAS DE ÓXIDO DE ZINCO: SÍNTESE E AVALIAÇÃO ANTITUMORAL EM CÂNCER DE BEXIGA**

**JEANNE LOUISE FERNANDES JESUS**

QUÍMICA LICENCIATURA

ORIENTADORA: PROF(a). DR(a). Rosane Ligabue

Dissertação de Mestrado realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre  
Agosto, 2021**

### Ficha Catalográfica

J58n Jesus, Jeanne Louise Fernandes

Nanoestruturas de óxido de Zinco : Síntese e Avaliação Antitumoral em Câncer de Bexiga / Jeanne Louise Fernandes Jesus. – 2021.

91p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Ligabue.

1. Nanoestruturas de Óxido de Zinco. 2. Atividade Antitumoral. 3. Câncer de Bexiga.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051



## **Nanoestruturas de Oxido de Zinco: Síntese e Avaliação Antitumoral em Câncer de Bexiga**

**CANDIDATA: JEANNE LOUISE FERNANDES JESUS**

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

---

**DRA. ROSANE ANGÉLICA LIGABUE – ORIENTADORA**

### **BANCA EXAMINADORA**

---

**DR. VLADIMIR GONZALO LAVAYEN JIMENEZ - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM QUÍMICA - UFRGS**

---

**DRA. NARA REGINA DE SOUZA BASSO - DO PGETEMA - PUCRS**

**PUCRS**

**Campus Central**

Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 32 - Sala 507 - CEP: 90619-900

Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625

E-mail: [engenharia.pg.materiais@pucrs.br](mailto:engenharia.pg.materiais@pucrs.br)

[www.pucrs.br/politecnica](http://www.pucrs.br/politecnica)

*“Não há nada a temer na vida,  
apenas tratar de compreender”.*  
*(Marie Curie)*

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a minha família, principalmente a minha mãe, Inês Terezinha Soares Fernandes do Rêgo, por me encorajar e apoiar em todos os momentos da minha vida, bem como na execução desse projeto.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha orientadora, Professora Rosane Ligabue, pela constante atenção e dedicação frente às etapas do Mestrado.

Aos colegas Wesley Monteiro, Fernando Diz e Michele Oliveira pelo apoio, suporte técnico, treinamentos e ajuda em todas as etapas deste projeto, me ensinando os primeiros passos para me desenvolver como Pesquisadora.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Professora Fernanda Morrone pela disponibilidade da infraestrutura do Laboratório de Farmacologia Aplicada da PUCRS.

À equipe do Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCEMM).

Ao instituto de Toxicologia (InTox).

À equipe do Instituto do Petróleo e dos Recursos Naturais (IPR) da PUCRS.

Aos professores e funcionários da Escola Politécnica da PUCRS.

A todos que auxiliaram e contribuíram de alguma forma com a construção deste trabalho.

# SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>DEDICATÓRIA</b> .....  | <b>7</b>  |
| <b>AGRADECIMENTOS</b> .....   | <b>8</b>  |
| <b>SUMÁRIO</b> .....  | <b>9</b>  |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....   | <b>13</b> |
| <b>LISTA DE QUADROS</b> .....   | <b>14</b> |
| <b>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</b> .....                                   | <b>15</b> |
| <b>LISTA DE UNIDADES</b> .....  | <b>16</b> |
| <b>RESUMO</b> .....   | <b>17</b> |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>18</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>19</b> |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....   | <b>21</b> |
| 2.1. Objetivos Específicos .....  | 21        |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....   | <b>22</b> |
| 3.1. Materiais Nanoestruturados .....   | 22        |
| 3.1.1 Nanoestruturas de Óxido de Zinco .....                                    | 24        |
| <b>3.1.2. Métodos de Síntese das Nanoestruturas de ZnO</b> .....                | <b>25</b> |
| <b>3.2. Nanopartículas no tratamento de câncer</b> .....                        | <b>30</b> |
| 3.3. Câncer de Bexiga .....   | 33        |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | <b>38</b> |
| 4.1. Materiais Utilizados .....   | 39        |
| 4.2. Desenvolvimento de Nanoestruturas de ZnO .....                             | 41        |
| 4.2.1. Método de co-precipitação .....  | 41        |
| 4.2.2. Método hidrotérmico .....  | 42        |
| 4.3. Técnicas de Caracterização .....   | 42        |
| 4.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG) ..... | 42        |
| 4.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....                        | 43        |
| 4.3.3. Difração de Raios X (DRX) .....  | 43        |
| 4.3.4. Análise Termogravimétrica (TGA) .....                                    | 43        |
| 4.3.5. Análise de Tamanho de Partícula e Potencial Zeta .....                   | 43        |

|  |           |
|--|-----------|
| 4.3.6. Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado individualmente (ICP-MS)..... | 44        |
| 4.4. Ensaio in Vitro .....   | 44        |
| 4.4.1. Cultura e manutenção das células .....                                    | 44        |
| 4.4.2. Preparação das Amostras .....   | 45        |
| 4.4.3. Ensaio de Viabilidade Celular (MTT).....                                  | 45        |
| 4.4.4. Determinação dos valores de IC <sub>50</sub> .....                        | 47        |
| 4.4.5. Análise da morfometria nuclear (NMA) .....                                | 47        |
| 4.4.6. Análise estatística.....  | 48        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>   | <b>49</b> |
| 5.1. Caracterização de nanoestruturas de Zinco.....                              | 49        |
| 5.2. Avaliação das Propriedades Biológicas .....                                 | 54        |
| <b>6. CONCLUSÕES .....</b>   | <b>67</b> |
| <b>7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>                                  | <b>69</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>70</b> |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1: Exemplos de diferentes nanomateriais: (A) Nanopartículas de Pd (0D), (B) Nanofolhas de grafeno (2D), (C) Nanorods de Prata (1D), (D) Nanofibras de óxido de polietileno (1D), (E) Nanofios de ZnO semelhantes a ouriço (3D) e (F) Rede de nanofios de óxido de tungstênio em (3D). Fonte: Jaison *et al.*, 2018.....23
- Figura 3.2. Tipos de morfologias de nanoestruturas de ZnO. Fonte: Adaptado de Leonardi, 2017. ....25
- Figura 3.3. Imagens de Nanoflores obtidas por FESEM. (A) 2  $\mu\text{m}$  e (B) 1 $\mu\text{m}$ . Fonte: Adaptado de Yu *et al.*, 2018.....26
- Figura 3.4. Imagens obtidas por MET das ZnONP produzidas: (A) sem poli (vinil pirrolidona), (B) com poli (vinilpirrolidona) Fonte: Adaptado de Porto *et al.*, 2017.....27
- Figura 3.5. Imagens obtidas por MEV dos nanoflocos finos de ZnO. Fonte: Adaptado de Samanta *et al.*, 2015. ....27
- Figura 3.6. (a) Imagem de MEV (500nm) e (b) Imagem de MET (2m). Fonte: Adaptado de Bhat, 2008.....28
- Fig. 3.7 . Imagens MEV de ZnO sintetizado em soluções de: (a) NaOH (b) LiOH e (c) NH<sub>4</sub>OH .Fonte: Ekthammathat *et al.*,2014.....29
- Figura 3.8. Estadiamento do Câncer de Bexiga. Fonte: Durán *et al.*, 2018..... 34
- Figura 4. Esquema representativo do desenho experimental desta pesquisa. ....38
- Figura 4.1. Desenho experimental da preparação das amostras para os determinados estudos. ....45
- Figura 4.2. Esquema representativo do princípio de MTT..... 46
- Figura 5.1. Imagens obtidas por MEV (magnificação de 40.000x) para (a) ZnO-CPB, (b) ZnO-CPL, (c) ZnO-CPBH, (d) ZnO-CPBC, (e) ZnO-HL, e (f) CPF. 50
- Figura 5.2. Imagens obtidas por MET para (a) ZnO-CPB (magnificação 31.000 x); (b) ZnO-CPL (magnificação 35.000 x); (c) ZnO-CPBH (magnificação 35.000 x); (d) ZnO-CPBC (magnificação 35.000 x); (e) ZnO-HL (magnificação 88.000 x); (f) ZnO-CPF (magnificação 26.500 x)..... 51

- Figura 5.3. Difractogramas obtidos para (a) ZnO-CPB (b) ZnO-CPL (c) ZnO-CPBH (d) ZnO-CPBC. ....52
- Figura 5.4. Curvas de a) TG e b) DTG para ZnO-CPB; ZnO-CPL; ZnO-CPBH; ZnO-CPBC; ZnO-CPFR e ZnO-HL.....53
- Figura 5.5. Efeito das nanoestruturas ZnO-CPB (a), ZnO-CPL (b), ZnO-CPBH (c) e ZnO-CPBC (d) na viabilidade celular das linhagens vero e T24 por meio do ensaio MTT após 24 h. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata  $\pm$  DP. Os dados foram analisados por One-way ANOVA, seguido de Tukey post-hoc. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ . ....56
- Figura 5.6. Mapa de toxicidade das nanoestruturas sintetizadas. O mapa apresenta a relação das concentrações de aplicação das nanoestruturas de zinco que são eficazes contra células tumorais, sem afetar a viabilidade das células saudáveis. ....59
- Figura 5.7. IC50 das nanoestruturas ZnO-CPB (a), ZnO-CPL (b), ZnO-CPBH (c) e ZnO-CPBC (d) na viabilidade das células T24 após 24 h. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata  $\pm$  DP. ....60
- Figura 5.8. Análise da morfometria nuclear das células T24 expostas ao tratamento ZnO-CPL após 24 h. (a) As células T24 foram expostas ao tratamento por ZnO-CPL para seleção da dose (MTT) e em seguida foi avaliado o perfil senescente, apoptótico e normal das células sobreviventes. Distribuição dos núcleos das células T24 expostas as concentrações de 0 (b), 25 (c) e 50  $\mu\text{g/mL}$  (d) da nanoestrutura ZnO-CPL após 24h.....64

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Avaliação da citotoxicidade e atividade antitumoral dos tratamentos com ZnO-CPB, ZnO-CPL, ZnO-CPBH e ZnO-CPBC.....58
- Tabela 2. Parâmetros estruturais e potenciais zeta das nanoestruturas de ZnO. ....61

## LISTA DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| Quadro 1. Nomenclatura utilizada para as nanoestruturas de ZnO sintetizadas..... | 39 |
| Quadro 2. Relação dos reagentes utilizados.....                                  | 40 |
| Quadro 3. Desenho experimental dos ensaios por MTT.....                          | 46 |

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

|          |   |
|----------|---|
| CNMIB    | Carcinoma não músculo invasivo de bexiga  |
| CNTs     | Nanotubos de Carbono  |
| DRX      | Difração de Raios-X   |
| EROs     | Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i> )  |
| ICP-MS   | Espectroscopia de massa com plasma indutivamente acoplado (do inglês, <i>Inductively-coupled plasma mass spectrometer</i> ) |
| IGZO-FET | Biosensor com óxido de gálio e zinco  |
| MEV-FEG  | Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo  |
| MET      | Microscopia Eletrônica de Transmissão   |
| MTT      | (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)   |
| NPs      | Nanopartículas  |
| Qc       | Quercetina  |
| SE       | Elétrons secundários ( do inglês, <i>secondary electron</i> )   |
| TGA      | Análise Termogravimétrica ( do inglês, <i>Thermogravimetric Analysis</i> )  |
| VC       | Viabilidade Celular   |
| ZnO      | Óxido de zinco  |
| ZnONPs   | Nanopartículas de óxido de zinco  |
| ZnTNT    | Nanotubos de titanato de zinco  |

**LISTA DE UNIDADES**

°C      Temperatura

mL      Volume

g, mg    Massa

h, min    Tempo

nm      Comprimento

mV, Kv    Tensão

## RESUMO

JESUS, JEANNE. **Nanoestruturas de óxido de zinco: Síntese e avaliação antitumoral em câncer de bexiga.** Porto Alegre. 2021. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

Nos últimos anos, o interesse de nanoestruturas de óxido de zinco (ZnONPs) tem crescido devido as propriedades como biocompatibilidade, estabilidade química e citotoxicidade seletiva contra células tumorais, tornando-as promissoras para a aplicação na área biomédica. A fim de avaliar a atividade antitumoral em diferentes morfologias, este estudo teve como objetivo desenvolver nanoestruturas de ZnO e avaliar sua resposta biológica (atividade antitumoral) com células T24 (células de câncer de bexiga). As ZnONPs foram sintetizadas por dois métodos: método de coprecipitação e método hidrotérmico e caracterizadas por técnicas de MEV-FEG, MET, DRX, TGA e ICP. Além disso, os resultados das análises de potencial zeta, MTT e NMA deram suporte para a elaboração de um mapa de toxicidade das nanoestruturas sintetizadas. As ZnONPs apresentaram, predominantemente, morfologias de lâminas, bastões e flores. O ensaio de MTT mostrou que as nanoestruturas de óxido de zinco exibiram perfil de biocompatibilidade frente às células Vero (modelo experimental de células normais) e atividade anticancerígena frente às células T24 (concentração de 200 µg/mL), indicando potencial aplicação na área oncológica para o tratamento do câncer de bexiga humano. Embora haja a necessidade de mais estudos para elucidar alguns mecanismos celulares relacionados à exposição às nanoestruturas, os resultados obtidos, mesmo em caráter experimental pré-clínico, potencializaram de maneira segura o uso de nanoestruturas de óxido de zinco como ferramenta para o tratamento do câncer de bexiga humano.

Palavras-Chaves: Nanoestruturas de zinco, atividade antitumoral, câncer de bexiga.

## ABSTRACT

JESUS, JEANNE. Zinc Oxide Nanostructures: Synthesis, and antitumor evaluation in bladder cancer. Porto Alegre. 2021. Master. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul.

In recent years, the interest in zinc oxide nanostructures (ZnONPs) has grown due to properties such as biocompatibility, chemical stability and selective cytotoxicity against tumor cells, become them promising for application in the biomedical area. In order to evaluate the antitumor activity in different morphologies, this study aimed to develop ZnO nanostructures and evaluate its biological response (antitumor activity) with T24 cells (bladder cancer cells). ZnONPs were synthesized by two methods: co-precipitation method and hydrothermal method and characterized by FESEM, TEM, XRD, TGA and ICP techniques. Furthermore, the results of the zeta potential, MTT and NMA analyses provided support for the elaboration of a toxicity map of the synthesized nanostructures. The ZnONPs showed predominantly blade, rod and flower morphologies. The MTT assay showed that the zinc oxide nanostructures exhibited a biocompatibility profile against Vero cells (experimental model of normal cells) and anticancer activity against T24 cells (concentration of 200  $\mu\text{g/mL}$ ), indicating potential application in the oncological area for the treatment of human bladder cancer. Although there is a need for further studies to elucidate some cellular mechanisms related to exposure to nanostructures, the results obtained, even in pre-clinical experimental character, safely potentiated the use of zinc oxide nanostructures as a tool for the treatment of cancer of human bladder.

Key-words: Zinc oxide nanostructures, biocompatibility, bladder.

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o interesse de nanopartículas de óxido de zinco, (ZnONPs) tem crescido devido ao seu potencial de aplicação principalmente na área biomédica. A utilização dessas nanopartículas para regeneração de tecidos, sistemas de entrega de drogas, além de transporte para a distribuição direcionada de medicamentos anticâncer, em células tumorais, mostram o seu impacto na área biomédica (Su *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2016; Mishra, *et al.*, 2017). As nanoestruturas de ZnO (ZnONPs) apresentam propriedades importantes como biocompatibilidade e estabilidade química, além de citotoxicidade seletiva contra células tumorais, por meio de mecanismos envolvendo a geração de espécies reativas de oxigênio (Wiesmann *et al.*, 2019).

O ZnO, é um material anfotérico de baixo custo, com estruturas cristalinas, defeitos estruturais e diferentes morfologias levando a uma grande potencialidade de aplicações em diferentes áreas (Ghazali *et al.*, 2021). Estas propriedades, atribuem às nanoestruturas formadas a partir de ZnO a capacidade de interagirem com biomoléculas, o que possibilita seu emprego na área biomédica, principalmente como uma ferramenta de liberação local de medicamentos (Lin *et al.*, 2017).

Nanoestruturas de óxido de zinco podem ser obtidas por vários métodos de síntese, entretanto o mais usual é o método hidrotérmico, cuja variação de parâmetros como pH, natureza do meio alcalino, concentração dos precursores, temperatura e tempo de reação são fatores fundamentais para o tipo de nanoestrutura obtida (nanotubos, nanobastões, nanofios, nanoestrutura tipo flor, etc.) (Papadaki, *et al.*, 2017).

Nanoestruturas baseadas em metal têm sido exploradas em diversos estudos que objetivam o avanço do tratamento para diferentes tipos tumorais como câncer de colón-retal, mama, pulmão, pâncreas, ovário, bexiga, entre outros, (Premanathan

*et al.*, 2011; Selim *et al.*, 2012; Bendale *et al.*, 2017, Alban *et al.*, 2020). Contudo, esses biomateriais merecem destaque devido à capacidade de atuar atingindo somente na região tumoral (atividade antitumoral seletiva) e protegendo o restante do corpo (biocompatibilidade) (Alban *et al.*, 2020).

Dessa forma, o perfil antitumoral das nanoestruturas sintetizadas neste estudo foi semelhante ao perfil de resposta encontrado na literatura científica por outros pesquisadores (Akhtar *et al.*, 2012; Bai *et al.*, 2017; Ancona *et al.*, 2018). Akhtar e colaboradores (2012), descreveram que as ZnONPs exercem efeitos distintos de citotoxicidade contra a viabilidade de células tumorais humanas de fígado (linhagem HepG2) e pulmão (linhagens A549 e BEAS-2B) avaliadas pelo ensaio de MTT após 24 h. Os autores relatam, que as ZnONPs apresentam seletividade para estes tipos de células tumorais e são capazes de induzir a morte celular programada por apoptose por meio de espécies reativas de oxigênio (EROs).

A biocompatibilidade é outra característica associada às nanoestruturas de zinco relatadas em diversas revisões científicas (Rasmussen *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2015; Mishra *et al.*, 2017; Wiesmann *et al.*, 2020). Grenho e colaboradores (2015), avaliaram a biocompatibilidade de ZnONPs e reportaram a citocompatibilidade em ensaios de *in vitro* após 72 h e sua biocompatibilidade em estudos *in vivo*.

A fim de avaliar a atividade antitumoral de diferentes formas morfológicas de nanoestruturas de óxido de zinco, este estudo tem como objetivo desenvolver nanoestruturas de ZnO com diferentes morfologias e avaliar sua resposta biológica com células Vero (células normais) e T24 (célula de câncer de bexiga).

## **2. OBJETIVOS**

Este estudo tem como objetivo geral a preparação de nanoestruturas de ZnO com diferentes morfologias, bem como, a sua avaliação biológica.

### **2.1. Objetivos Específicos**

- Sintetizar nanoestruturas de zinco com diferentes morfologias a partir dos métodos de co-precipitação e hidrotérmico;
- Caracterizar as nanoestruturas de ZnO sintetizadas com relação as suas propriedades morfológicas, estruturais e físico-químicas;
- Avaliar o potencial efeito antitumoral das nanoestruturas de ZnO frente a linhagem de células T24 (modelo de células de câncer de bexiga).

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Materiais Nanoestruturados

Materiais nanoestruturados são formados por materiais de diferentes naturezas, com propriedades controladas e otimizadas, para diferentes aplicações, incluindo a catálise. Sendo assim, dispostos em escala nanométrica com propriedades físicas e químicas distintas das apresentadas pelos sólidos macroscópios. (Jeevanandam *et al.*, 2018). Estruturas em escala nano, se aplicam a diversos tipos de materiais como nanocompósitos de proteínas (Dash *et al.*, 2020), lipídios nanoestruturados (Azar *et al.*, 2020), nanopartículas poliméricas (Li, *et al.*, 2021), nanoestruturas a base de zinco (Graffari *et al.*, 2019), entre outras.

As propriedades físicas das amostras nanoscópicas, como por exemplo, sua cor, condutividade elétrica e efeitos de superfície, são obtidas em razão da escala nanométrica, possibilitando assim, uma ampla aplicação em diferentes áreas, como na área ambiental (Ortega *et al.*, 2021), alimentícia (Sun *et al.*, 2021) e da saúde ( Mohankumar *et al.*, 2021), recebendo destaque na área médica no estudo do tratamento de cânceres como o de mama (D´Souza *et al.*, 2021), glioblastoma ( Kumar *et al.*, 2020) e câncer de bexiga ( Li *et al.*, 2020).

Em um extenso estudo sobre nanopartículas e materiais nanoestruturados, Jeevanandam *et al.* (2018) afirmam que uma nanopartícula é um nano objeto com pelo menos uma das dimensões em nanoescala. Os termos nanobastões ou nanoplacas são empregados ao invés de nanopartícula, quando os comprimentos do eixo mais longo e do eixo mais curto de um nano objeto são diferentes. Já a definição de materiais nanoestruturados, refere-se a materiais que contêm nanoestrutura interna ou de superfície. Ainda, os autores apresentam para a maioria

das nanopartículas e materiais nanoestruturados, a organização de quatro categorias: nanomateriais a base de carbono, nanomateriais de base inorgânica, nanomateriais de base orgânica e nanomateriais com base em compósito (Jeevanandam et al.,2018).

Pokropivny *et al.* (2007) , classificaram os nanomateriais como estruturas dimensionais em 0D, 1D, 2D e 3D, conforme Figura 3.1. Essa classificação é dependente do movimento de elétrons ao longo das dimensões nos nanomateriais. Por exemplo, os elétrons em 0D são aprisionados em um espaço adimensional, enquanto em 1D, têm elétrons que podem se movimentar ao longo do eixo x, inferior a 100 nm. Da mesma forma, em 2D e 3D têm movimento de elétrons ao longo do plano x-y e x,y,z, respectivamente.

A Figura 3.1 apresenta exemplos de diferentes materiais nanoestruturados.

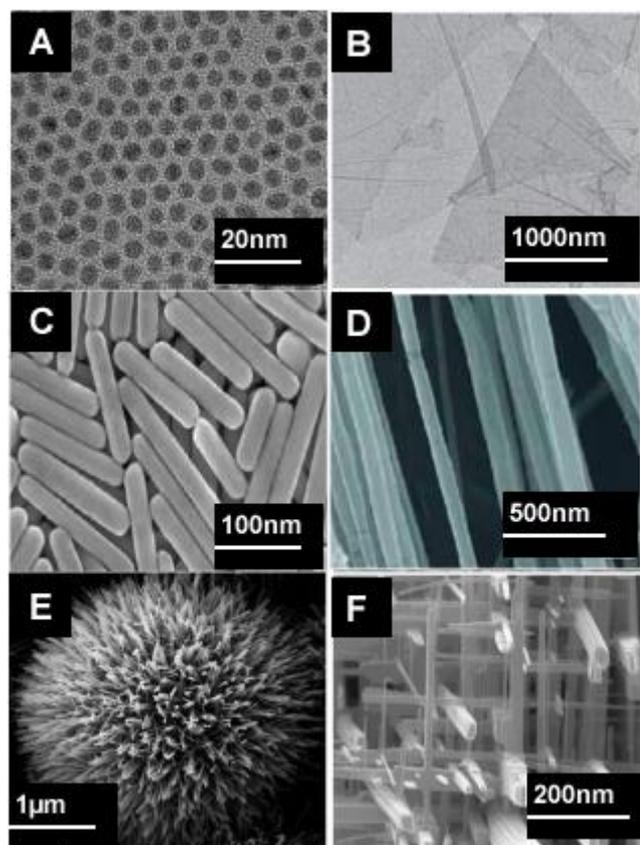


Figura 3.1: Exemplos de diferentes nanomateriais: (A) Nanopartículas de Pd (0D), (B) Nanofolhas de grafeno (2D), (C) Nanorods de Prata (1D), (D) Nanofibras de óxido de polietileno (1D), (E) Nanofios de ZnO semelhantes a ouriço (3D) e (F) Rede de nanofios de óxido de tungstênio em (3D). Fonte: Jaison *et al.*, 2018.

### 3.1.1 Nanoestruturas de Óxido de Zinco

O óxido de zinco, (ZnO), pode ser encontrado diretamente na natureza sob a forma de um mineral denominado zincita, podendo também ser obtido pela oxidação do zinco metálico em contato com o ar. Além disso, o ZnO é um material áspero e resistente, estável em temperaturas altas (~1800°C), portanto, um material adequado para trabalhar em praticamente todas as condições ambientais. Como também, pode ser facilmente dissolvido quimicamente em solventes ácidos, abaixo de pH ~ 6, (Mishra *et al.*, 2018).

O ZnO apresenta-se na forma de um pó de coloração branca, insolúvel em água (Wang,2015). Ele exibe uma estrutura cristalina de wurtzita hexagonal propícia para crescimento de nano e microestruturas unidimensionais, devido a alta relação superfície e volume (Klingshirn, 2007), sendo aplicado para a nanoeletrônica pelas suas propriedades piezoelétricas, para tecnologias inteligentes do tipo dispositivos relacionados à captação de energia mecânica de fontes ambientais, podendo alimentar dispositivos elétricos sem a necessidade de baterias (Xu *et al.*, 2010).

Por outro lado, o ZnO por apresentar baixa toxicidade às células humanas e por ser um material biocompatível, aparece como alternativa em aplicações na área médica (Porto *et al.*, 2017). Estas propriedades atribuídas as nanoestruturas de óxido de zinco, possibilitam a aplicação em diversos campos incluindo fotocatalise (Kanakillam *et al.*, 2020), aplicações eletroquímicas (Matinese *et al.*, 2020), sensores de gás (Jeon *et al.*, 2021), sistemas de bioimagens (Kumar *et al.*,2021) e aplicação na área biomédica (Kabir *et al.*, 2021).

As morfologias mais comuns das nanoestruturas de ZnO, (Figura 3.2), variam em relação a sua direção de crescimento, podendo ser divididas em 1D, 2D e 3D. As classificadas como 1D são nanoestruturas de formatos fibrilares, enquanto as 2D são nanoestruturas com formato de placas, a exemplo do grafeno e silicatos lamelares, ou filossilicatos e silicatos em forma de folha, cujos principais representantes são as argilas e as micas (Leonardi, 2017).

A Figura 3.2 apresenta as morfologias mais comuns para as nanoestruturas de ZnO.

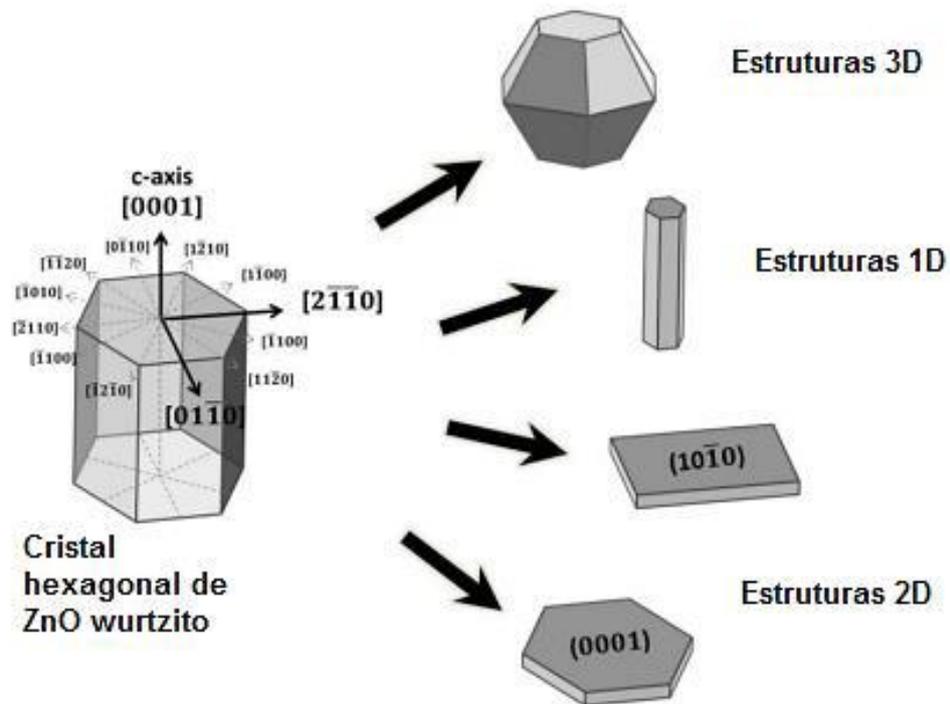


Figura 3.2. Tipos de morfologias de nanoestruturas de ZnO. Fonte: Adaptado de Leonardi, 2017.

As nanoestruturas 3D se caracterizam por apresentar todas as dimensões na escala nanométrica, e são normalmente nanopartículas tendendo ao formato esférico. Geralmente, as nanopartículas têm propriedades diferenciadas quando comparadas às estruturas na escala micrométrica, visto que a razão de aspecto aumenta consideravelmente com a redução do tamanho da partícula (Zhang *et al.*, 2014). Em tal dimensão, as nanopartículas de ZnO são capazes de apresentar maior absorção da radiação UV e excelentes propriedades antibacterianas (Porto *et al.*, 2017).

### 3.1.2. Métodos de Síntese das Nanoestruturas de ZnO

Nanoestruturas de ZnO podem ser obtidas por diversos métodos de síntese. O mais usual é o método hidrotérmico, cuja variação de parâmetros como pH, natureza do meio alcalino, concentração dos precursores, temperatura e tempo de reação são fatores fundamentais para o tipo de nanoestrutura de ZnO obtida. Dessa

maneira, as principais morfologias são as de nanotubos, nanobastões, nanofios e nanoflores (Ghaffari *et al.*, 2019).

Yu *et al.* (2018), por meio do método hidrotérmico, sintetizaram a partir de acetato de zinco e hidróxido de potássio, nanoestruturas do tipo flor (Figura 3.3.). Esta nanoestrutura, foi aplicada na remoção de poluentes orgânicos de água em função da sua atividade fotocatalítica. As nanoestruturas de ZnO sintetizadas, exibiram uma atividade fotocatalítica significativamente melhorada em comparação ao ZnO comercial, atribuído principalmente à morfologia do tipo flor e à maior área superficial.

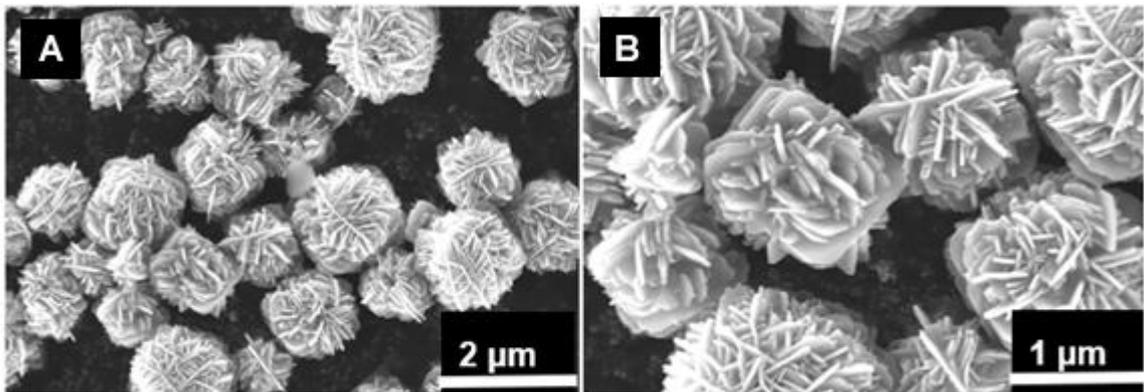


Figura 3.3. Imagens de Nanoflores obtidas por MEV. (A) 2 µm e (B) 1 µm. Fonte: Adaptado de Yu et al., 2018.

Porto *et al.* (2017) prepararam nanopartículas (NPs) de ZnO utilizando acetato de zinco dihidratado como sal precursor, monoetilenoglicol como meio reacional e poli (vinil pirrolidona) como agente estabilizante. O presente trabalho, investigou a influência do poli (vinil pirrolidona) em relação as características morfológicas das nanopartículas produzidas. Os resultados obtidos, demonstraram que a presença do poli(vinil pirrolidona) permitiu obter nanopartículas de óxido de zinco com forma geométrica tendendo à esférica (conforme Figura 3.4).

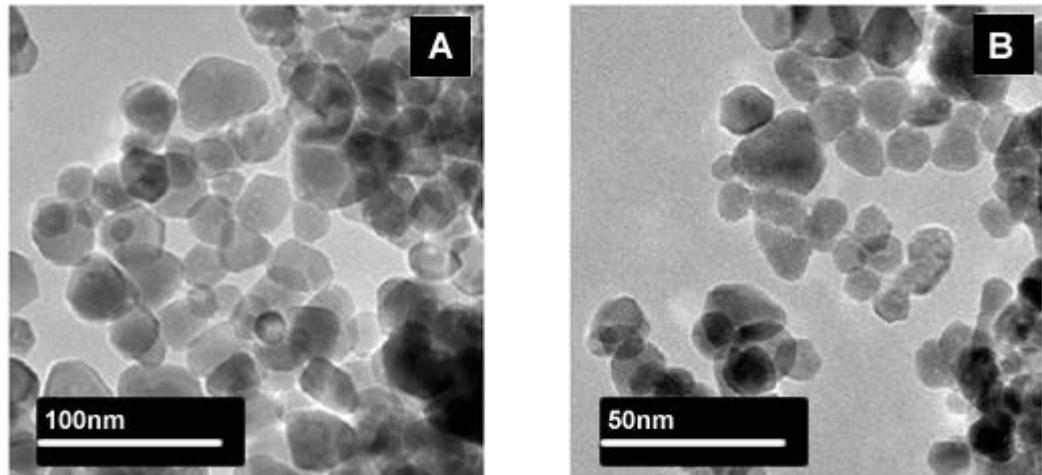


Figura 3.4. Imagens obtidas por MET das ZnONP produzidas: (A) sem poli (vinil pirrolidona), (B) com poli (vinilpirrolidona) Fonte: Adaptado de Porto *et al.*, 2017.

Samanta *et al.* (2015) utilizaram o método de co-precipitação em nanoflocos de óxido de zinco para avaliar suas propriedades piezoelétricas e ópticas, o qual é utilizado para gerar energia mecânica em diodos emissores de luz. No estudo em questão, a síntese foi a partir do cloreto de zinco e hidróxido de sódio para obter a produção de hidróxido de zinco. A partir da saturação do meio reacional com hidróxido de zinco, ocorreu a formação de nanoflocos finos por meio da síntese de química úmida (Figura 3.5).

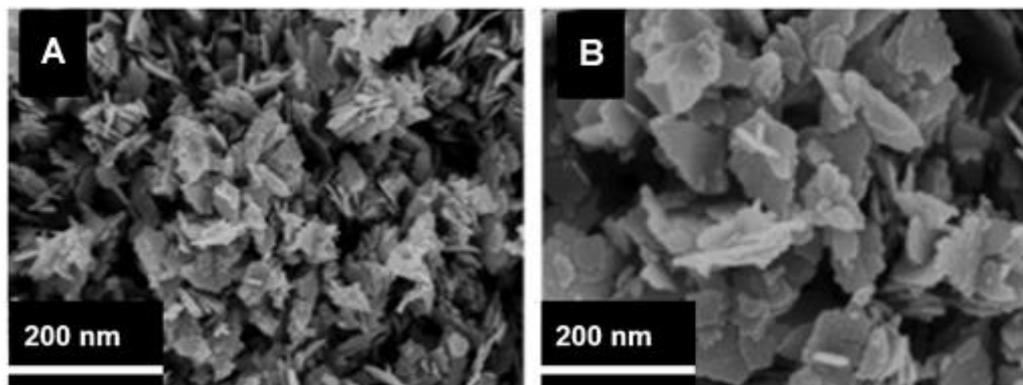


Figura 3.5. Imagens obtidas por MEV dos nanoflocos finos de ZnO. Fonte: Adaptado de Samanta *et al.*, 2015.

Bhat, (2008), propôs a técnica de irradiação de microondas para a síntese de nanobastões de ZnO (Figura 3.6). Para isso, utilizou acetato de zinco e hidrazina misturados na proporção molar de 1: 4 em água sob agitação. A hidrazina reagiu com o acetato de zinco formando um precipitado semelhante a uma pasta. A agitação da pasta foi continuada durante 15 min e, em seguida, a mistura foi submetida a irradiação de microondas a uma potência de 150 W, durante 10 min. O precipitado foi removido por filtração, lavado com etanol absoluto e água destilada várias vezes e depois seco em vácuo a 60 ° C durante 4 h. A Figura 3.6 consta os nanobastões obtidos pela síntese.

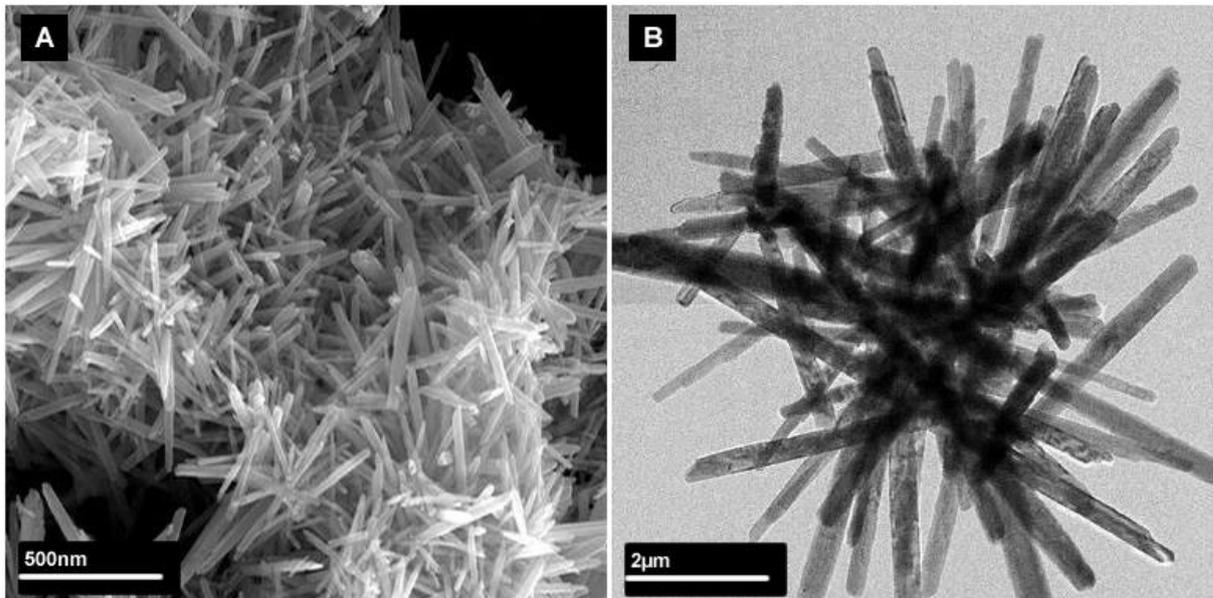


Figura 3.6. (a) Imagem de MEV (500nm) e (b) Imagem de MET (2m). Fonte: Adaptado de Bhat, 2008.

Ismail *et al.* (2005), sintetizaram NPs de ZnO através da técnica hidrotérmica na presença de hexametilenotetramina (HMTA) como surfactante, objetivando investigar a concentração de surfactante, tempo e temperatura no tamanho de partícula de ZnO e na morfologia. Os resultados indicaram que a formação de NPs de ZnO foi confirmada, por meio de DRX e MEV. O tamanho de partícula de ZnO na faixa de 55-110 nm. Em comparação com outros métodos de síntese de pós de ZnO, as condições de reação são consideravelmente moderadas. Verificou-se que o tempo de reação e a temperatura podem afetar a formação de NPs de ZnO ao invés da concentração do surfactante.

Ekthammathat *et al.* (2014) sintetizaram por meio do método hidrotérmico simples a 120°C em 24h, filmes de ZnO nanoestruturados. As morfologias (Figura 3.7) dos produtos foram controladas pelas seguintes soluções precursoras alcalinas: NaOH, LiOH e NH<sub>4</sub>OH, que desempenhou um papel no processo de cristalização, gerando partículas em forma de bastonete, em forma de lápis e em estrela, respectivamente. O grupo utilizou folhas de zinco (15 mm × 15 mm × 0,25 mm), tanto como reagente sólido quanto como substratos para o crescimento direto de filmes nanoestruturados de ZnO, cuidadosamente limpas em etanol 99% e água deionizada contendo banhos de ultrassom.

Concomitantemente, soluções de NaOH, LiOH e NH<sub>4</sub>OH com a mesma concentração de 5M foram adicionadas a 20 mL de água deionizada para formar soluções precursoras até que os valores de pH fossem 12, 12 e 10, respectivamente. As soluções precursoras foram colocadas em autoclaves de aço inoxidável revestidas com teflon e as folhas de Zn limpas foram adicionadas a cada solução. As autoclaves foram fechadas hermeticamente, aquecidas a 120°C por 24h. Os filmes sintetizados em substratos de Zn foram enxaguados com água DI e etanol várias vezes e secos a 70°C por 48 h.

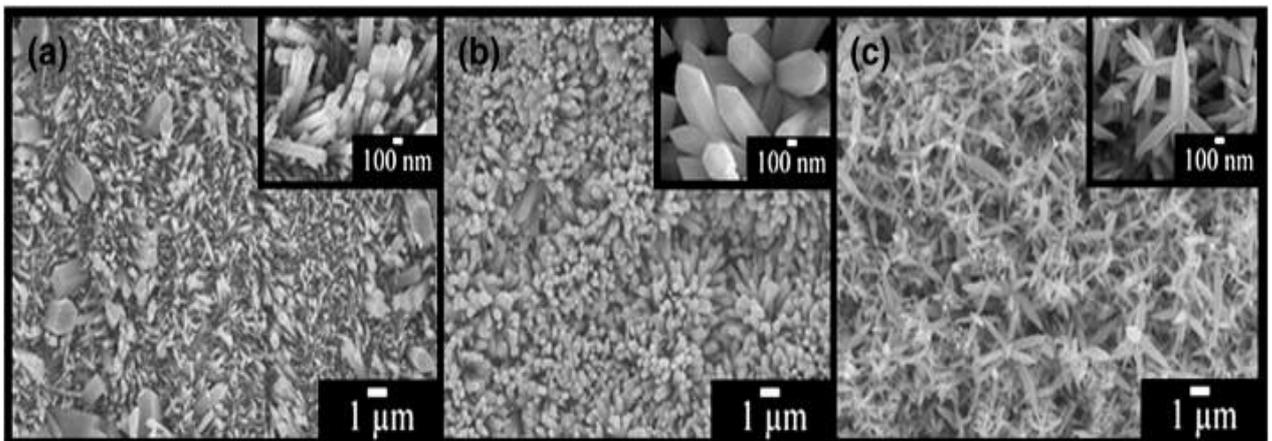


Fig. 3.7 . Imagens MEV de ZnO sintetizado em soluções de: (a) NaOH (b) LiOH e (c) NH<sub>4</sub>OH.

Fonte: Ekthammathat et al.,2014.

Dantas *et al.* (2019), em seu trabalho, tiveram como objetivo a obtenção de nanopartículas de óxido de zinco por duas diferentes rotas sintéticas: co-precipitação e hidrotermal, bem como a avaliação das suas propriedades óticas. Para realização das sínteses, foi utilizado como precursor o nitrato de zinco hexahidratado como agente mineralizante e o hidróxido de sódio.

Ambas as rotas de síntese iniciaram com a mistura do nitrato de zinco hexahidratado e hidróxido de sódio em água deionizada, sendo essa solução mantida sob agitação de 1 hora, a temperatura ambiente. Após a agitação, para a rota de co-precipitação, a solução foi centrifugada para obtenção do precipitado (ZnO\_C), que posteriormente foi lavado para neutralização do pH. Logo em seguida, o produto foi seco em estufa por 24 horas a 50°C.

Para a rota de hidrotermal, após o período de agitação da mistura, a solução foi mantida à temperatura de 150°C por 2 horas, com o objetivo de promover um tratamento térmico nas partículas de ZnO. Após essa etapa, assim como para a rota de co-precipitação, o material foi lavado, neutralizado e seco em estufa para obtenção do óxido de zinco hidrotermalizado (ZnO\_H). Ambas as rotas de síntese apresentaram rendimento entre 90% e 95%. Por fim, foi identificadas as fases presentes nas nanopartículas, bem como observado a presença de possíveis impurezas geradas pelas sínteses utilizando a técnica de DRX. A partir desta análise, foi possível avaliar a estrutura cristalina e composição das nanopartículas de óxido de zinco. Os difratogramas indicaram a formação de nanopartículas cristalinas referentes à estrutura hexagonal do tipo wurtzita. Além disso, pôde ser observado que os picos para as nanopartículas hidrotermalizadas foram mais intensos e bem definidos, o que sugere que o tratamento hidrotermal pode estar relacionado com o aumento da cristalinidade das partículas de ZnO.

### **3.2. Nanopartículas no tratamento de câncer**

O uso da nanotecnologia no campo médico tem proporcionado a utilização de terapias anticancerígenas as quais, anteriormente, teriam alto índice de toxicidade para o corpo humano, em razão da possibilidade de redução de efeitos adversos citotóxicos causados pela não especificidade da terapia convencional.

Nas últimas décadas, as técnicas envolvendo síntese e aplicações com NPs evoluíram, proporcionando uma melhor eficiência na entrega de fármacos e no seu direcionamento específico. A nanoterapia se configura como uma nova terapia voltada para uso das NPs na área de saúde, pela capacidade de carrear drogas, ser sinalizador tumoral, e ainda auxiliar no diagnóstico de doenças (Zhang, *et al.*, 2018).

As principais linhas de pesquisa no tratamento do câncer envolvem NPs produzidas a partir de diferentes materiais como metais, lipídios, proteínas, lipossomos ou polímeros (Asai *et al.*, 2012). Metais como a prata, ouro, platina e ferro compõem a lista dos principais metais usados em experimentos na terapia do câncer (Bisht *et al.*, 2016). As partículas metálicas podem ser preparadas em vários tamanhos e em formas variadas apresentando aspectos farmacodinâmicos e farmacocinéticos que favorecem a indução da célula cancerígena à morte (Firdhouse *et al.*, 2015). Portanto, as NPs são moldadas para conseguirem se depositar em locais de inflamação ou tumores por causa do afastamento das células endoteliais, característico do tecido neoplásico (Vieira *et al.*, 2016).

O mecanismo que os metais usam para gerar morte celular é, principalmente, a indução de apoptose ou necrose pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que causam danos às proteínas e ao DNA com subsequente morte celular. As EROs são as principais moléculas responsáveis por danificar a estrutura da membrana celular por meio de peroxidação e desnaturação proteica, levando ocasionalmente a célula à morte (Bisht *et al.*, 2016).

A morte celular causada pela geração de EROs é específica das NPs metálicas. O excesso de produção de EROs pode ser maléfico para a célula, sendo responsável também por danos à dupla-fita de DNA (Han *et al.*, 2017). No entanto, as NPs podem ter efeitos maléficos em tecidos normais, toxicidade indesejada e as respostas inflamatórias podem restringir suas aplicações clínicas (Cui *et al.*, 2019). No entanto, essas limitações podem ser evitadas quando NPs metálicas são usadas em combinação com conjugados orgânicos adequados como drogas, ácidos nucleicos ou antígenos de proteína, para aumentar sua eficiência, especificidade e segurança em terapias experimentais de câncer (Del Solar *et al.*, 2019).

A morte celular por apoptose é um processo natural regulado positivamente por genes supressores tumorais como o p53, que induz outros genes pró-apoptóticos, como receptores de morte celular e genes da família BCL-2, que liberam moléculas apoptóticas para o citosol, acelerando o processo de morte celular (Choi *et al.*, 2016). A principal fonte produtora de EROs dentro da célula é a mitocôndria, em razão dos seus processos químicos de geração de energia. Quando as EROs se excedem ou escapam da mitocôndria, essas moléculas invadem o citosol conseguindo destruir estruturas moleculares maiores, como o DNA, ou causam estresse oxidativo por lesão da membrana plasmática, tornando as EROs

um importante mecanismo contra células neoplásicas (BAI *et al.*, 2017; Han *et al.*, 2017).

O zinco metálico, recentemente com o avanço da nanomedicina, tornou-se um importante componente utilizado para a produção de NPs. A eficácia das moléculas de zinco contra células de carcinoma hepatocelular (HepG2), câncer de próstata e câncer de ovário tem sido relatadas em estudos experimentais (Wang, *et al.*, 2018).

Outro estudo que mostra a efetividade das NPs de zinco foi realizado por Bai, *et al.* (2017). Neste estudo, as ZnONPs foram utilizadas para tratar células cancerígenas de ovário durante 12 e 24h. Após 24h, houve uma redução de quase 70% de células cancerígenas quando estas eram expostas a 30 µg/mL.

Além das NPs metálicas, NPs à base de polímeros, proteínas e lipídios também são usadas em quimioterapia função da sua baixa toxicidade, sendo responsáveis por introduzir fármacos importantes ao combate tumoral (Lopes *et al.*, 2019).

Assim, com suas propriedades químicas variadas e seus mecanismos de geração de EROs, algumas NPs apresentam efeitos tóxicos contra células tumorais diferentes, independente de carregarem ou não algum fármaco, podendo apresentar um efeito antitumoral mais eficaz em determinadas linhagens tumorais que apontam suscetibilidade celular para aquele tipo de NP ou fármaco carregado. Apesar dos bons resultados envolvendo NPs e antineoplásicos, obstáculos como fagocitose inespecífica e efeitos adversos causados pela toxicidade da fabricação precisam ser mais bem discutidos e estudados (Vieira *et al.*, 2016).

Devulapally *et al.* (2016) e Xiang *et al.* (2013) estudaram terapias que utilizam genes interferentes e quimioterapia para a erradicação de tumores, mas enfrentam desafios como a estrutura pequena de seus materiais não alcançando efeitos consideráveis. Os vírus também estão sendo estudados como novos agentes carregadores de drogas, por conterem características biocompatíveis com o corpo humano, facilidade de molde em vários tamanhos e formas, podendo ser conjugado junto com PEG para prolongar seu tempo na corrente sanguínea (Meng *et al.*, 2017).

Alguns tratamentos já conhecidos como a radioterapia e a quimioterapia estão adotando o uso de NPs. No estudo de Au *et al.* (2015) a wortmanina foi conjugada junto ao docetaxel em NPs de PEG-PLA, apresentando um volume tumoral abaixo de 10% em um período de 120 dias. Compostos inorgânicos também apresentam

ótima absorção de radiação, sendo bons materiais para serem usados em radioterapia (Casals *et al.*, 2017).

### 3.3. Câncer de Bexiga

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer é um termo que abrange mais de 100 diferentes tipos de doenças malignas as quais tem em comum o crescimento desordenado de células, que podem invadir tecidos adjacentes ou órgãos à distância. As células cancerosas dividem-se rapidamente e tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores que podem espalhar-se para outras regiões do corpo.

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Quando começam em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são denominados carcinomas. Se o ponto de partida são os tecidos conjuntivos, como osso, músculo ou cartilagem, são chamados sarcomas.

Outras características que diferenciam os diversos tipos de câncer entre si são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes, conhecida como metástase (INCAa, 2020).

Recentemente, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCAb, 2020) mostram que no ano de 2020 foram estimados cerca de 626 mil novos casos de câncer no Brasil e que, excluindo o mais comum, o câncer de pele não melanoma, os mais comuns para os homens foram próstata (65.840), cólon e reto (20.540) e bexiga (7.590) ; já para o sexo feminino, os tipos de câncer mais comuns são o de mama (66.280), cólon e reto (20.470) e colo do útero (16.710).

As terapias convencionais contra os diversos tipos de câncer são a quimioterapia e a radioterapia que apresentam diversos efeitos colaterais resultantes da falta de seletividade que, frequentemente, dificultam a erradicação completa da doença (Cabral *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2017). Além disso, as células tumorais podem desencadear mecanismos de resistência aos tratamentos, reduzindo a eficácia da terapêutica (Ho *et al.*, 2017).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCAc, 2020), o câncer de bexiga atinge as células que cobrem o órgão e é classificado de acordo com a célula que sofreu alteração. Conforme descrito na Figura 3.8. No momento em que o câncer se limita ao tecido de revestimento da bexiga, é chamado de superficial. O câncer que

começa nas células de transição pode se disseminar através do revestimento da bexiga, invadir a parede muscular e disseminar-se até os órgãos próximos ou gânglios linfáticos, transformando-se num câncer invasivo.

### Estadiamento do Câncer de Bexiga

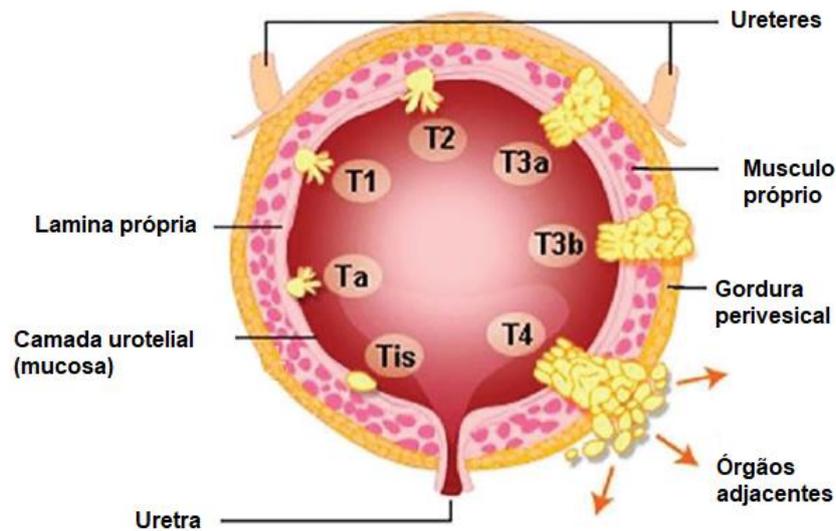


Figura 3.8. Estadiamento do Câncer de Bexiga. Fonte: Durán *et al.*, 2018.

O câncer de bexiga é a segunda neoplasia maligna mais frequente do trato geniturinário e corresponde a aproximadamente 6% de todos os tumores malignos. Esta neoplasia pode ocorrer sob três formas ou tipos: carcinoma de células de transição, carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma, podendo ser classificado como superficial (não invasivo) ou invasivo. Noventa e cinco por cento dos carcinomas de células uroteliais ou carcinomas de células de transição se desenvolvem no interior do trato urinário (Rouprêt *et al.*, 2011; Tyler *et al.*, 2012).

Atualmente, é a 4ª neoplasia mais prevalente no sexo masculino e a 8ª no feminino. Além disso, é mais frequente na raça branca, mais comum em homens que mulheres (proporção 3:1), com maior incidência na sexta década de vida. Esse grupo de tumores apresenta alta taxa de recorrência após ressecção completa do tumor, podendo chegar a 90% caso não seja realizado tratamento complementar intravesical. (Matheus *et al.*, 2010).

O principal fator de risco associado a este câncer é o tabaco, porém outros fatores como idade, exposição ocupacional e hábitos podem ser responsáveis pela doença (Rockenbach *et al.*, 2013). Já o diagnóstico pode ser feito por exames e urina e de imagem como tomografia computadorizada e citoscopia (investigação interna da bexiga com auxílio de uma câmera). Durante a citoscopia podem ser retiradas células para biópsia. No entanto, a probabilidade de cura dependerá da extensão do câncer (superficial ou invasivo) e da idade e saúde geral do paciente (INCAc, 2020).

A mais recente estimativa mundial aponta que o câncer de bexiga foi o 6<sup>o</sup> mais frequente, com uma estimativa de 424 mil casos novos, com um risco estimado de 11,0/100 mil homens. Nas mulheres, ocupou a 17<sup>a</sup> posição e um risco estimado foi de 3,3/100 mil. As maiores taxas de incidência por câncer de bexiga para ambos os sexos ocorreram em países no Sul da Europa, Europa Ocidental e América do Norte (Bray *et al.*, 2018; Ferlay *et al.*, 2018).

Quando diagnosticado precocemente, a maioria dos casos corresponde ao carcinoma não músculo invasivo de bexiga (CNMIB), que não invade a musculatura própria da bexiga, geralmente associado a um bom prognóstico se tratado com ressecção transuretral (procedimento cirúrgico) e com antibioticoterapia intravesical adjuvante (Rockenbach *et al.*, 2013). No entanto, o CNMIB quando invade a lâmina própria, passa a ser classificado como carcinoma músculo-invasivo de bexiga (CMIB), correspondendo a 21-50% dos casos (Van *et al.*, 2018). Neste estágio a doença é potencialmente letal quando não tratada (Antoni *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2014; Pompeo *et al.*, 2008).

O tratamento padrão utilizado para o (CMIB), que é o tipo de câncer mais comum, é a cistectomia radical (Antoni *et al.*, 2017; Porter *et al.*, 2011), contudo esta abordagem é associada a altas taxas de morbidade e complicações pós-cirúrgicas (Jacobs *et al.*, 2010). Diferentes abordagens terapêuticas têm surgido como opção de tratamento alternativo para pacientes com CMIB, como por exemplo, a abordagem trimodal, cujo tratamento é uma combinação de cirurgia, quimioterapia e radioterapia (Antoni *et al.*, 2017; Dietrich *et al.*, 2018; Jacobs *et al.*, 2010).

Deste modo, é importante o desenvolvimento de novas tecnologias para aprimorar os resultados dos tratamentos convencionais e atualmente a aplicação de nanoestruturas vem se mostrando como alternativas interessantes neste âmbito (Pavon *et al.*, 2007; Mirjolet *et al.*, 2013).

Rieger *et al.*, (2015) estudaram o uso de nanotubos de carbono (CNTs) como um dispositivo mucoadesivo para o transporte de fármaco combinado com quimioterápicos no tratamento de câncer de bexiga. Ensaios *in vivo* mostraram que os CNTs foram capazes de se aderirem ao ureotélico da bexiga de ratos. Ensaios de viabilidade celular mostraram que os dispositivos apresentam efeito inibitório das células tumorais. Assim, os autores destacam a potencial utilização das nanoestruturas como um transportador de fármacos no combate ao câncer de bexiga.

Martin *et al.* (2014) exploraram a funcionalização superficial de nanopartículas de poli (ácido-co-glicólico), PLGA, com um polímero penetrante de células uroteliais (PGON), a fim de melhorar a solubilidade aquosa, captação celular urotelial, internalização, efeito citotóxico e duração da ação da droga (Belinostat) carregada na nanopartícula no tratamento de câncer de bexiga. Estudos *ex vivo* e *in vivo* mostraram que a eficiência do comportamento das nanopartículas modificadas inibiram a progressão do câncer para suas formas metastática e agressiva. Assim, os autores demonstraram que as nanopartículas de PLGA combinados com PGON e a droga Belinostat são uma alternativa viável para se atingir o mesmo índice terapêutico observado com o Belinostat livre.

Alban *et al.* (2020) desenvolveram uma nova nanoestrutura híbrida com potencial antitumoral para câncer de bexiga, onde foi incorporado o flavonoide quercetina (Qc) nos nanotubos de titanato de sódio (NaTNT) e zinco (ZnTNT). Testes de liberação de Qc e a avaliação da citotoxicidade em linhas celulares Vero e T24 foram realizados *via* ensaio MTT. O efeito dos TNT-quercetina na radiosensibilidade das células cancerígenas da bexiga T24 foi avaliado, usando proliferação celular e um ensaio clonogênico.

O teste de liberação de Qc ocorreu após 24h e a presença de Zn controlou sua liberação. Os ensaios biológicos indicaram que as nanoestruturas NaTNTQc e ZnTNTQc diminuíram a viabilidade das células T24 após 48h nas seguintes concentrações: (25; 25; 50; 100 e 200 µg/mL). Além disso, o ensaio clonogênico mostrou que NaTNT, NaTNTQc, ZnTNT e ZnTNTQc combinados com radioterapia (5 Gy) reduziram a formação de colônias policlonais de células T24 após 48h. Os resultados sugerem que as nanoestruturas sintetizadas neste estudo interferem na proliferação celular e podem, portanto, ser uma ferramenta poderosa no tratamento do câncer de bexiga.

Li *et al.* (2020) desenvolveram um biosensor com óxido de gálio e zinco (IGZO-FET) de alta estabilidade para a identificação eficiente de biomarcadores de câncer de bexiga a partir de amostras de urina humana. O biosensor IGZO-FET possui excelente desempenho elétrico, alta sensibilidade e também é capaz de detectar diretamente biomarcador de tumor de bexiga na urina humana com alta sensibilidade e especificidade e, assim podendo diferenciar amostras de urina de pacientes com câncer de bexiga de doadores saudáveis de forma eficaz. Este estudo mostrou que ocorre a formação de um filme fino de óxido de gálio e zinco homogêneo e uniforme em grandes áreas. Esta estrutura uniforme permite um sinal elétrico estável de IGZO-FET. Esse biosensor pode ser aplicado para monitorar moléculas-alvo em amostras de urina complexas e para diferenciar as amostras de urina de pacientes com câncer de bexiga e doadores saudáveis, quantificando a quantidade de proteína NMP22 presente. Esses resultados, indicam que esse biosensor de alto desempenho projetado mostra grande potencial na aplicação de dispositivos portáteis de diagnóstico de câncer de bexiga além de seu papel para o diagnóstico digital e câncer de bexiga em estágio inicial.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi dividido em duas etapas. A primeira etapa compreende o desenvolvimento e caracterização das nanoestruturas de óxido de zinco, já a segunda etapa envolve a avaliação das propriedades biológicas das nanoestruturas (Figura 4).

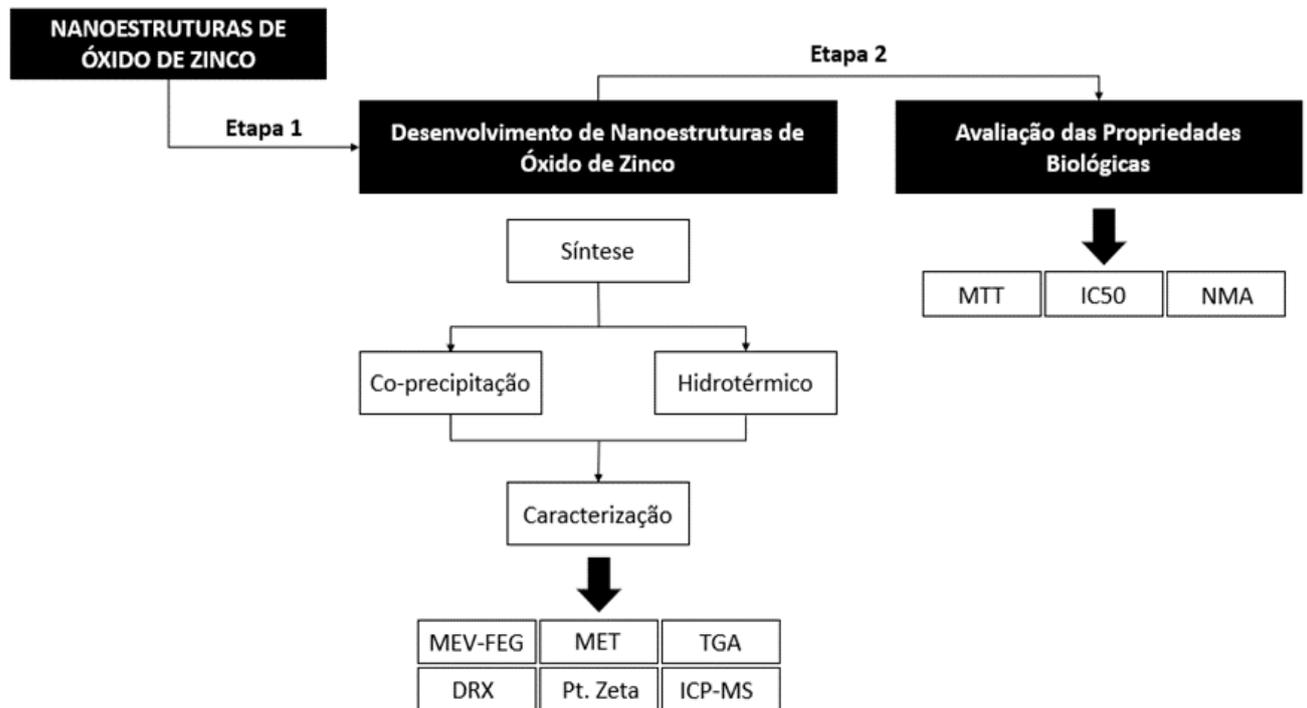


Figura 4. Esquema representativo do desenho experimental desta pesquisa.

Neste trabalho, todas as reações de síntese foram realizadas no Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR) da Escola Politécnica da PUCRS. Os estudos in vitro de avaliação das propriedades biológicas das nanoestruturas realizados no Laboratório de Farmacologia Aplicada (LAFAP) da Escola de Ciências da Saúde e da Vida da PUCRS. Para facilitar a identificação das nanoestruturas desenvolvidas neste estudo, o Quadro 1 mostra a nomenclatura usada para as seis nanoestruturas desenvolvidas, bem como o método de síntese.

Quadro 1. Nomenclatura utilizada para as nanoestruturas de ZnO sintetizadas.

| <b>Nome da Nanoestrutura</b> | <b>Método</b>        | <b>Morfologia</b>        |
|------------------------------|----------------------|--------------------------|
| ZnO-CPB                      | Co-precipitação (CP) | B- Bastões               |
| ZnO-CPL                      |                      | L- Lâminas               |
| ZnO-CPBH                     |                      | BH-Bastões<br>Hexagonais |
| ZnO-CPBC                     |                      | BC-Bastões<br>Côncavos   |
| ZnO-CPFR                     |                      | FR-Flores Rugosas        |
| ZnO-HL                       | Hidrotérmico (H)     | L- Lâminas               |

#### 4.1. Materiais Utilizados

Os reagentes e materiais utilizados foram obtidos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia (Quadro 2).

Quadro 2. Relação dos reagentes utilizados.

| <b>Materiais e Reagente</b>         | <b>Pureza</b> | <b>Marca</b>                               | <b>Observação</b>   |
|-------------------------------------|---------------|--|---|
| Nitrato de Zinco Hexahidratado      | 96%           | Neon                                       | —   |
| Hidróxido de Amônio P.A             | ≥ 99%         | Synth                                      | —   |
| Etilenoglicol                       | ≥ 99%         | Synth                                      | —   |
| Etanol                              | ≥ 99%         | Vetec                                      | —   |
| Hexametilenotetramina (HMT)         | ≥ 99%         | Merck                                      | —   |
| Hidróxido de Potássio Lentilhas P.A | ≥ 99%         | Synth                                      | —   |
| Acetato de Zinco                    | ≥ 99%         | Neon                                       | —   |
| Hidróxido de sódio Lentilhas P.A    | ≥ 99%         | Vetec                                      | —   |
| RPMI                                | —             | Life Technologies                          | Roswell Park Memorial Institute   |
| DMEM                                | —             | Life Technologies                          | Dulbecco's Modified Eagle Medium  |
| Tripsina com EDTA 0.5%              | —             | Life Technologies                          | —   |
| Fungizona                           | —             | Life Technologies                          | —   |
| Penicilina-Estreptomicina           | —             | Life Technologies                          | —   |
| Soro Fetal Bovino                   | —             | Life Technologies                          | —   |
| DMSO                                | —             | Sigma-Aldrich                              | —   |
| <b>Linhagens Celulares</b>          |               |  |   |
| T24                                 | —             | ATCC<br>(American Type Culture Collection) | Linhagem de carcinoma de células de transicionais de câncer de bexiga humano (Grau III) |
| Vero                                | —             |  | Linhagem de células de rim de macaco verde africano                                     |

## 4.2. Desenvolvimento de Nanoestruturas de ZnO

Neste estudo foram utilizados dois métodos para a obtenção das nanoestruturas de óxido de zinco: co-precipitação e hidrotérmico.

### 4.2.1. Método de co-precipitação

#### Síntese das nanoestruturas ZnO-CPB e ZnO-CPL

Nanoestruturas de óxido de zinco, respectivamente ZnO-CPB e ZnO-CPL foram preparadas através de uma adaptação do método de co-precipitação descrito por Naila *et al.* (2018). Em um procedimento típico, 45 g (0,1513 mols) de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  foi dissolvido em 100 mL de água deionizada e adicionado em um balão de 3 bocas. Na sequência, 31 g (0,49 mols) de EG também foi adicionada ao reator. Ao atingir 30 °C no sistema, 1 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado foi acrescentado a reação, e mantida sob agitação magnética a 30° C por 20 min. Após esse período, o produto final foi lavado em centrifugação (3600 rpm por 2 min) e lavado 3x com água destilada e 1x com etanol. Em seguida, o sólido obtido foi seco em estufa a 80 °C por 12h e guardado em dessecador para posterior caracterização. O método de obtenção de ZnO-CPL foi similar ao descrito acima, modificando apenas a quantidade de  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado adicionada ao sistema (22mL) e a temperatura reacional (80°C). O sistema reacional utilizado em ambas as sínteses foi composto de um balão de 3 bocas com capacidade para 500mL. A este foram acoplados o sistema de refluxo, agitação magnética, termopar e funil de adição para adição controlada de  $\text{NH}_4\text{OH}$ .

#### Síntese das nanoestruturas ZnO-CPBH e ZnO-CPBC

As nanoestruturas ZnO-CPBH e ZnO-CPBC foram sintetizadas segundo o método descrito por Yu *et al.* (2007). Duas soluções foram preparadas previamente: a) 2,97 g (0,001mols) de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  em 100 mL de água deionizada; b) 1,40 g de HMT (0,001mols) em 100 mL de água deionizada. Em seguida, as duas soluções foram misturadas e agitadas por cerca de 5 minutos. A mistura das soluções foi adicionada a um balão de fundo redondo e mantida sob aquecimento (90°C) e em refluxo por 10h para a nanoestrutura ZnO-CPBH e por 24h para a nanoestrutura ZnO-CPBC sob agitação magnética. Após o tempo de aquecimento, o produto final

de cada mistura reacional foi centrifugado (3600 rpm por 2 min) e lavado 3x com água destilada e 1x com etanol. A secagem foi em estufa a 60 °C por 24h.

### **Síntese da nanoestrutura ZnO-CPFR**

A nanoestrutura ZnO-CPFR foi sintetizada segundo o método descrito por Li *et al.* (2019). Em uma síntese típica, duas soluções foram previamente preparadas: a) 1,142 g (0,0038 mols) de  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  em 20 mL de água deionizada; b) 0,0416g (0,001 mols) de NaOH em 20 mL de água deionizada. As soluções foram solubilizadas e a mistura final foi mantida a 60°C e sob agitação magnética forte por 1h30. O produto final foi centrifugado (3600 rpm por 2 min) e lavado 3x com água destilada e 1x com etanol. A secagem foi em estufa por 12h a 60°C. O sistema reacional utilizado foi um balão de fundo redondo, no qual foi acoplado um sistema de refluxo, o aquecimento foi feito com um banho de óleo.

#### **4.2.2. Método hidrotérmico**

### **Síntese da nanoestrutura ZnO-HL**

A nanoestrutura ZnO-HL foi preparada através do método hidrotérmico descrito na literatura através do estudo do Yu *et al.* (2018). Duas soluções foram preparadas previamente: a) 0,2195 g (0,001 mols) de acetato de zinco em 10 mL de água deionizada; b) 0,5610 g (0,001 mols) de hidróxido de potássio em 30 mL de água deionizada. As soluções foram misturadas e mantidas sob agitação magnética forte por 30 minutos. Após, a mistura foi transferida para um reator do tipo autoclave com copo de teflon e mantido a 120°C por 12h. Por fim, o produto sólido final foi centrifugado (3600 rpm por 2 min) e lavado por 5x com água destilada e 1x com etanol.

## **4.3. Técnicas de Caracterização**

### **4.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG)**

Esta técnica foi utilizada inicialmente para avaliar a morfologia dos óxidos de zinco nanoestruturados obtidos. A análise de MEV foi realizada em equipamento FEI Inspect F50 no modo de captura de elétrons secundários (SE) disponível no

Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCEMM) da PUCRS. As amostras foram dispostas em *stubs* e recobertas com uma fina camada de ouro. Para a obtenção das micrografias foi aplicada uma voltagem de 10 kV.

#### **4.3.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

A utilização desta técnica teve como objetivo verificar a morfologia das nanoestruturas sintetizadas. A análise foi realizada em um equipamento FEI, modelo Tecnai G2 T20, no Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCEMM) da PUCRS. As amostras foram suspensas em acetona e permanecerem em um ultrassom por 5 min, sendo colocadas em *grids* de cobre com filme de carbono (300 mesh).

#### **4.3.3. Difração de Raios X (DRX)**

Para a caracterização da estrutura cristalina das nanoestruturas elaboradas utilizou-se a técnica de DRX. Todos os materiais foram analisados sob a forma de pó em um difratômetro D8 Advance (Bruker), radiação  $\text{CuK}\alpha$  operando com voltagem de 40kV e corrente de 20 mA, varredura de  $2\theta$  de  $5^\circ$  a  $80^\circ$ , passo de  $0,053^\circ$  e tempo de contagem de 1,0 s. As análises foram realizadas no Laboratório de Sedimentologia e Petrologia (LASEPE) do Instituto do Petróleo e dos Recursos Naturais (IPR) da PUCRS.

#### **4.3.4. Análise Termogravimétrica (TGA)**

A técnica de TGA foi utilizada a fim de avaliar a estabilidade térmica das nanoestruturas de óxido de zinco. O equipamento utilizado foi um SDT modelo Q 600 (TA *instruments*) em atmosfera de  $\text{N}_2$  com rampa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  a partir da temperatura ambiente até  $1000^\circ\text{C}$ .

#### **4.3.5. Análise de Tamanho de Partícula e Potencial Zeta**

O tamanho médio de partícula e o índice de polidispersão (PDI) das nanoestruturas de ZnO sintetizadas foram determinados por espalhamento de luz dinâmico (DLS) utilizando o Malvern Zetasizer Nano ZS 3600 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK). A preparação da amostra envolveu a diluição das

nanoestruturas em uma alíquota de 1 mL de água ultrapura, adicionado em um porta amostra de quartzo. A análise foi realizada em angulação incidente de 90° a 25°C. Adicionalmente, as amostras em tubos capilares foram analisadas a 25 °C para avaliação dos valores de carga superficial por potencial zeta. As amostras foram analisadas em triplicatas.

#### **4.3.6. Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado individualmente (ICP-MS)**

As análises foram realizadas a partir da adaptação de uma metodologia desenvolvida e validada pelo laboratório INTOX (Instituto de Toxicologia da PUCRS) em ICP-MS, modelo 7700x, Agilent, operado no modo He contendo um percentual de óxidos (CeO/Ce) inferiores a 1% e carga +2 (Ba<sup>2+</sup>/Ba<sup>+</sup>) inferiores a 3%. Foram monitorados os isótopos <sup>64</sup>Zn e <sup>66</sup>Zn, sendo o último selecionado devido a maior intensidade de sinal e a verificação da ausência de efeitos dos constituintes poliatômicos da matriz. As condições de análise utilizadas foram: Potência: 1550W, Velocidade de nebulização: 0,1 rps, gás carreador: 1,3 L/min, gás Switch: make-up = 0 L/min, energia de discriminação cinética: 5V, fluxo da cela de colisão: 4 L/min He. Tempo de amostragem (triplicata): 0,3 s e profundidade da amostra: 10 mm. As amostras foram feitas em triplicatas e digeridas com ácido nítrico destilado e diluídas com água do tipo 1 para 2% de HNO<sub>3</sub> e injetadas no ICP-MS.

### **4.4. Ensaios *in Vitro***

#### **4.4.1. Cultura e manutenção das células**

As linhagens celulares utilizadas neste estudo foram de carcinoma de células transicionais de bexiga humana (T24) e células renais de macaco verde africano (Vero), ambas obtidas da ATCC. As células T24 foram cultivadas em meio RPMI e, a linhagem Vero foi cultivada em meio DMEM, ambos os meios contendo 0,5 U/mL dos antibióticos (penicilina/estreptomicina), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantida em temperatura de 37°C, com umidade relativa do ar de 95% e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Para a realização dos experimentos as células foram tripsinizadas e plaqueadas conforme a necessidade.

#### 4.4.2. Preparação das Amostras

Todas as amostras sintetizadas neste estudo foram suspensas em meio de cultura (RPMI-1640 ou DMEM) na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$  e serialmente diluída em diferentes concentrações (Figura 4.1). Para garantir a uniformidade da suspensão, as amostras foram agitadas em vórtex antes do uso.

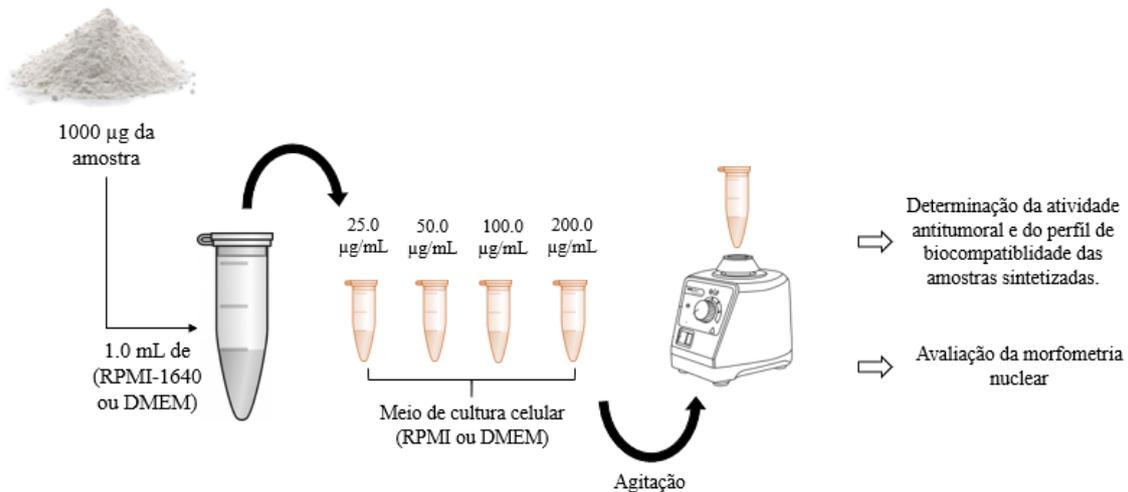


Figura 4.1. Desenho experimental da preparação das amostras para os determinados estudos.

#### 4.4.3. Ensaio de Viabilidade Celular (MTT)

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. O princípio deste método descrito por Mosman (1983) consiste em medir a viabilidade celular pela atividade metabólica mitocondrial das células vivas, no qual é quantificada pela redução do MTT (coloração amarela) em cristais de Formazan (coloração roxa). Desta forma, a redução do MTT é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (Figura 4.2).

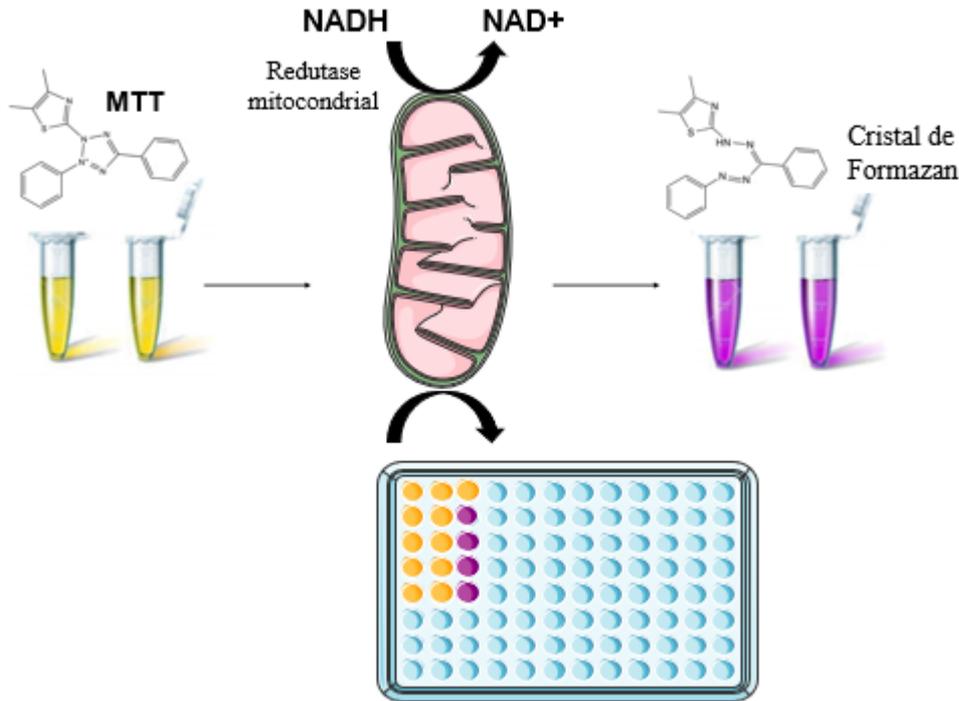


Figura 4.2. Esquema representativo do princípio de MTT.

Para avaliação da viabilidade celular, as linhagens T24 e Vero foram plaqueadas numa densidade de  $5 \times 10^3$  células por poço em placas de 96 poços. Após a confluência foram tratadas com diferentes concentrações das nanoestruturas sintetizadas e incubadas por 24h (conforme Quadro 3).

Quadro 3. Desenho experimental dos ensaios por MTT.

| Tratamento      | Concentrações                             | Linhagem Celular |
|-----------------|---|------------------|
| Controle (RPMI) | -   | Vero             |
| Controle (DMEM) | -   | T24              |
| ZnO-CPB         | 25; 50; 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | T24 e Vero       |
| ZnO-CPL         |   |                  |
| ZnO-CPBH        |   |                  |
| ZnO-CPBC        |   |                  |

Após 24 h de tratamento as células foram lavadas com PBS e a foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução de MTT 0,5% por poço. Após 3h de incubação, o meio foi removido e a placa foi mantida em temperatura ambiente por 24 h, para secagem. Na sequência, os cristais de Formazan foram eluídos em 100  $\mu\text{L}$  de

DMSO. A densidade óptica de coloração foi determinada por espectrofotômetro (SpectraMax Plus) a 570 nm (Nicoletti *et al.*, 2017). A viabilidade celular (VC) foi determinada em percentual da absorbância dos grupos tratados em relação ao grupo que não recebeu tratamento (controle) conforme equação 1 (Eq. 1):

$$VC (\%) = \left( \frac{ABS_{Células\ tratadas}}{Média\ ABS_{Células\ não\ tratadas}} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

#### 4.4.4. Determinação dos valores de IC<sub>50</sub>

A concentração necessária para inibir a viabilidade das células T24 e Vero em 50% (IC<sub>50</sub>) foi determinada em relação com as células não tratadas (grupo controle). A determinação dos valores de IC<sub>50</sub> foi calculada plotando o percentual da VC em relação ao logaritmo das concentrações das nanoestruturas sintetizadas.

#### 4.4.5. Análise da morfometria nuclear (NMA)

A morfometria nuclear é a descrição quantitativa dos achados geométricos da estrutura nuclear em qualquer dimensão. A análise morfométrica nuclear foi realizada para rastrear o destino celular (ou seja, apoptose, senescência ou catástrofe mitótica) com base na forma e no tamanho do núcleo conforme descrito por Chiela *et al.*, 2012. Para realização desta análise, as células T24 foram plaqueadas numa densidade de 30 x 10<sup>3</sup> células por poço em placas de 24 poços por 24 h. Após incubação, foram tratadas pelo (ZnO-CPL) em diferentes concentrações (25; 25; 50; 100 e 200 µg/mL). Após 24 h, as células tratadas foram fixadas com para formaldeído (4%) e coradas com DAPI (300 nM) em quarto escuro e a temperatura ambiente. As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência, seguidas de análise no software Image-Pro Plus 6.0 (IPP6, Media Cybernetics). Os contornos nucleares foram delimitados, seguido da aquisição das seguintes variáveis: *Area*, *Radiusratio (Rr)*, *Roundness (Rou)*, *Aspect (Asp)* e *Areabox (Arbx)*.

Após a aquisição, os dados foram transferidos para uma planilha, onde a análise da área nuclear *versus* forma é realizada. A forma nuclear é definida pelo índice de irregularidade nuclear (INN), que é calculado pela Equação 2, conforme

descrito por Chiela *et al.* (2012).

$$INN = 0,9 \times Asp - 0,87 \times Arbx + 0,96 \times Rr + 0,92 \times Rou \quad (\text{Eq.2})$$

Por meio dessa análise, os núcleos são classificados de acordo com o tamanho e a morfologia: normal (N), pequeno e regular (SR), pequeno e irregular (SI), grande e regular (LR), grande e irregular (LI). Os núcleos SR correspondem tipicamente a células apoptóticas, enquanto LR e LI correspondem a núcleos de células senescentes.

#### **4.4.6. Análise estatística**

Os resultados obtidos nos experimentos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e as análises estatísticas foram realizadas através do teste t de Student por meio de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo pos-hoc de Tukey. Valores de p menores do que 0,05 foram considerados como indicativos de significância.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Caracterização de nanoestruturas de Zinco

#### 5.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A fim de avaliar a morfologia das nanoestruturas de óxido de zinco obtidas pelos métodos de co-precipitação e hidrotérmico, foram realizadas análises de MEV-FEG e MET. As micrografias obtidas são mostradas respectivamente na Figura 5.1 e 5.2.

A morfologia obtida para a nanoestrutura ZnO-CPB (Figura 5.1a) foi de bastão, predominantemente, com pequenas quantidades de aglomerados de placas lamelares. Pela MET, conforme Figura 5.2a, também foi observado as mesmas morfologias.

O ZnO-CPL (Figuras 5.1b e 5.2b) apresentou uma morfologia de lâminas com dimensões diferentes. Estas morfologias encontradas para o ZnO-CPB e ZnO-CPL são similares às encontradas por Zubair *et al.* (2019). Destaca-se aqui que a diferença de temperatura tem um papel importante para a mudança de morfologias, além disso, os autores mencionam que a baixa temperatura favorece o crescimento de nanopartículas. Liu *et al.* (2020) em seu estudo sobre cinética microscópica, concluíram que a baixa temperatura propicia ao crescimento de nanopartículas durante a etapa de síntese química.

As Figuras 5.1c e 5.2c (nanoestrutua ZnO-CPBH) mostram o início do crescimento de bastões a partir de um núcleo, as quais evidenciam as pontas dos bastões crescendo em várias direções. Para fins de diferenciação, nomeamos como morfologia bastão hexagonal.

As Figuras 5.1d e 5.2d mostram que a nanoestrutura ZnO-CPBC apresentou uma morfologia de bastões com pontas desbastadas e finas. Para fins de diferenciação, nomeamos como morfologia bastão cônico. Morfologias semelhantes

foram obtidas por Yu *et al.* (2007), o qual obteve o mesmo efeito de crescimento para bastões de ZnO em diferentes tempos reacionais, tais como: 30 min, 2h, 10h, 18h, 48h e 72h.

As Figuras 5.1e e 5.2e mostram a morfologia obtida para a nanoestrutura ZnO-HL, na forma de lâminas e as Figuras 5.1f e 5.2f mostram a morfologia de flores rugosas para a nanoestrutura ZnO-CPFR.

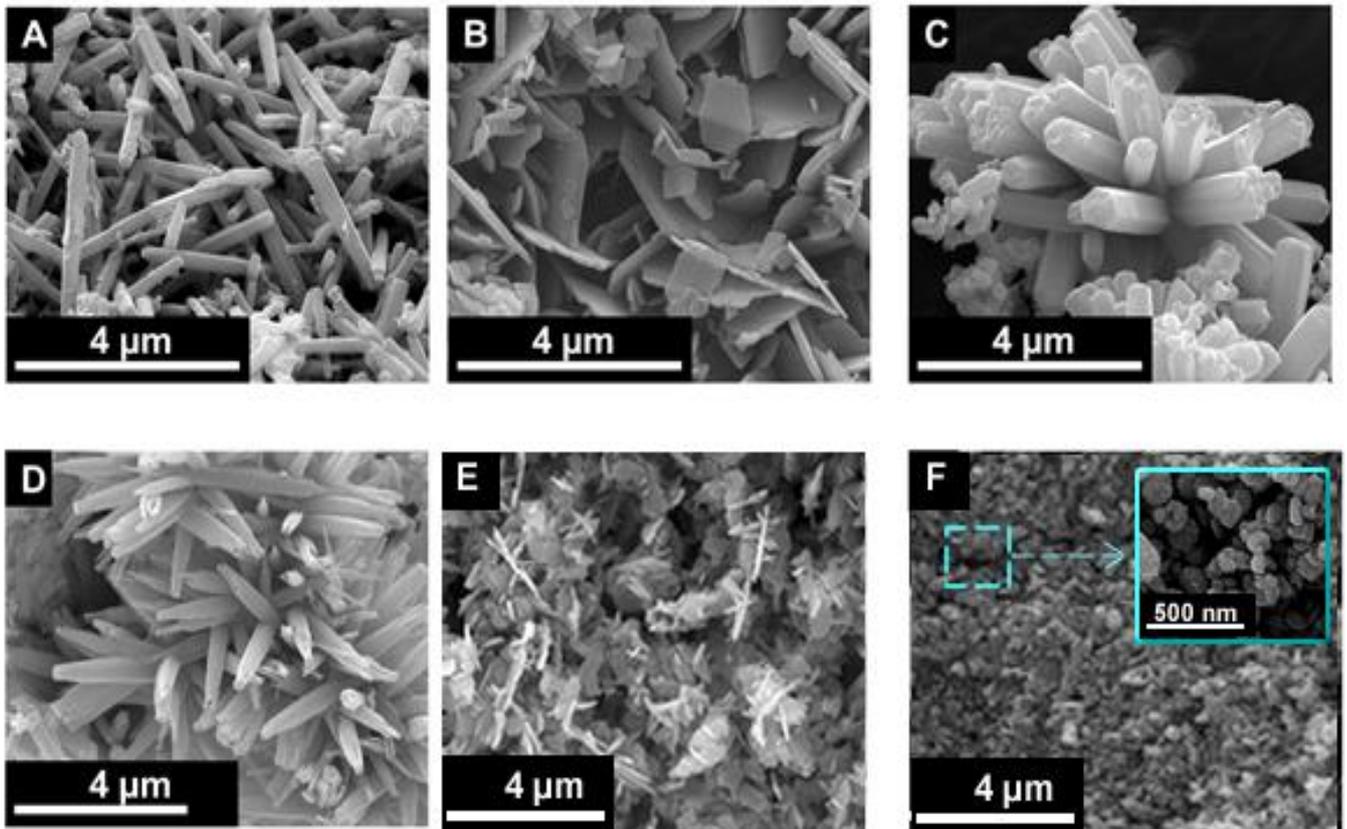


Figura 5.1. Imagens obtidas por MEV (magnificação de 40.000x) para (a) ZnO-CPB, (b) ZnO-CPL, (c) ZnO-CPBH, (d) ZnO-CPBC, (e) ZnO-HL, e (f) CPFR.

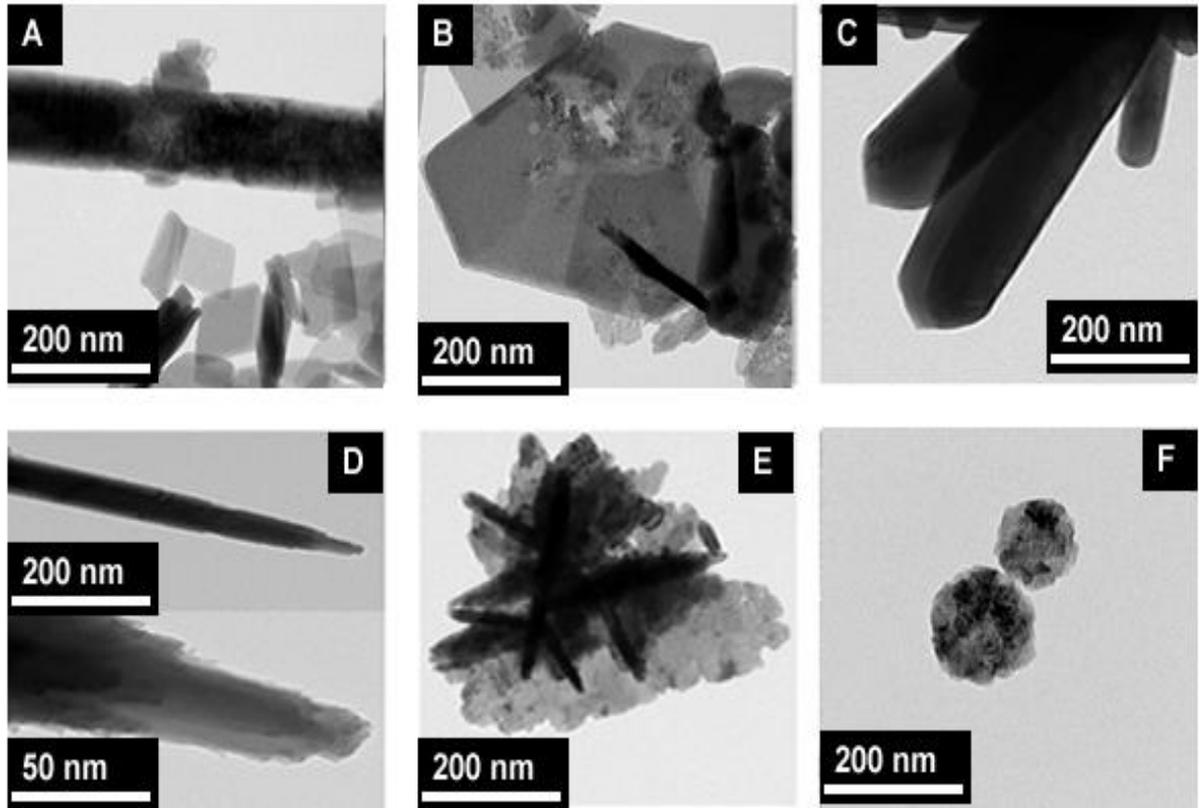


Figura 5.2. Imagens obtidas por MET para (a) ZnO-CPB (magnificação 31.000 x); (b) ZnO-CPL (magnificação 35.000 x); (c) ZnO-CPBH (magnificação 35.000 x); (d) ZnO-CPBC (magnificação 35.000 x); (e) ZnO-HL (magnificação 88.000 x); (f) ZnO-CPFR (magnificação 26.500 x).

### 5.1.2. Difração de Raios X (DRX)

A técnica de DRX foi utilizada para avaliar a estrutura química das seguintes nanoestruturas de ZnO sintetizadas: ZnO-CPB, ZnO-CPL, ZnO-CPBH e ZnO-CPBC (Figura 5.3), não foi possível realizar esta análise para as demais nanoestruturas (ZnO-HL e ZnO-CPFR) devido a indisponibilidade do equipamento.

Os difratogramas obtidos apresentaram picos característicos em  $31,2^\circ$ ;  $34,1^\circ$ ;  $36,6^\circ$ ;  $47,4^\circ$ ;  $56,2^\circ$ ;  $62,5^\circ$ ;  $66,3^\circ$ ;  $67,3^\circ$ ;  $69,3^\circ$  e  $72,7^\circ$  correspondendo aos planos cristalinos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (112) e (200) correspondentes a uma estrutura hexagonal Wurtzita (Safaa *et al.*, 2021; Patel *et al.*, 2020; Perillo *et al.*, 2018; Akhtar *et al.*, 2017). Esta estrutura pode ser descrita como camadas de íons  $Zn^{2+}$  + e  $O^{2-}$  empilhados alternadamente, resultando em um cristal polar de ZnO, como mostrado na seção 3.1.1.

Há uma segunda fase cristalina que é identificada pelos sinais em torno de

9,2 °, 18,2 ° e 19,7 ° pode ser atribuído ao composto lamelar de hidróxi nitrato de zinco ( $Zn_5(OH)_5(NO_3)_2(H_2O)_2$ ) similar ao encontrado na literatura. (Ramesh *et al.*,2015). De forma geral, a não obtenção somente da nanoestrutura de ZnO (estrutura Wurtzita) pode estar associado a ausência de tratamento térmico das nanoestruturas sintetizadas.

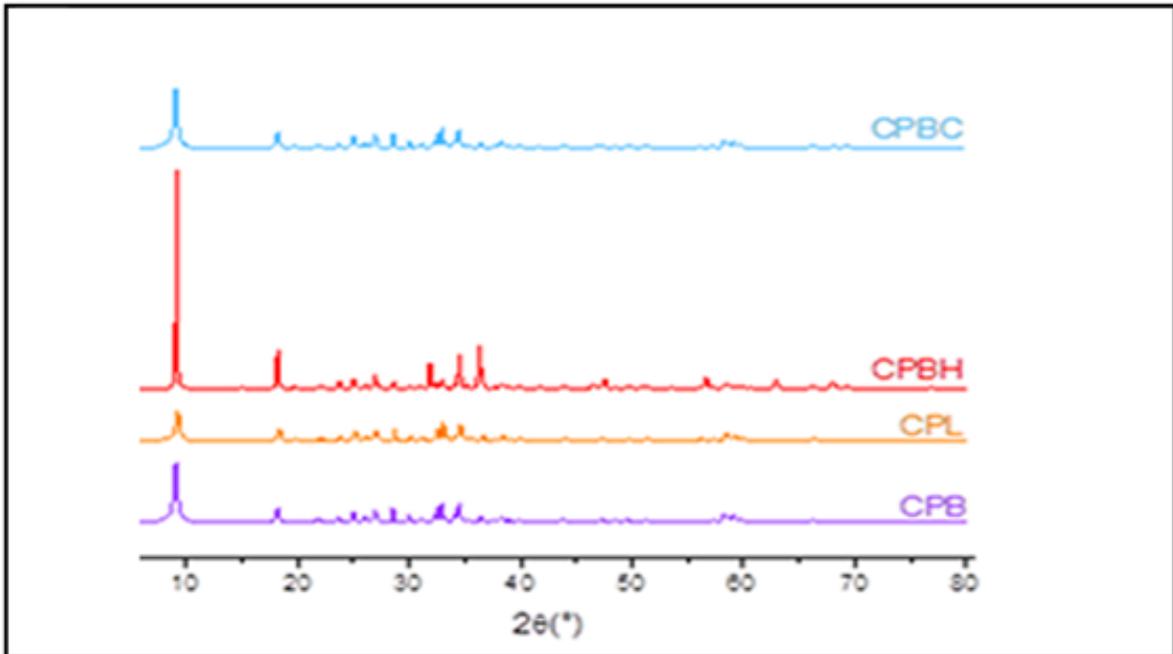


Figura 5.3. Difratomogramas obtidos para (a) ZnO-CPB (b) ZnO-CPL (c) ZnO-CPBH (d) ZnO-CPBC.

### 5.1.3. Análise Termogravimétrica (TGA)

A TGA foi realizada com o objetivo de investigar a estabilidade térmica das nanoestruturas ZnO-CPB; ZnO-CPL; ZnO-CPBH; ZnO-CPBC; ZnO-CPFR e ZnO-HL. A figura 5.4a apresenta os termogramas (TG) e a figura 5.4.b apresenta as derivadas das curvas termogravimétricas (DTG) para as nanoestruturas de zinco.

As nanoestruturas ZnO-CPB (bastões) e ZnO-CPL (lâminas) apresentaram um comportamento de degradação térmica semelhante descrito por, pelo menos, quatro eventos térmicos iniciando abaixo de 100 °C até em torno de 400°C (Figura 5.4b) com perdas totais de massa em torno de 36% e 34%, respectivamente. A literatura (Ramesh *et al.*,2015), mostra que o composto hidróxi nitrato de zinco possui degradação nesta região com perdas de massas em torno de 50% indicando o alto teor de perda de água. A degradação que ocorre entre 120° e 270°C é atribuída a decomposição de íons nitratos e próximo a 264°C corresponde à

formação de ZnO (Oliveira *et al.*, 2016).

No entanto, as nanoestruturas ZnO-CPBH (bastão hexagonal), ZnO-CPBC (bastão cônico), ZnO-HL (lâminas), ZnO-CPFR (flores rugosas) apresentaram um perfil de degradação bem diferente das duas primeiras ZnONPs, onde as temperaturas iniciais de degradação foram acima de 220 °C e com perdas de massa de até 2%. Com exceção para a nanoestrutura ZnO-CPFR que apresentou uma perda de massa de 7%. Estes resultados indicam que pequeno teor de água ou grupos OH estão presentes nestas nanoestruturas.

Por fim, estes resultados corroboram os resultados obtidos por DRX, onde se observou uma predominância de mistura de nanoestruturas de ZnO nas amostras analisadas de ZnO-CPB e ZnO-CPL comparadas as demais ZnONPs sintetizadas.

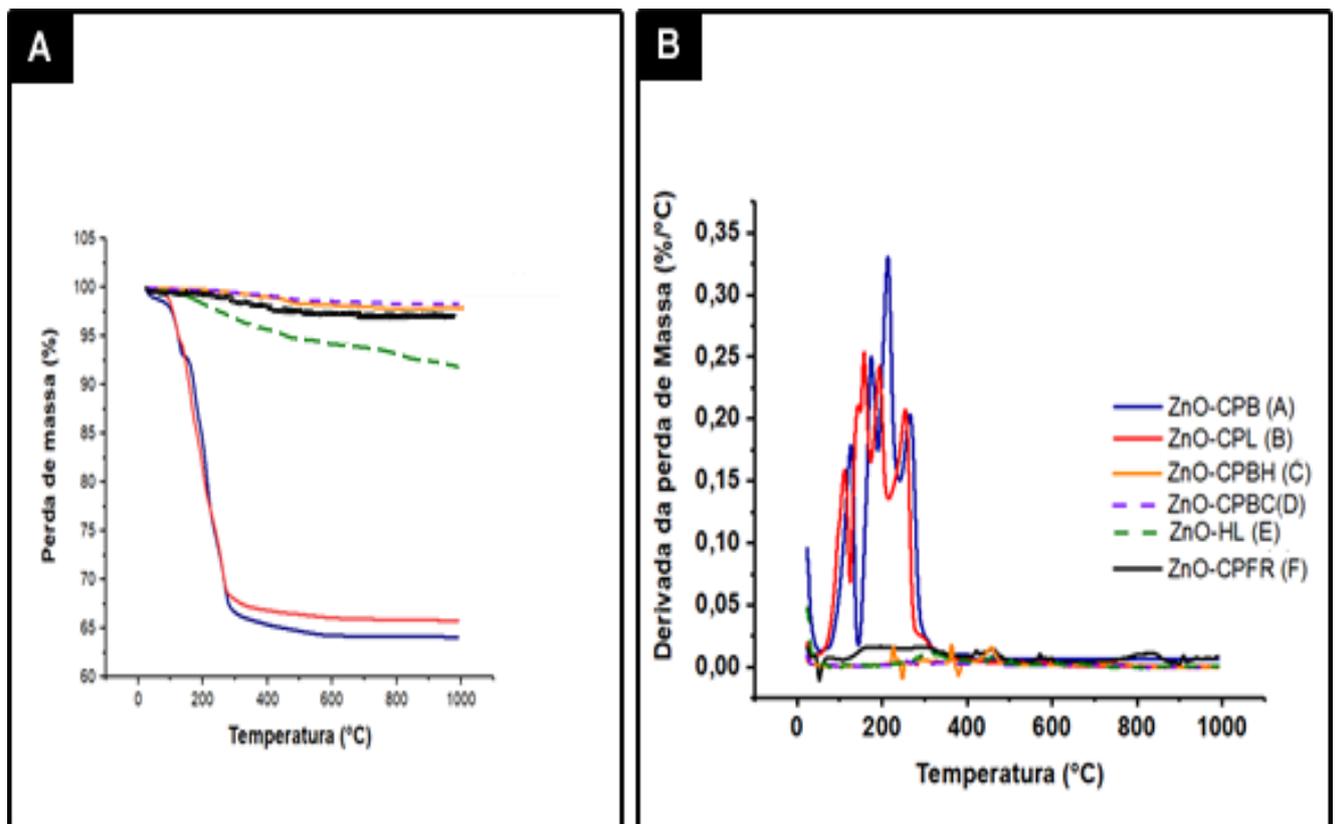


Figura 5.4. Curvas de a) TG e b) DTG para ZnO-CPB; ZnO-CPL; ZnO-CPBH; ZnO-CPBC; ZnO-CPFR e ZnO-HL.

No entanto, as razões para exibirem diferentes morfologias de ZnO podem ser atribuídas ao uso de soluções distintas mostrando basicidade diferentes nas

sínteses e também durante o processo de nucleação e crescimento cristalino (Zhang et al., 2002).

#### **5.1.4. ICP-MS**

A técnica de ICP-MS foi usada para determinar a quantidade de zinco metálico (% Zn) presente nas nanoestruturas sintetizadas, obtendo-se valores de 32,3% para ZnO-CPB, 49,8% para ZnO-CPL, 67,5% para ZnO-CPBH e 70,4% para ZnO-CPBC.

A variação de concentração de íons zinco nas diferentes ZnONPs sintetizadas, pode estar associada a existência de outras estruturas de zinco com composição química diferente, como evidenciado nos resultados de DRX. Os menores percentuais de Zn obtidos (< 50%) nas nanoestruturas ZnO-CPB (bastões) e de ZnO-CPL (lâminas) podem ser devido a maior presença de hidróxido de zinco também formado como resultado da baixa temperatura e/ou da quantidade de  $\text{NH}_4\text{OH}$  usados na sínteses (Yamabi *et al.*, 2002). No entanto, para as nanoestruturas de ZnO-CPBH (bastões hexagonais) e de ZnO-CPBC (bastões cônicos) obteve-se percentuais de Zn mais altos (> 60%) indicando que ZnONPs do tipo Wurtzita devem estar predominantemente presentes. Este resultado mostra que as condições utilizadas nas sínteses destas duas nanoestruturas parecem ser mais adequadas para a obtenção de ZnONPs do tipo Wurtzita.

## **5.2. Avaliação das Propriedades Biológicas**

### **5.2.1. Avaliação da atividade citotóxica das nanoestruturas de zinco**

O câncer de bexiga é considerado uma das piores doenças que acometem o sistema geniturinário devido a sua complexidade genômica, que é capaz de reduzir a eficácia e promover resistência aos tratamentos disponíveis na clínica para este tipo tumoral (Mushtaq *et al.*, 2019). A linhagem T24 de tumor de bexiga humana tem sido usada como modelo de tumor maligno-invasivo de bexiga, uma vez que as células T24 são derivadas de carcinoma de células transicionais com potencial metastático de grau III (Castiglioni *et al.*, 2015). Por outro lado, a célula Vero tem sido utilizada

em estudos pré-clínicos como modelo não-tumoral para verificar toxicidade de compostos químicos em nível molecular contra células saudáveis (Ammerman *et al.*, 2008).

Recentemente, as nanoestruturas baseadas em metal têm sido exploradas em diversos estudos que objetivam o avanço do tratamento para diferentes tipos tumorais (câncer de colón-retal, mama, pulmão, pâncreas, ovário, bexiga, entre outros) (Premanathan *et al.*, 2011; Selim *et al.*, 2012; Bendale *et al.*, 2017, Alban *et al.*, 2020). Entre as principais características para este tipo de biomaterial está a capacidade de atuar atingindo somente a região tumoral (atividade antitumoral seletiva) e protegendo o restante do corpo (biocompatibilidade) (Alban *et al.*, 2020).

Neste estudo, avaliamos a toxicidade *in vitro* das quatro nanoestruturas de zinco obtidas por síntese de co-precipitação a partir do sal nitrato de zinco e o hidróxido de amônio (ZnO-CPB e ZnO-CPL), bem como, do nitrato de zinco e hexametilenotetramina (ZnO-CPBH e ZnO-CPBC) como biomateriais com ação antitumoral contra as células Vero e T24 a concentrações crescentes (25, 50, 100 e 200 µg/mL) por 24h. A análise do ensaio de MTT permitiu observar diferentes graus de resposta estatisticamente significativa em relação as características de biocompatibilidade e atividade antitumoral das nanoestruturas de zinco compatíveis com o que se deseja para biomateriais para este tipo de aplicação (maior toxicidade contra célula tumoral em relação as células saudáveis) (Figura 5.5 e Tabela 1).

Os dados da atividade antitumoral (Figura 5.5 e Tabela 1) obtidos permitiram verificar, que a nanoestrutura ZnO-CPB promoveu redução da viabilidade tumoral de 24.9% e 56.4% nas concentrações de 100 e 200 µg/mL ( $p < 0.05$  e  $p < 0.001$ ). Para a nanoestrutura ZnO-CPL, a inibição da viabilidade foi de 61,3%, 58,0% e 65,5% nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL ( $p < 0.001$ ). Enquanto ZnO-CPBH (34,6%, 69,1%, 68,4% e 71,3%) e ZnO-CPBC (38,6%, 65,6%, 65,4% e 69,7%) exibiu um efeito inibidor em todas as concentrações testadas respectivamente ( $p < 0.001$ ).

Do mesmo modo foi avaliado as características de biocompatibilidade das nanoestruturas contra células vero, a citocompatibilidade obtida neste estudo mostrou que as nanoestruturas ZnO-CPB e ZnO-CPL possuem uma faixa de concentração menos tóxicas do que as nanoestruturas ZnO-CPBH e ZnO-CPBC (Figura 5.5). A toxicidade foi significativa a uma concentração de 200 µg/mL ( $p < 0.001$ ) para todas as nanoestruturas, ZnO-CPB, ZnO-CPL, ZnO-CPBH e ZnO-CPBC. A nanoestrutura ZnO-CPBH apresentou toxicidade em todas as

concentrações avaliadas (com redução crescente da viabilidade de 15,5%, 30,9%, 52,4% e 54,0%), enquanto ZnO-CPBC apresentou toxicidade nas concentrações de 50, 100 e 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (com redução de 25,9%, 52,2% e 60,6%, respectivamente) ( $p < 0.001$ ).

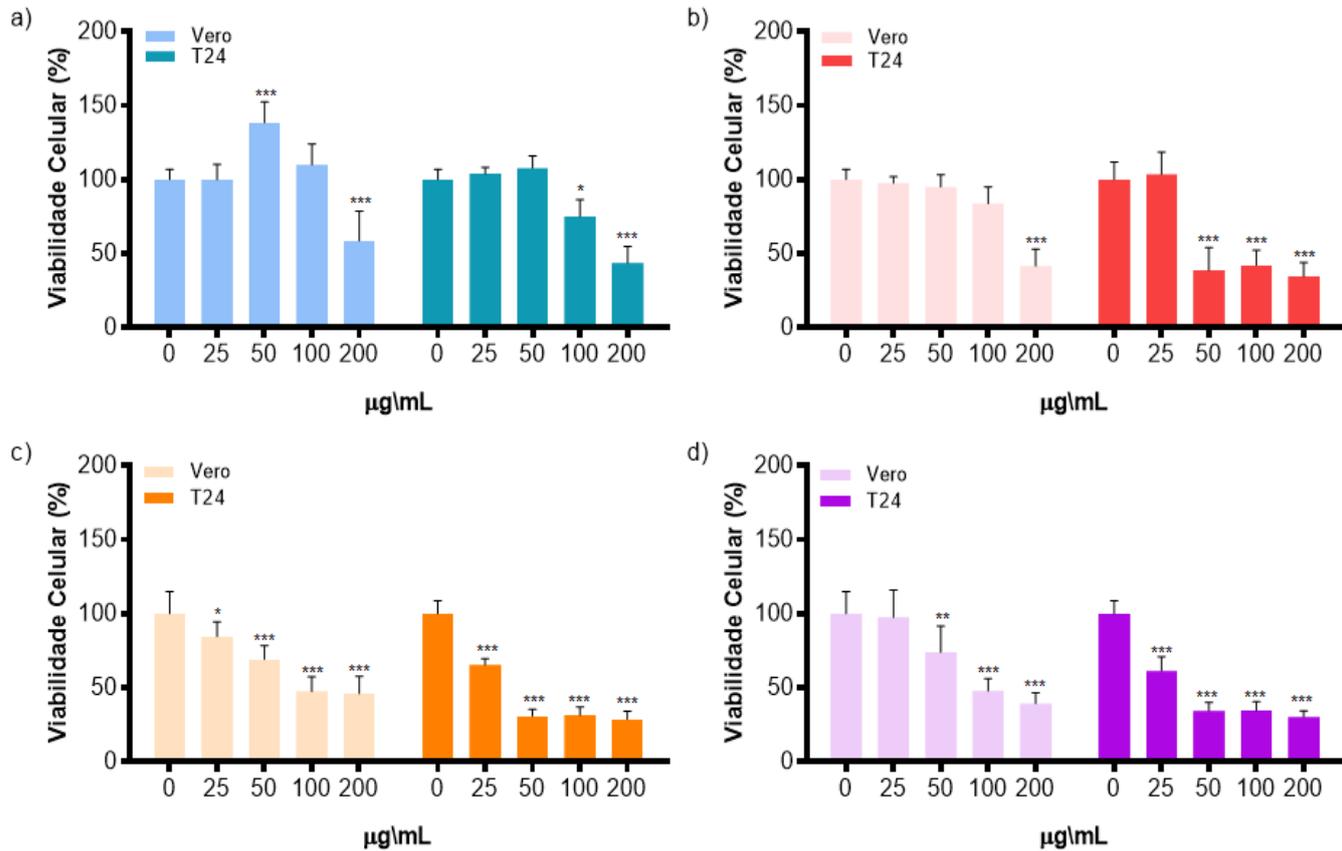


Figura 5.5: Efeito das nanoestruturas ZnO-CPB (a), ZnO-CPL (b), ZnO-CPBH (c) e ZnO-CPBC (d) na viabilidade celular das linhagens vero e T24 por meio do ensaio MTT após 24 h. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata  $\pm$  DP. Os dados foram analisados por One-way ANOVA, seguido de Tukey post-hoc. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*  $p < 0,05$ .

O perfil antitumoral das nanoestruturas sintetizadas neste trabalho foi semelhante ao perfil de resposta encontrado na literatura científica por outros pesquisadores (Akhtar *et al.*, 2012; Bai *et al.*, 2017; Ancona *et al.*, 2018). Akhtar e colaboradores (2012) descreveram que as nanopartículas de óxido de zinco (Nanoestruturas de ZnO) exercem efeitos distintos de citotoxicidade contra a viabilidade de células tumorais humanas de fígado (linhagem HepG2) e pulmão (linhagens A549 e BEAS-2B) avaliadas pelo ensaio de MTT após 24 h. Os autores relataram que as Nanoestruturas de ZnOs apresentam seletividade para estes tipos de células tumorais e são capazes de induzir a morte celular programada por apoptose por meio de espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, as

nanoestruturas de ZnO não promoveram a redução da viabilidade de hepatócitos e astrócitos de ratos.

Bai e colaboradores (2017), também estudaram os efeitos antitumorais de nanoestruturas de ZnO em células tumorais de ovário humano, onde os autores relatam o efeito dose dependente na viabilidade tumoral nas concentrações de 10, 20 e 30  $\mu\text{g/mL}$  após 24 h e relacionaram este resultado com o aumento da geração de EROs. Ancona e colaboradores (2018) avaliaram a geração de EROs por nanoestruturas de ZnO em células de câncer cervical (linhagem HeLa), os autores reportaram a redução acentuada da viabilidade tumoral entre as concentrações de 36 e 90  $\mu\text{g/mL}$  associado a uma maior produção de EROs pelas nanoestruturas após 24 h.

A biocompatibilidade é outra característica associada as nanoestruturas de zinco relatadas em diversas revisões científicas (Rasmussen *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2015; Mishra *et al.*, 2017; Wiesmann *et al.*, 2020). Grenho e colaboradores (2015) avaliaram a biocompatibilidade de NPs e reportaram a citocompatibilidade em ensaios de *in vitro*, células osteoblastos, após 72h e a biocompatibilidade das nanoestruturas em estudos *in vivo* (ratos Wistar).

Tabela 1: Avaliação da citotoxicidade e atividade antitumoral dos tratamentos com ZnO-CPB, ZnO-CPL, ZnO-CPBH e ZnO-CPBC.

| Concentração<br>(µg/mL) | Nanoestruturas de zinco           |      |         |      |          |      |          |      |      |
|-------------------------|-----------------------------------|------|---------|------|----------|------|----------|------|------|
|                         | ZnO-CPB                           |      | ZnO-CPL |      | ZnO-CPBH |      | ZnO-CPBC |      |      |
|                         | Percentual viável de células Vero |      |         |      |          |      |          |      |      |
|                         | VC%                               | I%   | VC%     | I%   | VC%      | I%   | VC%      | I%   |      |
| 25                      | —                                 | —    | —       | —    | 84,5     | 15,5 | —        | —    |      |
| 50                      | —                                 | —    | —       | —    | 69,1     | 30,9 | 74,1     | 25,9 |      |
| 100                     | —                                 | —    | —       | —    | 47,6     | 52,4 | 47,8     | 52,2 |      |
| 200                     | 58,6                              | 41,4 | 41,5    | 58,5 | 46,0     | 54,0 | 39,4     | 60,6 |      |
|                         | Percentual viável de células T24  |      |         |      |          |      |          |      |      |
|                         | VC%                               | I%   | VC%     | I%   | VC%      | I%   | VC%      | I%   |      |
|                         | 25                                | —    | —       | —    | —        | 65,4 | 34,6     | 61,4 | 38,6 |
|                         | 50                                | —    | —       | 38,7 | 61,3     | 30,9 | 69,1     | 34,4 | 65,6 |
| 100                     | 75,1                              | 24,9 | 42,0    | 58,0 | 31,6     | 68,4 | 34,6     | 65,6 |      |
| 200                     | 43,6                              | 56,4 | 34,5    | 65,5 | 28,7     | 71,3 | 30,3     | 69,7 |      |

VC% Percentual de viabilidade celular    % Percentual de inibição da viabilidade celular (I%=100 - CV%)    — Sem redução da viabilidade celular.

A análise deste tipo de avaliação é extremamente importante para engenharia de materiais como atividade estratégica em aplicações promissoras na medicina oncológica. A implementação de análises que relacionem característica das nanoestruturas e a viabilidade celular *in vitro* é muito importante para obter informações sobre a toxicidade potencial dos nanomateriais. Para explorar os resultados da Figura 5.5 e Tabela 1 em mais detalhes, primeiramente foi avaliado as evidências experimentais apresentadas, que permitem relacionar a atividade antitumoral das nanoestruturas e, conseqüentemente, mapear um perfil de

concentrações com maior eficácia para promover uma maior redução das células tumorais, preservando as células saudáveis (Figura 5.6).

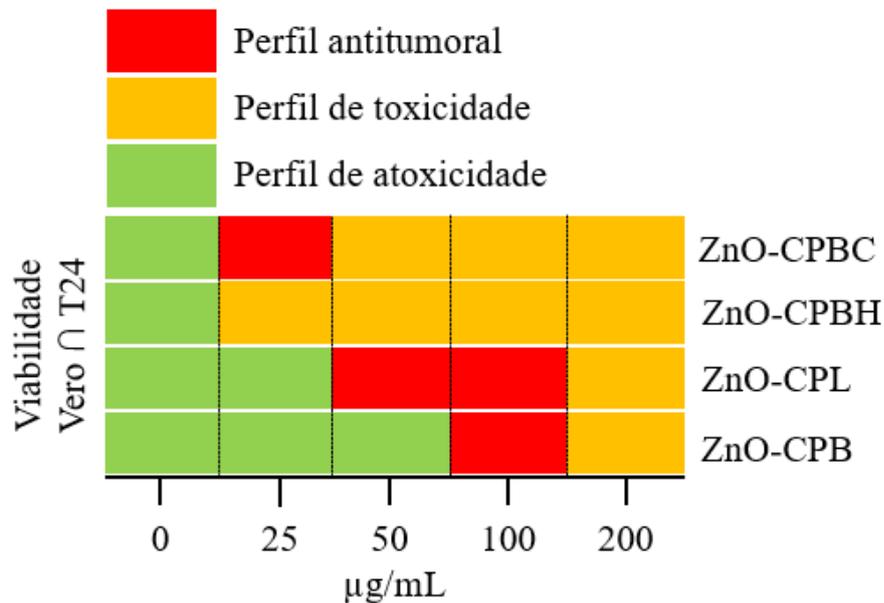


Figura 5.6: Mapa de toxicidade das nanoestruturas sintetizadas. O mapa apresenta a relação das concentrações de aplicação das nanoestruturas de zinco que são eficazes contra células tumorais, sem afetar a viabilidade das células saudáveis.

O mapa de toxicidade informa na cor vermelha o perfil antitumoral, ou seja, câncer, pois mapeia a resposta desejada, a cor amarela informa perfil com toxicidade para as células Vero, pois esta é a referência para toxicidade, a cor verde informa o perfil atóxico, quando não tem atividade.

A toxicidade de estruturas de ZnO geralmente está associada ao aumento de concentração (Bai *et al.*, 2017; Ancona *et al.*, 2018). A análise do mapa de toxicidade (Figura 5.6) permitiu observar o impacto deste parâmetro no perfil tóxico das amostras de ZnO. Diante disso, a concentração necessária para reduzir a viabilidade tumoral em 50% ( $IC_{50}$ ) também foi calculada como estratégia experimental para definição da atividade antitumoral apresentado pelas nanoestruturas de ZnO (Figura 5.7). A nanoestrutura ZnO-CPBH mostrou ser mais tóxica em relação as demais nanoestruturas sintetizadas, apresentando a maior toxicidade tanto contra células tumorais ( $IC_{50}$  de 30,95 µg/mL), quanto para as células vero, promovendo redução da viabilidade celular para todas as faixas de concentração. A relação citocompatibilidade e citotoxicidade mostrou regiões com características exclusivamente antitumorais, onde as concentrações de 25 µg/mL para ZnO-CPBC, 50 e 100 µg/mL para ZnO-CPL e 100 µg/mL para ZnO-CPB apresentaram perfil

antitumoral, ou seja, são capazes de afetar a proliferação das células T24, sem afetar a viabilidade das células vero (Figura 5.6).

Diante do *screening* de perfil antitumoral exposto, a menor concentração com atividade antitumoral foi observada na nanoestrutura ZnO-CPBC ( $IC_{50} = 32,5 \mu\text{g/mL}$ ), enquanto a concentração com menor perfil antitumoral foi encontrada na nanoestrutura ZnO-CPB ( $IC_{50} = 148,84 \mu\text{g/mL}$ ). A concentração com maior inibição da viabilidade das células tumorais T24 foi exibido pela nanoestrutura ZnO-CPL ( $IC_{50} = 66,6 \mu\text{g/mL}$ ).

Em resumo, dentro das condições avaliadas neste estudo (maior atividade antitumoral sem prejuízo da viabilidade de células saudáveis) foi classificado na ordem de maior atividade ZnO-CPL (61.3% e 58%) > ZnO-CPBC (38.6%) > ZnO-CPB (24.9%) > ZnO-CPBH, conforme Tabela 1.

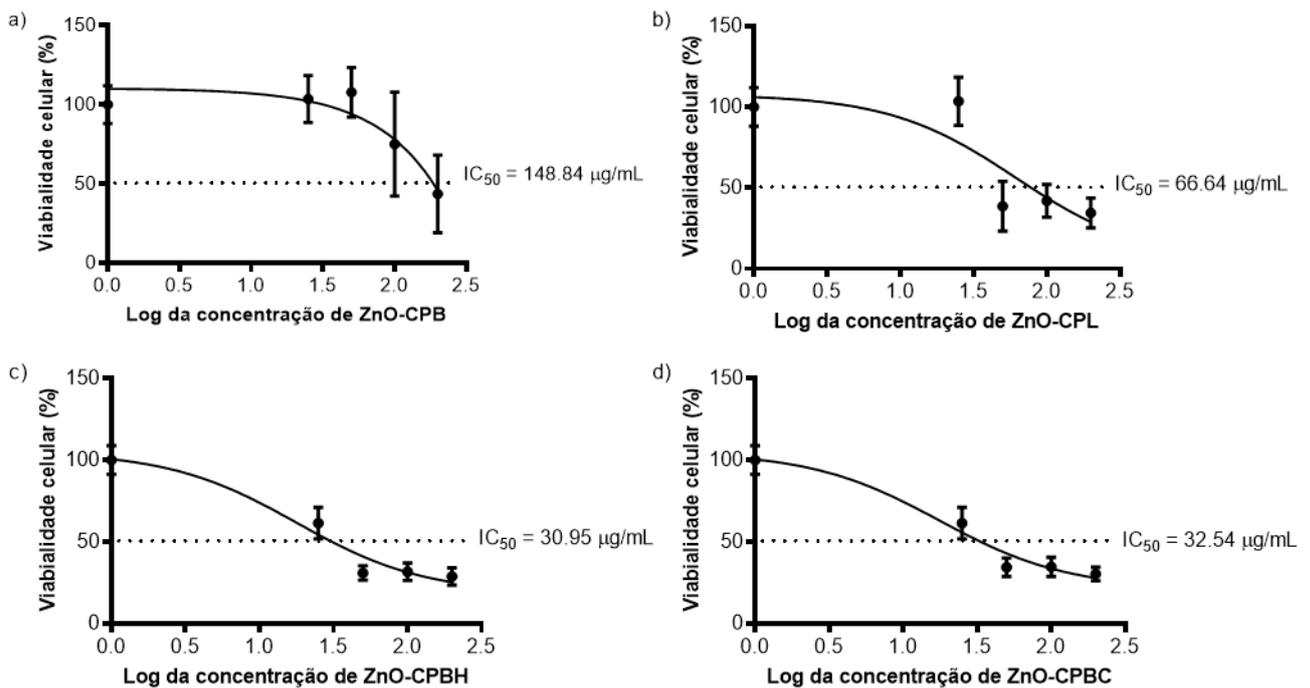


Figura 5.7:  $IC_{50}$  das nanoestruturas ZnO-CPB (a), ZnO-CPL (b), ZnO-CPBH (c) e ZnO-CPBC (d) na viabilidade das células T24 após 24 h. Os dados representam a média de quatro experimentos independentes realizados em triplicata  $\pm$  DP.

Além do fator concentração, outras características podem estar associadas à toxicidade das nanoestruturas de ZnO, como a morfologia estrutural, maior liberação de íons de zinco e o tamanho (Ann *et al.*, 2015). Os resultados obtidos pela microscopia eletrônica de varredura e transmissão revelaram que as morfologias das

amostras ZnO-CPB, ZnO-CPL, ZnO-CPBH e ZnO-CPBC apresentaram formatos irregulares (bastão, lâminas, bastão hexagonal e bastão côncavo, respectivamente). Contudo, as morfologias de bastão, lâmina e bastão côncavo apresentaram faixas de concentração com ação seletiva para células tumorais e células saudáveis como pode ser notado pela Figura 5.7.

A literatura descreve que nanoestruturas de ZnO com morfologia de bastão podem desencadear maior toxicidade do que partículas esféricas de ZnO (Lee *et al.*, 2008). Porém neste estudo, Lee e colaboradores relatam que a utilização de substratos com nanobastões de ZnO podem controlar a adesão celular e a viabilidade. Diferentemente do processo experimental reportado nesse estudo, a nossa avaliação consistiu em adicionar nanobastões de ZnO em células previamente aderidas. Por outro lado, em processo experimental semelhante ao nosso, nanobastões de ZnO estão associados a promoção da proliferação de células saudáveis (Ann *et al.*, 2015), Também foi descrito o perfil de atoxicidade de nanoestruturas de ZnO com morfologia de lâminas em células de fibroblastos de camundongo (L929) após 24, 48 e 72 h (Ann *et al.*, 2015). O perfil de aplicação da amostra ZnO-CPL apresentou faixa de concentrações com perfil exclusivamente de atoxicidade para células Vero e de elevada atividade antitumoral seletiva para células T24.

Além disso, as diferenças nos efeitos observados entre as amostras podem ser correlacionados com a carga de superfície. As cargas superficiais das nanoestruturas de ZnO foram examinadas por meio da medição do potencial zeta, conforme listado na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros estruturais e potenciais zeta das nanoestruturas de ZnO.

| <b>Amostras</b> | <b>Tamanho (nm)</b> | <b>PDI</b> | <b>Potencial Zeta (mV)</b> |
|-----------------|---------------------|------------|----------------------------|
| ZnO-CPB         | 2670 ± 631          | 0.8 ± 0.2  | -3.96 ± 0.61               |
| ZnO-CPL         | 1695 ± 105          | 0.4 ± 0.1  | 36.23 ± 0.66               |
| ZnO-CPBH        | 1940 ± 138          | 0.6 ± 0.1  | 31.70 ± 2.07               |
| ZnO-CPBC        | 1927 ± 260          | 0.4 ± 0.2  | -3.64 ± 0.77               |

Potenciais de baixa magnitude (entre + 30 mV e - 30 mV) indicam partículas mais instáveis, enquanto potenciais com magnitude superior a +30 mV indicam alta estabilidade, onde muitos íons de zinco carregados positivamente se localizam nas partículas de ZnO (Ann *et al.*, 2015). As amostras ZnO-CPB (-3.96 mV) e ZnO-CPBC (-3.64 mV) exibiram menor potencial zeta e, conseqüentemente, nanoestruturas menos estáveis na forma de suspensão. Os ZnO-CPL (36.23 mV) e ZnO-CPBH (31.70 mV) exibiram os maiores potenciais zeta.

A literatura relata alguns aspectos consistentes sobre a toxicidade de partículas de ZnO de distintas dimensões (nanométrico/micrométrico) e variada morfologia estrutural, além de outros fatores associados a interação e permeabilidade através de barreiras celulares que induzem o estresse oxidativo intracelular pela geração de EROs (Ann *et al.*, 2015; Grenho *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2019).

Os dados obtidos pelo potencial zeta sugerem que ZnO-CPB e ZnO-CPBC atuam como estruturas geradoras de ROS, e transportadoras de íons de zinco levando a um sistema de entrega de  $Zn^{+2}$  para as células, o que induz o aumento do estresse oxidativo gerado pelas ROS e resulta no aumento de morte celular. As amostras ZnO-CPB e ZnO-CPBC possuem potencial maior de liberação de  $Zn^{+2}$  nas suspensões, desencadeando toxicidade para células tumorais, contudo a diferença do percentual inibitório (I%) entre as amostras pode estar associado as suas diferenças de tamanhos. Visto que tamanhos menores de nanoestruturas de ZnO resultariam em maior toxicidade em comparação com tamanhos de partículas maiores (Ann *et al.*, 2015). Por outro lado, as amostras ZnO-CPL e ZnO-CPBH com potenciais zeta de alta magnitude atuam como estruturas com propriedades de potencial de redução (redox) contribuindo para processos de oxido-redução, provavelmente ocorrendo nas superfícies destas nanoestruturas, gerando EROs (Fukui *et al.*, 2012; Minigalieva *et al.*, 2017). Além disso, a diferença de morfologia entre ZnO-CPL (lâmina) e ZnO-CPBH (bastão hexagonal) pode levar a diferentes quantidades de EROs produzidos (Ann *et al.*, 2012; Ann *et al.*, 2013; Ann *et al.*, 2015).

Ann e colaboradores (2015) reportaram que estruturas de bastão possuem maiores quantidades de átomos de oxigênio nas superfícies das partículas e geraram relativamente grandes quantidades de ROS, o que é observado em nosso estudo, onde ZnO-CPBH apresentou tanto atividade antitumoral, quanto perfil de

toxicidade para células saudáveis. Por outro lado, estruturas em bastão (ZnO-CPB, ZnO-CPBH e ZnO-CPBH) e estrutura em forma de lâmina (ZnO-CPL) foram comparáveis em termos de citotoxicidade, provavelmente devido aos aspectos estruturais das nanoestruturas de ZnO.

### 5.2.2. Análise de morfometria nuclear

Neste estudo quatro nanoestruturas de ZnO (ZnO-CPB; ZnO-CPL; ZnO-CPBH e ZnO-CPBC) foram avaliadas para citotoxicidade *in vitro* contra células tumorais de bexiga por meio do mapa de toxicidade e IC<sub>50</sub>. Diante do exposto, e partindo do objetivo atual da engenharia de materiais, em particular na pesquisa oncológica, é produzir dispositivos de alta qualidade *in vitro*, capaz de atuar como agente antitumoral no câncer sem afetar células saudáveis. A nanoestrutura ZnO-CPL foi selecionada para continuar o estudo, pois exibiu melhor eficácia diante da relação citocompatibilidade *versus* atividade antitumoral, além de margem de segurança entre a dose antitumoral e tóxica (Figura 5.7). Assim, foi realizado um *screening* para senescência e apoptose pela morfometria nuclear das células T24 para avaliar os efeitos da nanoestrutura ZnO-CPL sobre a população tumoral sobrevivente (Figura 5.8).

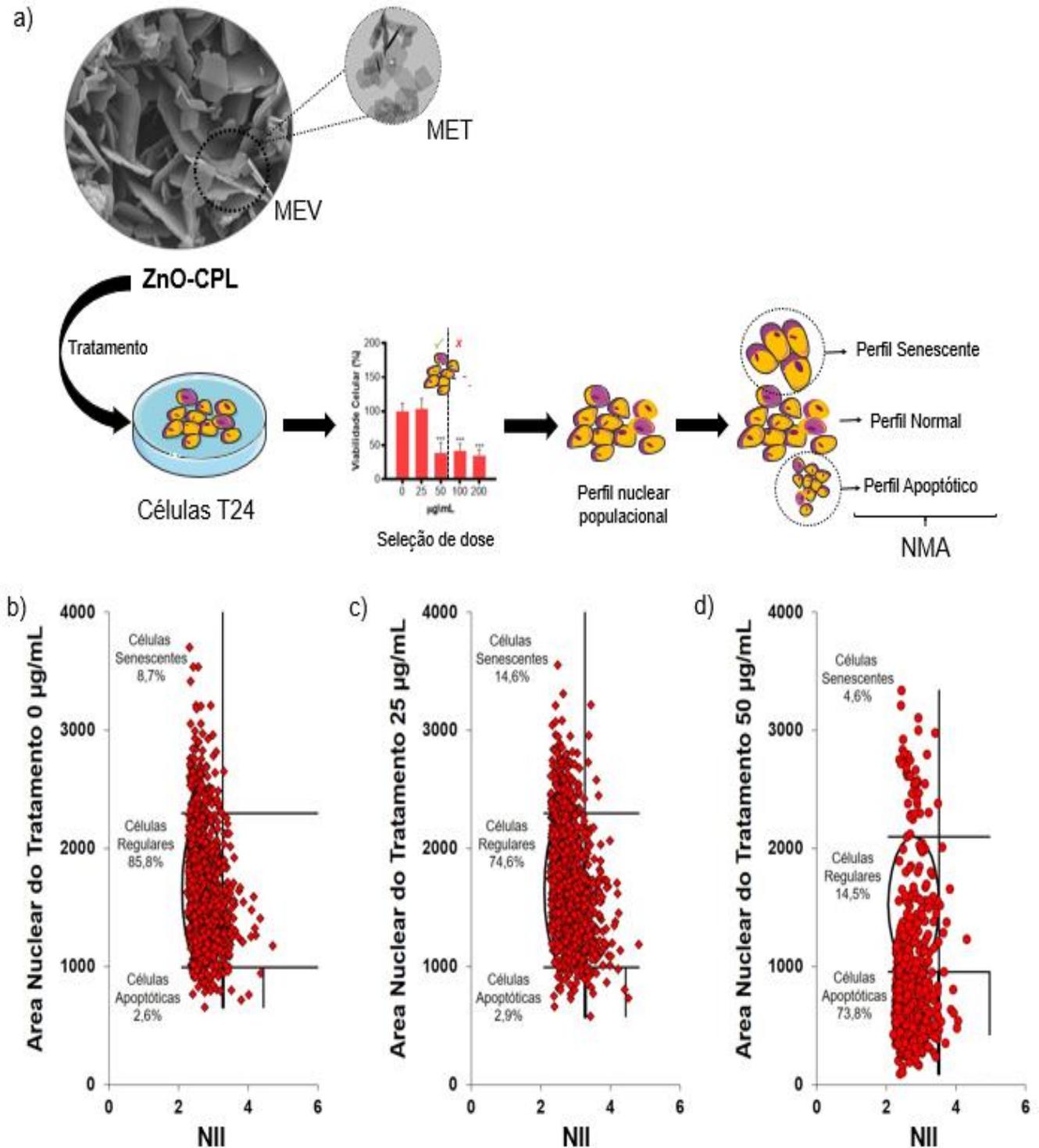


Figura 5.8: Análise da morfometria nuclear das células T24 expostas ao tratamento ZnO-CPL após 24 h. (a) As células T24 foram expostas ao tratamento por ZnO-CPL para seleção da dose (MTT) e em seguida foi avaliado o perfil senescente, apoptótico e normal das células sobreviventes. Distribuição dos núcleos das células T24 expostas as concentrações de 0 (b), 25 (c) e 50 µg/mL (d) da nanoestrutura ZnO-CPL após 24h.

As concentrações (0, 25 e 50 µg/mL) da nanoestrutura Zn-CPL foram selecionadas por meio da análise de toxicidade obtida através dos ensaios de MTT (Figura 5.5 e 5.6). A concentração de 100 e 200 µg/mL não foram utilizadas para a

realização da análise de morfometria nuclear. Apesar de ZnO-CPL na concentração de 100 µg/mL apresentar perfil exclusivo de atividade antitumoral, a concentração de 100 µg/mL não foi utilizada por três critérios: 1) apresentou valor de atividade antitumoral superior a concentração de IC<sub>50</sub> (66.64 µg/mL); 2) exibiu percentual de inibição inferior a concentração de 50 µg/mL ( $I_{100\ \mu\text{g/mL}}\% < I_{50\ \mu\text{g/mL}}\%$ , Tabela 1), e 3) a utilização de um intervalo de segurança entre a dose de maior ação antitumoral (50 µg/mL) e a concentração de atividade tóxica contra células vero (200 µg/mL).

Assim, foi identificado que 24 h de tratamento em diferentes concentrações de ZnO-CPL foi capaz de promover um impacto na dinâmica populacional dos núcleos das células T24 em relação ao grupo não tratado (Figura 5.8 b-d). Embora 25 µg/mL de ZnO-CPL não tenha gerado um impacto populacional acentuado, como 50 µg/mL, essa concentração potencializou o aumento de núcleos grandes e regulares (14.6%) em relação ao controle (8.7%) após 24 h (Figura 5.8 c). Por outro lado, 50 µg/mL de ZnO-CPL promoveu um maior impacto na população nuclear em 24 h, esta concentração induziu o aumento do percentual de núcleos pequenos e regulares (73.8%) em relação ao grupo não tratado (2.6%) (Figura 5.8 d).

Populações de núcleos grandes e regulares (LR) e pequenos e regulares (SR) são característicos de células em senescência e apoptose, respectivamente (Nunes *et al.*, 2019; Filippi-Chiela *et al.*, 2012). Os dados da análise de NMA sugerem que as concentrações de 25 e 50 µg/mL foram capazes de induzir as células T24 a senescência e apoptose. Apesar dos núcleos com características normais poderem representar células resistentes (Nunes *et al.*, 2019), ressaltam que a adição do tratamento por ZnO-CPL levou a uma forte redução da população de células que apareceram com morfometria normal (cerca de 74.6% e 14.5%).

Dentro da perspectiva de desenvolvimento racional de biomateriais para aplicação biomédica, o produto final não deve apenas apresentar alto poder inibitório para células tumorais, contudo também propriedades de biocompatibilidade, uma vez que a alta toxicidade é um dos principais problemas dos quimioterápicos utilizados na clínica do câncer. Neste estudo apresentamos quatro nanoestruturas de ZnO com maior toxicidade contra células tumorais e menor toxicidade contra células saudáveis, entre elas, o conjunto de resultados nos levou a optar pela nanoestrutura ZnO-CPL com potencial aplicação na área oncológica para o tratamento do câncer de bexiga humano. Embora haja a necessidade de mais estudos para elucidar alguns mecanismos celulares (taxa de internalização, morte

celular) relacionados a exposição a nanoestrutura, os resultados obtidos, mesmo em caráter experimental pré-clínico, potencializam de maneira segura o uso de ZnO-CPL como ferramenta para o tratamento do câncer de bexiga de grau III.

## 6. CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas deste estudo são:

- Seis (6) nanoestruturas de ZnO foram sintetizadas usando os métodos de co-precipitação e hidrotérmico produzindo ZnONPs com diferentes morfologias (bastões, lâminas e flores) e diferentes tamanhos;

- As baixas temperaturas e/ou o uso de  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado na síntese das nanoestruturas ZnO-CPB e ZnO-CPL levaram a formação de um subproduto, o hidróxi nitrato de zinco, além das ZnONPs (estrutura Wurtzita);

- O uso de amina ou bases fortes na síntese das nanoestruturas ZnO-CPBH; ZnO-CPBC; ZnO-CPFR e ZnO-HL levou a formação, predominantemente, de ZnONPs com estrutura Wurtzita;

- A maior atividade antitumoral, sem prejuízo da viabilidade de células saudáveis, foi obtida pela nanoestrutura: ZnO-CPL;

- Os resultados de potencial zeta sugerem que ZnO-CPB e ZnO-CPBC atuam como estruturas geradoras de ROS, e transportadoras de íons de zinco, o que induz o aumento do estresse oxidativo gerado pelas ROS e resulta no aumento de morte celular;

- Nas condições deste estudo, a nanoestrutura ZnO-CPL mostrou-se com potencial aplicação na área oncológica para o tratamento do câncer de bexiga humano.

- Embora haja a necessidade de mais estudos para elucidar alguns mecanismos celulares como taxa de internalização e morte celular relacionados a exposição da nanoestrutura, os resultados obtidos, mesmo em caráter experimental pré-clínico, potencializam de maneira segura o uso de ZnO-CPL como ferramenta para o tratamento do câncer de bexiga de grau III.

## **7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS**

A partir dos resultados obtidos nesta Dissertação, podem-se sugerir estudos futuros voltados para:

- Otimizar as condições de síntese e utilizar tratamento térmico para obtenção somente de ZnONPs com estrutura Wurtzita;
- Realizar ensaios biológicos em relação à combinação das nanoestruturas e avaliação da internalização das ZnONPs, bem como, o estudo da dose-efeito para avaliar o mecanismo relacionado a morte celular gerada por cada nanoestrutura avaliada.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, Sonalika et al. Morphology-dependent structural and optical properties of ZnO nanostructures. **Applied Physics A**, v. 125, n. 8, p. 553, 2019.

AHMADI, Azam et al. Functional biocompatible nanocomposite films consisting of selenium and zinc oxide nanoparticles embedded in gelatin/cellulose nanofiber matrices. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 175, p. 87-97, 2021.

AJAYAN, P.M.; SCHADLER, L.S.; BRAUN, P.V. **Nanocomposite Science and Technology**. WILEY-VCH Verlag GmbH Co. KGaA, 2003.

AKHTAR, Mohd Javed et al. Zinc oxide nanoparticles selectively induce apoptosis in human cancer cells through reactive oxygen species. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 845, 2012.

ALBAN, L. **Desenvolvimento e avaliação da atividade antitumoral de Nanotubos de Titanatos modificados com Quercitina em Câncer de Bexiga**. Porto Alegre. 2018. 93p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

ALBAN, Luisa et al. New quercetin-coated titanate nanotubes and their radiosensitization effect on human bladder cancer. **Materials Science and Engineering: C**, p. 110662, 2020.

AL-HAZZANI, Amal A.; ALSHATWI, Ali A. Catechin hydrate inhibits proliferation and mediates apoptosis of SiHa human cervical cancer cells. **Food and chemical toxicology**, v. 49, n. 12, p. 3281-3286, 2011.

AMMERMAN, Nicole C.; BEIER-SEXTON, Magda; AZAD, Abdu F. Growth and maintenance of Vero cell lines. **Current protocols in microbiology**, v. 11, n. 1, p. A. 4E. 1-A. 4E. 7, 2008.

ANCONA, Andrea et al. Lipid-coated zinc oxide nanoparticles as innovative ROS-generators for photodynamic therapy in cancer cells. **Nanomaterials**, v. 8, n. 3, p. 143, 2018.

AN, Guimin et al. CO<sub>2</sub>-mediated synthesis of ZnO nanorods and their application in sensing ethanol vapor. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 11, n. 2, p. 1252-1258, 2011.

ANN, Ling Chuo et al. Structural morphology and in vitro toxicity studies of nano-and micro-sized zinc oxide structures. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 3, n. 1, p. 436-444, 2015.

AOJI, Hitomi; SHIOMI, Haruhisa. Effects of aging conditions on the morphologies of ZnO particles synthesized under hydrothermal conditions from layered zinc hydroxide as a precursor derived from zinc acetate. **Journal of Asian Ceramic Societies**, p. 1-13, 2019.

AU, Kin Man et al. Improving cancer chemoradiotherapy treatment by dual controlled release of wortmannin and docetaxel in polymeric nanoparticles. **ACS nano**, v. 9, n. 9, p. 8976-8996, 2015.

BAI, Ding-Ping et al. Zinc oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagy in human ovarian cancer cells. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 6521, 2017.

BAHADAR, Haji et al. Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models. **Iranian biomedical journal**, v. 20, n. 1, p. 1, 2016.

BENDALE, Yogesh; BENDALE, Vineeta; PAUL, Saili. Evaluation of cytotoxic activity of platinum nanoparticles against normal and cancer cells and its anticancer potential through induction of apoptosis. **Integrative medicine research**, v. 6, n. 2, p. 141-148, 2017.

BETTINI, Simona et al. Promising piezoelectric properties of new ZnO octadecylamine adduct. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 34, p. 20143-20149, 2015.

BHAT, Sahar Saleem; QURASHI, Ahsanulhaq; KHANDAY, Firdous Ahmad. ZnO nanostructures based biosensors for cancer and infectious disease applications: Perspectives, prospects and promises. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, v. 86, p. 1-13, 2017.

BHAT, DenthajeKrishna. Facile synthesis of ZnO nanorods by microwave irradiation of zinc–hydrazine hydrate complex. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, n. 1, p. 31-35, 2008.

BISHT, Gunjan et al. Synthesis, characterization, and study of in vitro cytotoxicity of ZnO-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic composite nanoparticles in human breast cancer cell line (MDA-MB-231) and mouse fibroblast (NIH 3T3). **Nanoscale research letters**, v. 11, n. 1, p. 537, 2016.

Cai K. F.; He X. R.; Zhang L. C. Fabrication, properties and sintering of ZnO nanopowder. **Materials Letters** 2008, 62, 1223.

CASALS, Eudald et al. Cancer resistance to treatment and antiresistance tools offered by multimodal multifunctional nanoparticles. **Cancer nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 1-19, 2017.

CASTIGLIONI, Sara et al. Silver nanoparticles-induced cytotoxicity requires ERK activation in human bladder carcinoma cells. **Toxicology letters**, v. 237, n. 3, p. 237-243, 2015.

CHAMMAS, Roger et al. **Biologia do Câncer: uma breve introdução**. In: Tratado de Oncologia. Atheneu, 2013. p. 3-8.

CHANPHAI, P.; TAJMIR-RIahi, H. A. Structural dynamics of DNA binding to tea catechins. **International journal of biological macromolecules**, v. 125, p. 238-243, 2019.

CHEN, Pengyu et al. Size-dependent cytotoxicity study of ZnO nanoparticles in HepG2 cells. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 171, p. 337-346, 2019.

CHEN, Zhenhua et al. Mg (II)-Catechin nanoparticles delivering siRNA targeting EIF5A2 inhibit bladder cancer cell growth in vitro and in vivo. **Biomaterials**, v. 81, p. 125-134, 2016.

CHEN, Y-C., LO. S-L. Effects of operational conditions of microwave-assisted synthesis on morphology and photocatalytic capability of zinc oxide, **Chemical Engineering Journal**, vol. 170, p. 411-412, 2011.

CHICHVARINA, O.; HERNG, T. S.; PHUAH, K. C.; XIAO, W.; BAO, N.; FENG, Y. P.; DING, J. Stable zinc-blende ZnO thin films: formation and physical properties. **Journal Materials Science**, v. 50, p. 28–33, 2015.

CROSS, Sheree E. et al. Human skin penetration of sunscreen nanoparticles: in-vitro assessment of a novel micronized zinc oxide formulation. **Skin pharmacology and physiology**, v. 20, n. 3, p. 148-154, 2007.

DASH, Satyabrata; PRADHAN, Debabrata. Synthesis of nano soy/ZnO nanocomposite and evaluation of its properties. **Materials Today: Proceedings**, v. 30, p. 299-304, 2020.

DEVULAPALLY, Rammohan et al. Gemcitabine and antisense-microRNA co-encapsulated PLGA–PEG polymer nanoparticles for hepatocellular carcinoma therapy. **ACS applied materials & interfaces**, v. 8, n. 49, p. 33412-33422, 2016.

DJURIŠIĆ, A. B.; Ng, A. M. C.; Chen, X. Y. ZnO nanostructures for optoelectronics: Material properties and device applications. **Progress in Quantum Electronics** 2010, 34, 191.

D'SOUZA, Josline Neetha et al. Unravelling the human triple negative breast cancer suppressive activity of biocompatible zinc oxide nanostructures influenced by *Vateria indica* (L.) fruit phytochemicals. **Materials Science and Engineering: C**, p. 111887, 2021.

DUL, M. et al., Conjugation of a peptide autoantigen to gold nanoparticles for intradermally administered antigen specific immunotherapy. **International journal of pharmaceutics**, v. 562, p. 303-312, 2019.

DURÁN, Nelson; FÁVARO, Wagner J. Nanopharmaceuticals and their applications in bladder cancer therapy: a mini review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 5, p. 973-981, 2018.

DU, Yongle et al., Synthesis and evaluation of doxorubicin-loaded gold nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. **Bioconjugate chemistry**, v. 29, n. 2, p. 420-430, 2018.

EL-NAHAS, Safaa et al. Controlled morphological and physical properties of ZnO nanostructures synthesized by domestic microwave route. **Materials Chemistry and Physics**, v. 258, p. 123885, 2021.

EKTHAMMATHAT, Nuengruethai et al. Characterization and antibacterial activity of nanostructured ZnO thin films synthesized through a hydrothermal method. **Powder technology**, v. 254, p. 199-205, 2014.

ELUMALAI, K.; VELMURUGAN, S. Green synthesis, characterization and antimicrobial activities of zinc oxide nanoparticles from the leaf extract of *Azadirachta indica* (L.). **Applied Surface Science**, v. 345, p. 329-336, 2015.

FAL, HAMEDANI N.; FARZANEH, F. Synthesis of ZnO nanocrystals with hexagonal (Wurtzite) structure in water using microwave irradiation. 2006.

FARIQ, A.; KHAN, T.; YASMIN, A. Microbial synthesis of nanoparticles and their potential applications in biomedicine. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 15, n. 4, p. 241–248, 2017.

FILIPPI-CHIELA, Eduardo C. et al. Nuclear morphometric analysis (NMA): screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. 2012.

FU, Li; FU, Zhuxian. Plectranthus amboinicus leaf extract–assisted biosynthesis of ZnO nanoparticles and their photocatalytic activity. **Ceramics International**, v. 41, n. 2, p. 2492-2496, 2015.

FUKUI, Hiroko et al. Association of zinc ion release and oxidative stress induced by intratracheal instillation of ZnO nanoparticles to rat lung. **Chemico-biological interactions**, v. 198, n. 1-3, p. 29-37, 2012.

GANGULY, Priyanka; BREEN, Ailish; PILLAI, Suresh C. Toxicity of nanomaterials: Exposure, pathways, assessment, and recent advances. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 4, n. 7, p. 2237-2275, 2018.

GEORGEKUTTY, Reenamole; SEERY, Michael K.; PILLAI, Suresh C. A highly efficient Ag-ZnO photocatalyst: synthesis, properties, and mechanism. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 35, p. 13563-13570, 2008.

GHAFFARI, Maryam; MOZTARZADEH, Fathollah; SAFAVI, Maliheh. A comparative study on the shape-dependent biological activity of nanostructured zinc oxide. **Ceramics International**, v. 45, n. 1, p. 1179-1188, 2019.

GHAZALI, Muhammad Nur Iman et al. A comparative approach on One-Dimensional ZnO nanowires for morphological and structural properties. **Journal of Crystal Growth**, v. 558, p. 125997, 2021.

GHULE, Anil Vithal et al. Simultaneous thermogravimetric analysis and in situ thermo-Raman spectroscopic investigation of thermal decomposition of zinc acetate dihydrate forming zinc oxide nanoparticles. **Chemical physics letters**, v. 381, n. 3-4, p. 262-270, 2003.

GLEITER, Herbert. Nanostructured materials: basic concepts and microstructure. **Acta Materialia**, v.48, n.1, p.1-29,2000.

GUOZHONG, Cao. Nanostructures and nanomaterials: synthesis, properties and applications. **World scientific**, 2004.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Biological hallmarks of cancer. **Holland-Frei Cancer Medicine**, p. 1-10, 2. 2016.

HASANPOOR, Meisam; ALIOFKHAZRAEI, M.; DELAVARI, H. Microwave-assisted synthesis of zinc oxide nanoparticles. **Procedia Materials Science**, v. 11, p. 320-325, 2015.

HASSAN, Hesham Fathy Hassan et al. Zinc oxide nanoparticles as a novel anticancer approach; in vitro and in vivo evidence. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 44, n. 2, p. 235-243, 2017.

HASSAN, N. K.; HASHIM, M. R.; AL-DOURI, Y. Morphology and optical investigations of ZnO pyramids and nanoflakes for optoelectronic applications. **Optik**, v. 125, n. 11, p. 2560-2564, 2014.

HATAMIE, Amir et al. Zinc oxide nanostructure-modified textile and its application to biosensing, photocatalysis, and as antibacterial material. **Langmuir**, v. 31, n. 39, p. 10913-10921, 2015.

Hu, YI.; Chen, Hung-Jiun. Preparation and characterization of nanocrystalline ZnO particles from a hydrothermal process. **Journal of Nanoparticle Research** 2008, 10, 401.

HUANG, Yuan Ming; MA, Qing-lan; ZHAI, Bao-gai. Controlled morphology of ZnO nanostructures by adjusting the zinc foil heating temperature in an air-filled box furnace. **Materials Chemistry and Physics**, v. 147, n. 3, p. 788-795, 2014.

HUANG, J. et al. Nanostructured lipid carrier (NLC) as a strategy for encapsulation of quercetin and linseed oil: Preparation and in vitro characterization studies. **Journal of Food Engineering**, v. 215, p. 1–12, 2017.

HONG, Ruoyu et al. Synthesis and surface modification of ZnO nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, v. 119, n. 2-3, p. 71-81, 2006.

HORN, Dieter; RIEGER, Jens. Organic nanoparticles in the aqueous phase—theory, experiment, and use. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 40, n. 23, p. 4330-4361, 2001.

INCAa (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). O que é o câncer? Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 03 de mar 2021.

INCAb (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). Números de câncer. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer> > Acesso em: 03 março 2021.

INCAc (Instituto Nacional de Câncer do Brasil). Câncer de Bexiga. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-bexiga>> Acesso em: 03 março 2021.

ISMAIL, Adel Ali et al. Application of statistical design to optimize the preparation of ZnO nanoparticles via hydrothermal technique. **Materials Letters**, v. 59, n. 14-15, p. 1924-1928, 2005.

JAYARAMBABU, N. et al. Beneficial role of zinc oxide nanoparticles on green crop production. **IJMART**, v. 10, p. 273-282, 2015.

JEEVANANDAM, Jaison et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1050-1074, 2018.

JEON, In Su et al. Atomic-level mediation in structural interparameter tradeoff of zinc oxide nanowires-based gas sensors: ZnO nanofilm/ZnO nanowire homojunction array. **Applied Surface Science**, v. 540, p. 148350, 2021.

JIANG, Jinhuan; PI, Jiang; CAI, Jiye. The advancing of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications. **Bioinorganic chemistry and applications**, v. 2018, 2018.

JIAO, J.; SERAPHIN, S. Single-Walled Tubes and Encapsulated Nanoparticles: Comparison of Structural Properties of Carbon nanoclusters Prepared by Three Different Methods, **J.Phys.Chem. Solids** 61, p.1055-1067, 2000.

JIN, Su-Eon; JIN, Hyo-Eon. Synthesis, characterization, and three-dimensional structure generation of zinc oxide-based nanomedicine for biomedical applications. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 11, p. 575, 2019.

JO, Dong Hyun et al. Inhibitory activity of gold and silica nanospheres to vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is determined by their sizes. **Nano research**, v. 7, n. 6, p. 844-852, 2014.

KABIR, Humayun et al. Recent research and progress of biodegradable zinc alloys and composites for biomedical applications: biomechanical and biocorrosion perspectives. **Bioactive Materials**, v. 6, n. 3, p. 836-879, 2021.

KAJBAFVALA et al. Nanostructures sword-like ZnO wires: Rapid synthesis and characterization through a microwave-assisted route, **Journal of Alloys and Compounds**, v. 469, n. 1-2, p. 293-297, 2009.

KANAKKILLAM, Sreed S. et al. Nanoflakes of zinc oxide: cobalt oxide composites by pulsed laser fragmentation for visible light photocatalysis. **Applied Surface Science**, v. 501, p. 144223, 2020.

KAO, Yi-Yun et al. Zinc oxide nanoparticles interfere with zinc ion homeostasis to cause cytotoxicity. **Toxicological Sciences**, v. 125, n. 2, p. 462-472, 2012.

KHAN, MA Majeed et al. Influences of Co doping on the structural and optical properties of ZnO nanostructured. **Applied Physics A**, v. 100, n. 1, p. 45-51, 2010.

KIM, Sungyun; LEE, Song Yi; CHO, Hyun-Jong. Doxorubicin-wrapped zinc oxide nanoclusters for the therapy of colorectal adenocarcinoma. **Nanomaterials**, v. 7, n. 11, p. 354, 2017.

KOSTER, Rik S. et al. Stabilization of rock salt ZnO nanocrystals by low-energy surfaces and Mg additions: a first-principles study. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 10, p. 5648-5656, 2015.

KUANG, Huijuan et al. Size dependent effect of ZnO nanoparticles on endoplasmic reticulum stress signaling pathway in murine liver. **Journal of hazardous materials**, v. 317, p. 119-126, 2016.

KUCHUR, O. A. et al. Metal-derived nanoparticles in tumor theranostics: Potential and limitations. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 209, p. 111117, 2020.

KUMAR, Nitesh et al. Zinc as a plausible epigenetic modulator of glioblastoma multiforme. **European Journal of Pharmacology**, p. 173549, 2020.

KUMAR, Naresh et al. Beyond zinc coordination: Bioimaging applications of Zn (II)-complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 427, p. 213550, 2021.

KUMAR, Rajesh et al. Zinc oxide nanostructures for NO<sub>2</sub> gas–sensor applications: A review. **Nano-Micro Letters**, v. 7, n. 2, p. 97-120, 2015.

KUO, Chia-Liang et al. Synthesis of zinc oxide nanocrystalline powders for cosmetic applications. **Ceramics International**, v. 36, n. 2, p. 693-698, 2010.

LAI, Youlei et al. Photoluminescence and photocatalysis of the flower-like nano-ZnO photocatalysts prepared by a facile hydrothermal method with or without ultrasonic assistance. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 105, n. 3-4, p. 335-345, 2011.

LATHA, T. Sree et al. In vitro and in vivo evaluation of anti-cancer activity: Shape-dependent properties of TiO<sub>2</sub> nanostructures. **Materials Science and Engineering: C**, v. 78, p. 969-977, 2017.

LEE, Jiyeon et al. The control of cell adhesion and viability by zinc oxide nanorods. **Biomaterials**, v. 29, n. 27, p. 3743-3749, 2008.

LEONARDI, S. G. Two-dimensional zinc oxide nanostructures for gas sensor applications. **Journal Chemosensors**, v. 5, p. 1-17, 2017.

LI, Yingxue et al. Design of high stability thin-film transistor biosensor for the diagnosis of bladder cancer. **Chinese Chemical Letters**, v. 31, n. 6, p. 1387-1391, 2020.

Lilensten, L.; Fu, Q.; Wheaton, B. R.; Credle, A. J.; Stewart, R. L.; Kohli, J. T. Kinetic study on lithium-aluminosilicate (LAS) glass-ceramics containing MgO and ZnO. **Ceramics International** 2014, 40, 11657.

LIN, Chien-Cheng et al. Electrically responsive ZnO nanotubes for controlled release of biomolecules. **Ceramics International**, v. 43, p. S802-S806, 2017.

LIN, Jian-Yang et al. Effect of silver nitrate concentration of silver nanowires synthesized using a polyol method and their application as transparent conductive films. **Thin Solid Films**, v. 584, p. 243-247, 2015.

LIONG, Monty et al. Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery. **ACS nano**, v. 2, n. 5, p. 889-896, 2008.

LI, Wei et al. Insight into drug encapsulation in polymeric nanoparticles using microfluidic nanoprecipitation. **Chemical Engineering Science**, p. 116468, 2021.

LI, Yingxue et al. Design of high stability thin-film transistor biosensor for the diagnosis of bladder cancer. **Chinese Chemical Letters**, v. 31, n. 6, p. 1387-1391, 2020.

LIU, Hongyu et al. Effect of temperature on the size of biosynthesized silver nanoparticle: deep insight into microscopic kinetics analysis. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 1011-1019, 2020.

LOPES, Juliana Carvalho; TORRES, Maria Lúcia Pereira. Utilização de nanopartículas no tratamento do câncer: aspectos gerais, mecanismos de ação antineoplásicos e aplicabilidades tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 65, n. 4, 2019.

LOWRY, Gregory V. et al. Transformations of nanomaterials in the environment. 2012.

LU, Denghui et al. ZnO nanostructures decorated hollow glass microspheres as near infrared reflective pigment. **Ceramics International**, v. 43, n. 12, p. 9164-9170, 2017.

MACHADO, Sara Cristina Menicha. **Nanotecnologia e sua aplicação em terapêutica oncológica**. 2018. Tese de Doutorado.

MAHENDRA, Chandra et al. Antibacterial and antimutagenic potential of bio-fabricated zinc oxide nanoparticles of *Cochlospermum religiosum* (L.). **Microbial pathogenesis**, v. 110, p. 620-629, 2017.

MARANA, N.; SAMBRANO, J. R.; SOUZA, A. R. de. Propriedades eletrônicas, estruturais e constantes elásticas do ZnO. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 4, 2010.

MATINISE, N. et al. Zinc zirconate (ZnZrO<sub>3</sub>) nanocomposites bimetallic designed by green synthesis via *Moringa Oleifera* extract for high-performance electrochemical applications. **Materials Today: Proceedings**, 2020.

MINIGALIEVA, Ilzira A. et al. In vivo toxicity of copper oxide, lead oxide and zinc oxide nanoparticles acting in different combinations and its attenuation with a complex of innocuous bio-protectors. **Toxicology**, v. 380, p. 72-93, 2017.

MISHRA, Yogendra Kumar; ADELUNG, Rainer. ZnO tetrapod materials for functional applications. **Materials Today**, v. 21, n. 6, p. 631-651, 2018.

MOHAJERANI et al. Self-assembled zinc oxide nanostructures via a rapid microwave-assisted route, **Journal of Crystal Growth**, 310:3651:2008.

MOHANKUMAR, P. et al. Recent developments in biosensors for healthcare and biomedical applications: A review. **Measurement**, v. 167, p. 108293, 2021.

MONGE-FUENTES, Victoria. **Terapia fotodinâmica mediada por nanoemulsão à base de óleo de açaí** (Euterpe oleracea Martius) para o tratamento de melanoma in vitro e in vivo. 2014. 163f. Tese de Doutorado – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MONTEIRO, Wesley Formentin. **Nanotubos de titanatos e sua aplicação em matrizes de poliuretano**. 2015. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

MORIARTY, Philip. Materiais nanoestruturados. **Reports on Progress in Physics**, v. 64, n. 3, p. 297, 2001.

MORKOÇ, Hadis; ÖZGÜR, Ümit. **Zinc oxide: fundamentals, materials and device technology**. John Wiley & Sons, 2008.

MOSTAFAEI, Amir; NASIRPOURI, Farzad. Epoxy/polyaniline–ZnO nanorods hybrid nanocomposite coatings: Synthesis, characterization and corrosion protection performance of conducting paints. **Progress in Organic coatings**, v. 77, n. 1, p. 146-159, 2014.

MUSHTAQ, Jameel; THURAIRAJA, Ramesh; NAIR, Rajesh. Bladder cancer. **Surgery (Oxford)**, v. 37, n. 9, p. 529-537, 2019.

NAKAMOTO, K. **Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds**. New York: John Wiley & Sons, 1986.

NIEMEYER, Christof M. Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 40, n. 22, p. 4128-4158, 2001.

NUNES, Tatiana WN et al. Nuclear morphometric analysis in tissue as an objective tool with potential use to improve melanoma staging. *Melanoma research*, v. 29, n. 5, p. 474-482, 2019.

ORTEGA, P. P. et al. Multifunctional environmental applications of ZnO nanostructures synthesized by the microwave-assisted hydrothermal technique. *Applied Surface Science*, v. 542, p. 148723, 2021.

PAGANO, Rosanna et al. Enhanced solar-driven applications of ZnOAg patchy nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 121, n. 48, p. 27199-27206, 2017.

PAPADAKI, D. et al. Avaliação do ciclo de vida de nanoestruturas fáceis de óxido de zinco assistido por microondas (ZnO). *Ciência do Meio Ambiente Total*, v. 586, p. 566-575, 2017.

PATEL, N. A.; PATEL, I. B.; BHARAT, V. L. Structural, thermal and chemical studies of Mn doped ZnO nanoparticles synthesized by Co-precipitation method. *Materials Today: Proceedings*, 2021.

PARDESHI, S. K.; PATIL, A. B. Effect of morphology and crystallite size on solar photocatalytic activity of zinc oxide synthesized by solution free mechanochemical method. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 308, n. 1-2, p. 32-40, 2009.

PEDREIRA, Bárbara Alves Bernardi; CHILITI, Tuany; PARIS, Elaine Cristina. Síntese de nanoestruturas de ZNO pelos métodos de precipitação e hidrotermal. In: **Embrapa Instrumentação-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: WORKSHOP DA REDE DE NANOTECNOLOGIA APLICADA AO AGRONEGÓCIO, 9., 2017, São Carlos. Anais São Carlos: Embrapa Instrumentação, 2017. p. 547-550. Editores: Caue Ribeiro de Oliveira, Elaine Cristina Paris, Luiz Henrique Capparelli Mattoso, Marcelo Porto Bemquerer, Maria Alice Martins, Odílio Benedito Garrido de Assis., 2017.

PORTO, Renato Cesar Tobias et al. Nanopartículas de óxido de zinco sintetizadas pelo método poliol: caracterização e avaliação da atividade antibacteriana. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 22, 2017.

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, p. 184-192, 2011.

RADHAKRISHNAN, J. K. et al. Growth of ZnO nanostructures: Cones, rods and hollow-rods, by microwave assisted wet chemical growth and their characterization. **Ceramics International**, v. 47, n. 4, p. 5300-5310, 2021.

RAI, Prabhakar et al. Fabrication of flower-like ZnO microstructures from ZnO nanorods and their photoluminescence properties. **Materials Chemistry and Physics**, v. 124, n. 1, p. 406-412, 2010.

RAMESH, Thimmasandra Narayan; MADHU, Theeta Lakshamaiah. Thermal decomposition studies of layered metal hydroxynitrates (metal: Cu, Zn, Cu/Co, and Zn/Co). **International Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2015, 2015.

RANA, S. B. et al. Synthesis and characterization of pure and doped ZnO nanoparticles. **Journal of Optoelectronics and Advanced Materials**, v. 12, n. 2, p. 257, 2010.

RANI, Seema et al. Synthesis of nanocrystalline ZnO powder via sol–gel route for dye-sensitized solar cells. **Solar Energy Materials and Solar Cells**, v. 92, n. 12, p. 1639-1645, 2008.

RAO, MS Ramachandra; OKADA, Tatsuo (Ed.). ZnO nanocrystals and allied materials. Springer Science & Business Media, 2013.

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, p. 1063-1077, 2010.

SAMANTA, Pijus Kanti; SAHA, Abhijit. Wet chemical synthesis of ZnO nanoflakes and photoluminescence. **Optik**, v. 126, n. 23, p. 3786-3788, 2015.

SEKINE, N; CHOU, C.H.; KWAN, W.L.; YANG, Y. ZnO nano-ridge structure and its application in inverted polymer solar cell, **Organic Electronics**, 2009.

SELIM, Manar E.; HENDI, Awatif A. Gold nanoparticles induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 4, p. 1617-1620, 2012.

SENTHILKUMAAR, S. et al. Influência do doping por Mn na microestrutura e nas propriedades ópticas do ZnO. *Ciência dos Materiais no Processamento de Semicondutores*, v. 11, n. 1, p. 6-12, 2008.

SHARMA, Ankush; GOYAL, Amit K.; RATH, Goutam. Recent advances in metal nanoparticles in cancer therapy. **Journal of drug targeting**, v. 26, n. 8, p. 617-632, 2018.

SHEN, Cenchao et al. Relating cytotoxicity, zinc ions, and reactive oxygen in ZnO nanoparticle–exposed human immune cells. **Toxicological Sciences**, v. 136, n. 1, p. 120-130, 2013.

SHEN, Liming et al. Direct synthesis of ZnO nanoparticles by a solution-free mechanochemical reaction. **Nanotechnology**, v. 17, n. 20, p. 5117, 2006.

SHERVEDANI, Reza Karimi et al. Controlled synthesis of mixed molecular nanostructures from folate and deferroxamine-Ga (III) on gold and tuning their performance for cancer cells. **Bioelectrochemistry**, v. 122, p. 149-157, 2018.

SIEGEL, R. W. Nanostructured materials-mind over matter. **Nanostructured Materials**, v. 4, n. 1, p. 121-138, 1994.

SINGH, S.; NIMMO, W.; WILLIAMS, P. T. An experimental study of ash behaviour and the potential fate of ZnO/Zn in the Co-combustion of pulverised South African coal and waste tyre rubber. **Fuel**, v. 111, p. 269-279, 2013.

SONG, Yijuan et al. In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles and zinc oxide nanoparticles to human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 769, p. 113-118, 2014.

SU, Yingchao et al. Zinc-based biomaterials for regeneration and therapy. **Trends in biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 428-441, 2019.

SUGIMURA, Shigeaki et al. Optical properties of three sectors in a zinc-oxide single crystal grown under hydrothermal process. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment**, v. 654, n. 1, p. 314-317, 2011.

SUKHANOVA, Alyona et al. Dependence of nanoparticle toxicity on their physical and chemical properties. **Nanoscale research letters**, v. 13, n. 1, p. 44, 2018.

SULTAN, S. M. et al. Remote plasma enhanced atomic layer deposition of ZnO for thin film electronic applications. **Microelectronic engineering**, v. 97, p. 162-165, 2012.

SUN, Rongze; LU, Jiakai; NOLDEN, Alissa. Nanostructured foods for improved sensory attributes. **Trends in Food Science & Technology**, 2021.

Udoma, I.; Rama, M. K.; Stefanakos, E. K.; Hepp, A. F.; Goswamia, D. Y. One dimensional-ZnO nanostructures: Synthesis, properties and environmental applications. **Materials Science in Semiconductor Processing** 2013, 16, 2070.

VECCHIO, Mary M. Breast cancer screening in the high-risk population. **Asia-Pacific journal of oncology nursing**, v. 5, n. 1, p. 46, 2018.

VIEIRA, Débora Braga; GAMARRA, Lionel Fernel. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. **Einstein** (São Paulo), v. 14, n. 1, p. 99-103, 2016.

WAGNER, Taylor W. et al. Effect of surface-modified zinc oxide nanowires on solution crystallization kinetics of poly (3-hexylthiophene). **Polymer**, v. 55, n. 8, p. 2008-2013, 2014.

WANG, Y.; HERRON, N. Chemical effects on the optical properties of semiconductor particles, **Journal of Physics Chemistry**, n. 91, n. 19, 5005-5008, 1987.

WANG, Y. L. Nanotechnologies for energy recovery set: piezoelectric ZnO nanostructure for energy harvesting. WILEY-VCH Verlag GmbH Co. KGaA, 2015.

WANG, Zhijian et al. Low-temperature synthesis of ZnO nanoparticles by solid-state pyrolytic reaction. **Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 11, 2002.

WIESMANN, Nadine et al. Zinc overload mediated by zinc oxide nanoparticles as innovative anti-tumor agent. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 51, p. 226-234, 2019.

WU, C.; SHEN, L.; YU, H.; HUANG, Q.; ZHANG, Y. C. Synthesis of Sn-doped ZnO nanorods and their photocatalytic properties. **Materials Research Bulletin**, v. 46, p. 1107–1112, 2011.

YAN, H. One-dimensional nanostructures: synthesis, characterization, and applications. **Advanced Materials**, v. 15, n. 5, p. 353-389, 2003.

YU, Hua-wa et al. Template-free hydrothermal synthesis of Flower-like hierarchical zinc oxide nanostructures. **Optik**, v. 168, p. 778-783, 2018.

XIANG, Guang-Hua et al. Effect of PEG-PDLLA polymeric nanovesicles loaded with doxorubicin and hematoporphyrin monomethyl ether on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells in vitro. **International journal of nanomedicine**, v. 8, p. 4613, 2013.

XIAO, Fang-Xing et al. Spatially branched hierarchical ZnO nanorod-TiO<sub>2</sub> nanotube array heterostructures for versatile photocatalytic and photoelectrocatalytic applications: towards intimate integration of 1D–1D hybrid nanostructures. **Nanoscale**, v. 6, n. 24, p. 14950-14961, 2014.

XIONG, Gang; PAL, U .; SERRANO, J. Garcia. Correlações entre tamanho, defeitos e fotoluminescência em nanopartículas de ZnO. **Revista de física aplicada** , v. 101, n. 2, p. 024317, 2007.

XIONG, Huan-Ming. ZnO nanoparticles applied to bioimaging and drug delivery. **Advanced Materials**, v. 25, n. 37, p. 5329-5335, 2013.

XU, Sheng et al. Self-powered nanowire devices. **Nature nanotechnology**, v. 5, n. 5, p. 366-373, 2010.

YAMABI, Satoshi; IMAI, Hiroaki. Growth conditions for wurtzite zinc oxide films in aqueous solutions. **Journal of materials chemistry**, v. 12, n. 12, p. 3773-3778, 2002.

YAN, H. One-dimensional nanostructures: synthesis, characterization, and applications. **Advanced Materials**, v. 15, n. 5, p. 353-389, 2003.

YAN, Hongwei et al. Growth and photocatalytic properties of one-dimensional ZnO nanostructures prepared by thermal evaporation. **Materials Research Bulletin**, v. 44, n. 10, p. 1954-1958, 2009.

YANG, Tieshan et al. Silver nanoparticles inhibit the function of hypoxia-inducible factor-1 and target genes: insight into the cytotoxicity and antiangiogenesis. **International journal of nanomedicine**, v. 11, p. 6679, 2016.

YU, Huawa et al. Template-free sonochemical synthesis of flower-like ZnO nanostructures. **Physics Letters A**, v. 378, n. 45, p. 3315-3318, 2014.

YU, Qingjiang et al. Fabrication and optical properties of large-scale ZnO nanotube bundles via a simple solution route. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 47, p. 17521-17526, 2007.

ZAK, A. Khorsand et al. Sonochemical synthesis of hierarchical ZnO nanostructures. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 395-400, 2013.

ZHANG, Hui et al. Controllable growth of ZnO microcrystals by a capping-molecule-assisted hydrothermal process. **Crystal growth & design**, v. 5, n. 2, p. 547-550, 2005.

ZHANG, Jun et al. Control of ZnO morphology via a simple solution route. **Chemistry of Materials**, v. 14, n. 10, p. 4172-4177, 2002.

ZHANG, Zheng-Yong; XIONG, Huan-Ming. Photoluminescent ZnO nanoparticles and their biological applications. **Materials**, v. 8, n. 6, p. 3101-3127, 2015.

ZHANG, X.; QIN, J.; XUE, Y.; YU, P.; ZHANG, B.; WANG, L.; LIU, R. Effect of aspect ratio and surface defects on the photocatalytic activity of ZnO nanorods. **Scientific Reports**, v. 4, n. 4596, p. 1-8, 2014.

ZHANG, Xiao Li et al. Fabrication of hierarchical ZnO nanostructures via a surfactant-directed process. **Crystal Growth and Design**, v. 9, n. 6, p. 2906-2910, 2009.

ZUBAIR, Naila; AKHTAR, Khalida. High performance room temperature gas sensor based on novel morphology of zinc oxide nanostructures. Transactions of Nonferrous Metals Society of China, v. 29, n. 1, p. 143-156, 2019.

