



Nanopartículas de ouro para diagnóstico e tratamento de cancro

Carlos Daniel Quaresma Rosa

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação do Professor Doutor João Paulo Gil Lourenço
e Professor Doutor André Duarte Lopes

2023



Nanopartículas de ouro para diagnóstico e tratamento de cancro

Carlos Daniel Quaresma Rosa

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciência Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação do Professor Doutor João Paulo Gil Lourenço
e Professor Doutor André Duarte Lopes

2023

Nanopartículas de ouro para o diagnóstico e tratamento de cancro

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright © 2023 Carlos Daniel Quaresma Rosa

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

São várias as pessoas que me acompanharam ao longo deste caminho, sem as quais não teria conseguido chegar aqui e a quem eu quero agradecer.

Ao Professor Doutor João Lourenço e ao Professor Doutor André Lopes por todo o apoio e disponibilidade durante a realização desta monografia.

À minha família pelo apoio e a ajuda que deram ao longo destes anos.

À minha namorada, Catarina, por todo o seu apoio e ajuda que me deu nestes anos. Por se manter sempre do meu lado tanto nos bons como nos maus momentos. Por acreditar em mim quando mais ninguém o fez. Sem ela não teria chegado aqui.

Aos meus colegas mais próximos, o Alexandre, o João, a Joana, a Catarina e a Patrícia por me acompanharem neste percurso, não só como colegas mas também como amigos. Por todos os momentos juntos tanto fora como dentro da universidade, desde os cafés às sessões de estudo. Sem eles, a minha vida académica, e pessoal, não teria sido a mesma.

Aos meus afilhados, Margarida, David, Francisco, Patrícia, Joana, Gonçalo e Marta, à minha madrinha Daniela e ao meu neto David por todos os momentos que passamos e por todo o apoio e ajuda que deram ao longo destes anos.

Aos meus melhores amigos, Roberto, Pedro e David que embora não tenham estado presentes na universidade foram sempre um grande apoio.

Resumo

As nanopartículas de ouro têm se apresentado como uma ferramenta com potencial em diversas aplicações na nanomedicina devido às suas características únicas como baixa toxicidade, elevada área superficial e biodisponibilidade.

Estes materiais podem ser preparados através de diversas técnicas de forma a apresentarem as características estruturais e morfológicas pretendidas e, conseqüentemente, o comportamento pretendido. Após a preparação, as nanopartículas de ouro podem ser funcionalizadas com diversos compostos e/ou fármacos de forma a alterar as suas características e o seu comportamento. Estas alterações podem melhorar os resultados na terapêutica anticancerígena ao aumentar a eficácia do tratamento e ao reduzir os efeitos adversos que estas podem causar.

A caracterização das nanopartículas de ouro é um parâmetro complexo e essencial para a compreensão das características e do comportamento das partículas. São vários os métodos de caracterização que podem ser utilizados e a escolha dos métodos a utilizar deve ser a considerada mais adequada para uma mais eficaz caracterização.

As nanopartículas de ouro podem ser utilizadas em diversos métodos de tratamento e de diagnóstico de cancro. Como meio de diagnóstico, têm utilidade em diversos processos de obtenção de imagem de tecidos tumorais. Como método de tratamento de cancro, estas podem ser utilizadas como meio de transporte de fármacos, em radioterapia, em terapia fototérmica e fotodinâmica.

Nesta monografia, é feita uma revisão e descrição dos métodos de síntese mais utilizados das nanopartículas de ouro, da funcionalização da superfície e da caracterização das nanopartículas de ouro. É também feita a revisão e descrição das nanopartículas de ouro e das suas potenciais aplicações no cancro, tanto como meio de diagnóstico como método de tratamento.

Palavras-chave: Cancro; Nanopartículas; Ouro; Funcionalização; Terapia; Diagnóstico

Abstract

Gold nanoparticles have emerged as a potential tool with diverse applications in nanomedicine due to their unique characteristics such as low toxicity, high surface area and bioavailability.

These materials can be prepared using different techniques to present the desired structural and morphological characteristics and, consequently, the desired behavior. After preparation, gold nanoparticles can be functionalized with various compounds and/or drugs to change their characteristics and behavior. These changes can improve results in anticancer therapy by increasing the effectiveness of treatment and reducing the adverse effects they can cause.

The characterization of gold nanoparticles is a complex and essential parameter for understanding the characteristics and behavior of the particles. There are several characterization methods that can be used and the choice of methods to be used must be the one considered most appropriate for a more effective characterization.

Gold nanoparticles can be used in various cancer treatment and diagnosis methods. As a means of diagnosis, they are useful in various processes for obtaining images of tumor tissues. As a method of treating cancer, they can be used as a means of transporting drugs, in radiotherapy, in photothermal and photodynamic therapy.

In this monograph, a review and description of the most used synthesis methods for gold nanoparticles, surface functionalization and characterization of gold nanoparticles are made. Gold nanoparticles and their potential applications in cancer are also reviewed and described, both as a means of diagnosis and a method of treatment.

Keywords: Cancer; Nanoparticles; Gold; Functionalization; Therapy; Diagnostics

Índice

Agradecimentos	II
Resumo	III
Abstract	IV
Índice de figuras	VII
Lista de siglas e abreviaturas	XI
1. Introdução	1
2. Nanopartículas de ouro	4
3. Síntese de nanopartículas de ouro	7
3.1. Método de Turkevich.....	8
3.2. Método de Brust-Schiffrin.....	9
3.3. Crescimento mediado por sementes.....	10
3.4. Métodos Biológicos	11
3.5. Ablação a laser	12
3.6. Moagem.....	13
3.7. Microemulsão.....	14
4. Funcionalização de superfície	15
5. Caracterização	18
6. Aplicações médicas	20
6.1. AuNPs como meio de diagnóstico	21
6.1.1. Imagem por tomografia computadorizada.....	22
6.1.2. Imagem por ressonância magnética	24
6.1.3. Imagem por tomografia por emissão de positrões	26
6.1.4. Imagem fotoacústica	29
6.2. AuNPs como meio de tratamento	31
6.2.1. AuNPs para transporte de fármacos	32
6.2.2. Radioterapia.....	38

6.2.3. Terapia fototérmica	41
6.2.4. Terapia fotodinâmica.....	44
7. Conclusões	48
Referências	49

Índice de figuras

Figura 2.1. Tipos de nanopartículas (adaptado de ²⁰).....	4
Figura 2.2. Comparação entre a coroa “dura” e a coroa “macia” das nanopartículas (adaptado de ¹²).....	6
Figura 3.1. Formação de nanopartículas de ouro pelo método de Turkevich (adaptado de ²⁸).....	9
Figura 3.2. Síntese de nanopartículas de ouro pelo método de Brust-Schiffrin de duas fases (adaptado de ²⁹).....	10
Figura 3.3. Síntese biológica de nanopartículas metálicas através de extratos de plantas (adaptado de ³⁶).....	11
Figura 3.4. Formação de nanopartículas de ouro pelo método de microemulsão (a) pela adição do agente redutor à microemulsão contendo o precursor metálico e (b) pela mistura das duas microemulsões contendo o precursor metálico e o agente redutor (adaptado de ⁴⁰).....	14
Figura 4.1. Nanopartículas de ouro com modificação de superfície multifuncional (adaptado de ²⁷).....	15
Figura 4.2. Funcionalização de superfície de nanopartículas de ouro pelo método de troca de ligandos (adaptado de ²⁸).....	16
Figura 5.1. Métodos de caracterização das nanopartículas de ouro e as informações que se obtêm a partir destes (adaptado de ⁴⁶).....	18
Figura 6.1. Esquematização de várias aplicações das nanopartículas de ouro (adaptado de ⁴⁵).....	20
Figura 6.2. Aplicações das nanopartículas de ouro em imagiologia e diagnóstico (adaptado de ²⁴).....	22
Figura 6.3. Tomografia computadorizada de uma falha num compósito monofilamentar. (a) radiografia; (b) tomograma reconstruído; (c) corte transversal virtual; (d) renderização final (adaptado de ⁵⁶).....	22

Figura 6.4. Spin nuclear. O núcleo, ao rodar, induz um campo magnético, apresentando um comportamento semelhante a um íman. A direção das setas representa a direção do campo magnético ⁶³	24
Figura 6.5. (A) Na ausência de um campo magnético, os momentos magnéticos dos núcleos estão distribuídos de forma aleatória. (B) Na presença de um forte campo magnético externo, os núcleos alinham paralelamente ou antiparalelamente à campo externo ⁶⁵	25
Figura 6.6. Meningioma visualizado mais facilmente devido à utilização do gadolínio como agente de contraste ⁶⁷	25
Figura 6.7. Após emissão, os pósitrons combinam com os elétrons. Isto resulta na produção de dois fótons antiparalelos que atingem detectores opostos (adaptado de ⁹⁸)....	27
Figura 6.8. Esquematização do direcionamento passivo mediado por EPR e do direcionamento ativo baseado em NPs inorgânicas radiomarcadas (adaptado de ⁷⁴).....	28
Figura 6.9. Esquerda: Imagem PET de [18F]AuNP 40-60 minutos após injeção IV em murganhos, imagem coronal (esquerda) e sagital (direita). Direita: Curvas do valor de captação padronizado 1 hora após injeção (adaptado de ⁸⁰).....	29
Figura 6.10. Princípio geral da imagem fotoacústica . Os cromóforos alvo absorvem a energia ótica, que resulta num aumento de temperatura localizado. Isto induz um aumento de pressão localizado que se propaga para fora e em direção a um transdutor ultrassónico. O sinal capturado é reconstruído de forma a mapear a deposição de energia ótica original dentro do tecido (adaptado de ⁸³).....	30
Figura 6.11. (A) Os dados de biodistribuição ao longo do tempo indicam um abastecimento de sangue superior a 10%ID/g por pelo menos seis horas após a injeção intravenosa. Os principais locais de acumulação são o baço e o fígado, de acordo com internalização pelo sistema reticuloendotelial. (B) Verifica-se uma relação linear positiva entre a concentração de ouro no tumor e o sinal fotoacústico. Tanto o sinal fotoacústico como a concentração de ouro atingem o pico a três horas após a injeção (adaptado de ⁸⁶).....	31
Figura 6.12. Estrutura e fórmula química do metotrexato (MTX) (adaptado de ⁹²).....	33

Figura 6.13. Desenho de nanopartículas de ouro multifuncionais (A) e otimização de nanopartículas de ouro conjugadas de forma o efeito anticancerígeno. O anticorpo TGF- β 1, o metotrexato, e o ácido fólico foram conjugados com as nanopartículas de ouro (adaptado de ⁹³).....	34
Figura 6.14. Estrutura e fórmula química do paclitaxel (PTX) (adaptado de ⁹⁶).....	35
Figura 6.15. Eficácia antitumoral do paclitaxel livre (5 mg/kg) e do paclitaxel associado às nanopartículas de ouro (5 mg/kg), investigada ao longo de sete administrações intravenosas. (A) Alterações do peso corporal durante o tratamento; (B) Alterações do volume dos tumores (adaptado de ⁹⁷).....	35
Figura 6.16. Estrutura e fórmula química da doxorubicina (DOX) (adaptado de ¹⁰¹).....	36
Figura 6.17. Capacidade de inibição tumoral dos compostos em ratos. (a) Crescimento tumoral em cada grupo medido ao longo do ensaio; (b) Peso corporal dos ratos de cada grupo que foi medido ao longo do ensaio; (c) O crescimento tumoral e a taxa de inibição tumoral foram por fim analisadas (adaptado de ¹⁰²).....	36
Figura 6.18. Estrutura e fórmula química do 5-fluorocilo (5-FU) (adaptado de ¹⁰³).....	37
Figura 6.19. Citotoxicidade das nanopartículas de ouro, do 5-fluorocilo, e dos compostos a uma concentração de 1×10^{10} NP/ml nas linhagens de células tumorais HCT-116 (esquerda) e HT-29 (direita) ao fim de 48 horas (adaptado de ¹⁰⁴).....	37
Figura 6.20. Radioterapia: Administração de nanopartículas de ouro na zona tumoral seguida da aplicação de uma fonte de radiação que resulta na sensibilização das nanopartículas de ouro e numa morte das células tumorais superior (adaptado de ¹⁰⁸).....	39
Figura 6.21. Potenciais mecanismos das radiosensibilização pelas nanopartículas de ouro. Podem ser resumidos em três partes: (1) Aumento da dose física, devido ao efeito fotoelétrico do ouro; (2) Contribuições químicas com base na sensibilização química do DNA aos danos induzidos pela radiação, bem como do aumento da geração e catálise de radicais; (3) A fase biológicas em diversos mecanismos como produção de espécies reativas de oxigénio, stress oxidativo, disfunção mitocondrial, efeitos no ciclo celular, e inibição da reparação do DNA (adaptado de ¹⁰⁷).....	39

Figura 6.22. Taxa de sobrevivência de murganhos portadores de tumores CT26 em função do tempo, ao longo de 60 dias pós-tratamento (adaptado de ¹¹⁰).....	41
Figura 6.23. Terapia fototérmica para o tratamento de cancro (adaptado de ¹¹⁴).....	42
Figura 6.24. Processos fotofísicos de uma nanopartícula de ouro excitada por um laser no processo de hipertermia na terapia fototérmica (adaptado de ¹¹⁷).....	42
Figura 6.25. Agregação das nanopartículas de ouro induzida por luz para uma terapêutica sinérgica baseada em terapia fototérmica e em quimioterapia, pelo uso de doxorrubicina (adaptado de ¹²²).....	44
Figura 6.26. Diferentes métodos para o desenho de fotossensibilizadores contra a hipoxia (adaptado de ¹²⁵).....	45
Figura 6.27. Mecanismo da terapia fotodinâmica . Na reação tipo I, o 3PS* pode transferir um eletrão para biomoléculas vizinhas, ou diretamente para o oxigénio, formando radicais de reagir com o O ₂ de forma a produzir O ₂ • ⁻ , H ₂ O ₂ , ou •OH. Na reação tipo II, a energia do fotossensibilizador excitado pode ser diretamente transferida para o oxigénio molecular para formar oxigénio singleto, ¹ O ₂ (adaptado de ¹²⁶).....	47
Figura 6.28. Ilustração dos efeitos fisiológicos e biológicos das nanopartículas de ouro na terapia fototérmica e na terapia fotodinâmica. As nanopartículas de ouro acumulam-se devido à vasculatura do tecido tumoral que resulta num efeito fototérmico em resposta à radiação de infravermelho próximo e às espécies reativas de oxigénio produzidas pela presença do fotossensibilizador levando assim à apoptose e necrose dos tecidos tumorais (adaptado de ¹²⁴).....	47

Lista de siglas e abreviaturas

5-FU – 5-fluorocilo

AFM – Microscopia de força atômica

AuNP – Nanopartícula de ouro

DDS – Sistema de entrega de fármacos

DLS – Dispersão dinâmica de luz

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DOX – Doxorrubicina

EGFR – Recetor do fator de crescimento epidérmico

EPR – Efeito de retenção e permeabilidade aumentada

FDG – ¹⁸F-fluorodesoxiglicose

FRET – Transferência de energia de fluorescência

HER-2 – Recetor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano

HSP – Proteína de choque térmico

LSPR – *Surface plasmon resonance* localizado (LSPR)

MDR – Multirresistência a fármacos

MRI – Imagem por ressonância magnética

MTX – Metotrexato

NIR – Infravermelho próximo

NNI – Instituto Nacional de Nanotecnologia

NP – Nanopartícula

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAI – Imagem fotoacústica

PDT – Terapia fotodinâmica

PEG – Polietilenoglicol

PET – Tomografia por emissão de positrões

PS – Fotossensibilizador

PTA – Agentes fototérmicos

PTT – Terapia fototermal

PTX – Paclitaxel

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SEM – Microscopia eletrônica de varrimento

SPR – *Surface Plasmon Resonance*

TC – Tomografia computadorizada

TEF – Transferência de elétrons fotoinduzida

TEM – Microscopia eletrônica de transmissão

TGF- β 1 – Fator de crescimento transformador β 1

1. Introdução

O cancro é, atualmente, um dos maiores problemas de saúde pública e uma das principais causas de morte no mundo sendo que, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2020, levou a cerca de 10 milhões de mortes. Cancro refere-se ao termo genérico para várias patologias que podem afetar qualquer parte do corpo que se caracterizam pela multiplicação anormal e excessiva de células que podem, também, invadir outras partes do corpo ¹. Diversos fatores de risco podem aumentar a possibilidade do aparecimento de cancro. Estes fatores podem ser inerentes à pessoa, como seja a idade, nível hormonal, e a predisposição genética, mas podem também ser fatores externos, como o consumo de álcool e tabaco, dieta desadequada, inatividade física, e agentes infecciosos ².

Existem várias possibilidades para o tratamento de cancro. Este geralmente passa por cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia, e imunoterapia. O tratamento utilizado é selecionado de acordo com o tipo de cancro, a sua localização, e as características do paciente ¹. A quimioterapia é uma das principais opções no tratamento do cancro envolvendo o uso de fármacos tóxicos de forma a matar as células cancerígenas. Atualmente, apesar de grandes avanços na terapêutica anticancerígena, verifica-se ainda uma fraca acumulação/retenção dos fármacos no tumor e o aparecimento de multirresistências a fármacos (MDRs) induzida pela quimioterapia levando, assim, a falhas na terapêutica contra o cancro. As MDRs são das principais causas das falhas das terapêuticas anticancerígenas. Estas são mecanismos de defesa por parte das células tumorais de forma a torná-las resistentes aos fármacos. Isto pode ocorrer através de diversos mecanismos como o aumento do efluxo nas células tumorais, da inativação dos fármacos, ou da reparação do DNA das células tumorais ³. A principal forma de contornar estes obstáculos à quimioterapia é através de um aumento de dose ou um aumento da frequência da administração do fármaco e embora estas abordagens possam melhorar a eficácia da quimioterapia também levam a uma maior toxicidade e incidência de efeitos adversos nos doentes.

Assim, no âmbito de melhorar a terapêutica contra o cancro, surgiu a nanomedicina, sendo esta a aplicação da nanotecnologia para fins médicos. De acordo com o Instituto Nacional de Nanotecnologia (NNI), a nanotecnologia é definida como “a ciência, a engenharia, e a tecnologia utilizadas à escala nano (1–100 nanómetros), na qual fenómenos únicos permitem novas aplicações em vários campos, desde a química, física,

e biologia à medicina, engenharia, e eletrônica.”⁴ A nanotecnologia é a capacidade de observar, medir, manipular, controlar, e produzir matéria à escala nanométrica⁵. A aplicação das nanotecnologias pode ser benéfica para a sociedade em vários setores como na indústria da energia, no setor alimentar, na informação e comunicação, e também na medicina e na produção de materiais e produtos médicos⁶.

Muitas das aplicações da nanotecnologia nestes setores envolvem nanomateriais com propriedades e efeitos diferentes desses mesmos materiais mas com tamanhos superiores. Esses materiais são chamados de nanopartículas (NPs). Estas têm uma grande potencial utilidade na medicina devido às suas propriedades únicas como elevada superfície de contacto, capacidade de incorporar outros compostos, propriedades quânticas. Estas propriedades podem apresentar várias vantagens em relação às terapêuticas convencionais. Estas podem possibilitar o direcionamento às células tumorais, a acumulação nas zonas tumorais, o aumento da segurança dos fármacos associados a estas, e, também, podem ajudar a combater as MDRs^{7,8}.

As NPs têm diversas potenciais aplicações na medicina. Estas podem ser utilizadas tanto em diagnóstico do cancro como em terapêutica. No caso da sua utilização para diagnóstico, as NPs podem ser utilizadas em biossensores, instrumentos utilizados para realizar análises a amostras biológicas para as quais as NPs têm uma alta afinidade permitindo assim a deteção do cancro, em imagiologia, as NPs adequadamente modificadas podem ser direcionadas para tecidos tumorais e podem permitir ou contribuir para que seja obtida uma imagem desses tecidos. Já a nível de terapêutica, as NPs podem ser úteis em processos de fotoablação, Terapia fototérmica (PTT) e Terapia fotodinâmica (PDT) nos quais a morte celular é provocada pelo aumento localizado de temperatura (hipertermia), devido à incidência de radiação eletromagnética nas NPs, ou em mecanismos de entrega de fármacos, em que fármacos citotóxicos são associados às NPs de modo a serem mais direcionados às zonas tumorais⁹.

Alguns estudos sugerem que, apesar do potencial clínico das NPs, estas possam apresentar alguma toxicidade. As NPs, devido às suas características, podem-se acumular em determinadas células, levando assim a toxicidade a nível dos órgãos onde estas se acumulam¹⁰.

Existem diversos métodos de síntese que podem ser utilizados na produção de nanopartículas e estes podem ser divididos em dois grupos: os métodos *top-down*, que

envolve maioritariamente métodos de produção físicos, e os métodos *bottom-up*, em que são na sua maioria utilizados processos químicos ^{11,12}. Os métodos de síntese deste tipo de materiais podem ser otimizados para que se obtenham NPs de diversas formas e tamanhos, sendo que as diferentes estruturas das NPs podem ter funcionalidades diferentes. Isto permite obter NPs mais específicas para a finalidade pretendida ^{13,14}. A escolha do método de síntese a utilizar terá em conta a finalidade de utilização das NPs e, assim, terá também em conta a forma e o tamanho final pretendido para as NPs.

As NPs podem ser funcionalizadas com diversos tipos de compostos como proteínas, polissacarídeos, peptídeos, aminoácidos e outras pequenas moléculas de forma a alterar as suas características químicas e físicas. A funcionalização é, então, o processo de alterar as características químicas, físicas, e/ou biológicas da superfície das NPs proporcionando, assim, novas propriedades e/ou funções ¹⁵.

As nanopartículas de ouro (AuNPs), em particular, têm sido o foco de diversos estudos com especial atenção dada às suas propriedades únicas que incluem a sua relativa baixa toxicidade, área de superfície, biocompatibilidade e comportamento ótico, e que devem ser consideradas no seu processo de produção ^{16,17}. Uma das características mais importantes das AuNPs é a *surface plasmon resonance* (SPR), fenómeno que se refere às oscilações coletivas de eletrões induzidas pela incidência de uma onda eletromagnética num determinado ângulo num metal, que depende maioritariamente do tamanho e da forma da NP ^{11,18}.

Esta monografia tem como foco a revisão e descrição da utilização das AuNPs no cancro. Será feita a caracterização e a descrição da síntese e da funcionalização da superfície destas e, também, será feita uma revisão e descrição das aplicações das AuNPs relacionadas com o cancro, seja como método de transporte de fármacos, como meio de diagnóstico ou como método de tratamento, bem como as vantagens e desvantagens da sua utilização.

2. Nanopartículas de ouro

As nanopartículas são formulações que têm até 100 nm de tamanho. O tamanho destas é comparável ao tamanho de unidades funcionais existentes no organismo o que possibilita interações com lípidos, ácidos nucleicos, proteínas, por exemplo. Isto permite uma maior facilidade de entrada das NPs nas suas células alvo comparativamente a partículas maiores de semelhante constituição. As NPs podem melhorar as características dos compostos associados a estas permitindo uma melhor estabilidade e solubilidade destes, um aumento do tempo de semivida destes no organismo e um aumento da eficácia e segurança dos compostos ¹⁹.

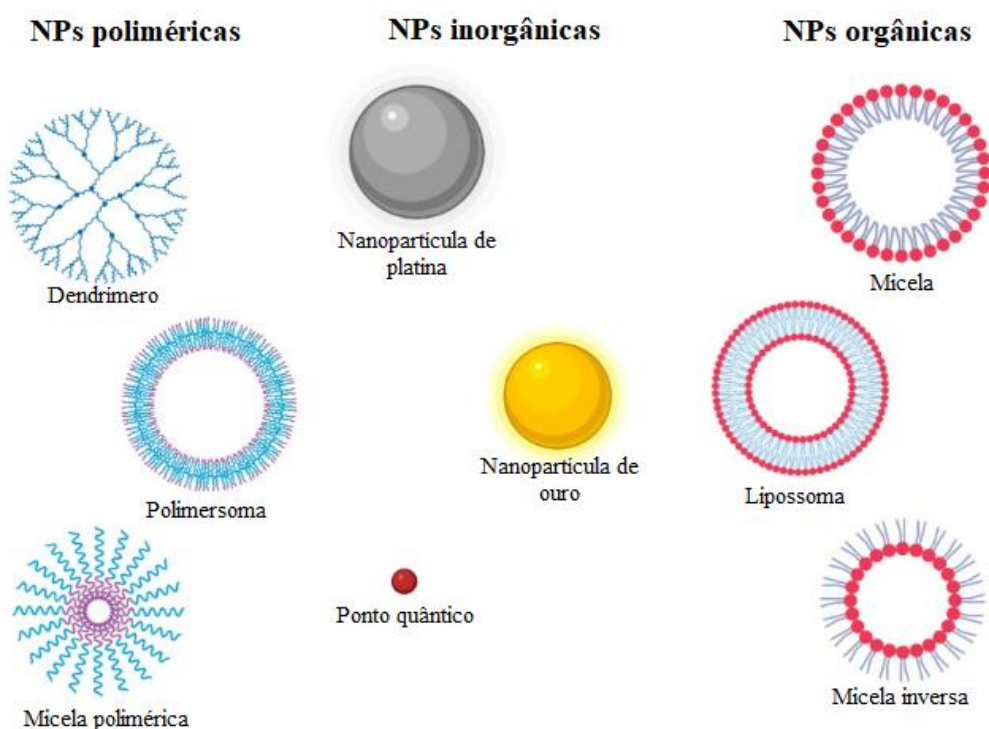


Figura 2.1. Tipos de nanopartículas (adaptado de ²⁰).

As NPs podem ser divididas em três classes de acordo com as suas composições, as NPs baseadas em lípidos, polímeros, e em materiais inorgânicos. As NPs à base de lípidos são compostas por lípidos, de origem natural ou sintética, que têm na sua composição elementos hidrofóbicos e hidrofílicos. Estes, devido à sua constituição, possibilitam o transporte de fármacos com propriedades hidrofílicas, hidrofóbicas, e lipofílicas. As NPs poliméricas são constituídas por polímeros que compõem o núcleo desta ou são utilizados para a funcionalização da NP. Estes são facilmente manipulados de forma a apresentarem diversas estruturas e características. Por fim, as NPs inorgânicas são partículas que têm por base materiais inorgânicos, metais como o ouro, a prata, o ferro, entre outros, que apresentam certas propriedades físicas, elétricas, magnéticas, e

ópticas. As NPs que têm por base estes materiais também adotam estas suas propriedades. Estas NPs são formuladas de forma a apresentarem uma grande variedade de formas e tamanhos e, assim, propriedades e funcionalidades diferentes ¹⁹.

De entre os materiais utilizados para a produção das NPs, o ouro é muito utilizado uma vez que este é um material inerte, com elevada maleabilidade, e com propriedades ópticas únicas. À medida que o tamanho das partículas de ouro diminui, particularmente quando estas atingem a nanoescala, o seu comportamento também é alterado. Nas NPs, a área superficial é inversamente proporcional ao tamanho destas. A elevada área superficial das NPs possibilita a conjugação com fármacos e outros compostos, o que permite alterar parâmetros farmacocinéticos, estabilidade e solubilidade. Esta elevada área superficial tem um papel importante nas aplicações das NPs em certas áreas como em imagiologia e na terapia fototérmica ²¹.

Estas têm, então, um tamanho e forma facilmente e precisamente manipuláveis, e uma facilidade de ajustar a química da superfície ao conjugar com várias moléculas como, ácidos nucleicos, polímeros, anticorpos, e pequenas moléculas terapêuticas ^{22,23}. Estas características das AuNPs tornam-nas excelentes candidatas para várias aplicações, sendo particularmente atraentes na biomedicina devido à sua estabilidade e biocompatibilidade superiores, simplicidade de funcionalização de suas superfícies, baixa toxicidade, tempo de semivida elevado, transporte, libertação controlada, e menor degradação de fármacos ^{9,24}.

A área de superfície é também uma propriedade fundamental das AuNPs e de acordo com o tamanho das partículas, a finalidade destas pode variar. As NPs mais pequenas são preferidas para a utilização na terapia fototérmica uma vez que a luz é mais adsorvida pelas NPs, devido à elevada área superficial destas, e convertida em calor levando à morte celular. Já as partículas de maior tamanho são mais utilizadas em processos de imagiologia devido a uma maior capacidade de dispersão da radiação incidente. Para além disso, as respostas biológicas às NPs também variam consoante o tamanho das partículas, sendo que as proteínas plasmáticas ligam-se mais facilmente a NPs de tamanho inferior e, assim, mais facilmente produzem uma resposta biológica ^{20,21}.

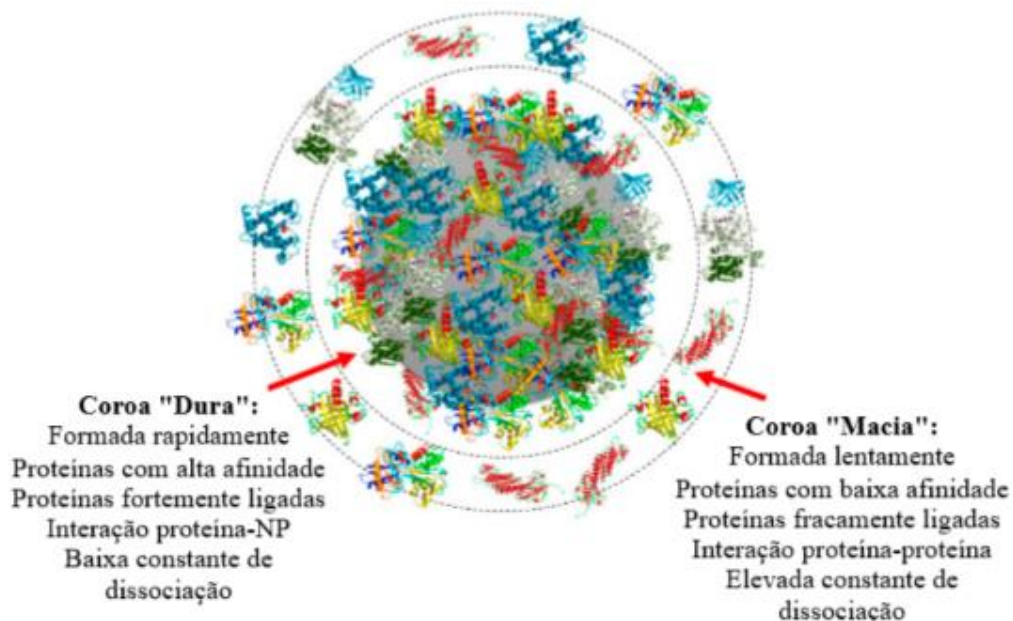


Figura 2.2. Características da coroa “dura” e da coroa ”macia” das nanopartículas (adaptado de ¹²).

As AuNPs, de forma a chegarem o seu alvo, devem passar por várias barreiras biológicas que podem ter um impacto nas suas atividades. Quando estas entram em sistemas biológicos, as suas superfícies interagem rapidamente com proteínas, e outras biomoléculas resultando na formação da chamada coroa proteica. Esta pode ser dividida em coroa “dura” e coroa “macia”, dependendo da afinidade que as proteínas têm à superfície da NP ¹².

Esta camada proteica provoca modificações das interações entre as NPs e os sistemas vivos. Assim, a criação da coroa proteica pode ser prejudicial para muitas das aplicações *in vivo* das AuNP uma vez que, quando estas são expostas a um ambiente biológico, as proteínas da camada proteica podem interferir estericamente com os ligandos previamente ligados à superfície. Esta interferência pode provocar alterações como redução da captação celular, biodistribuição alterada, alterações na química de superfície, e aumento do tempo de circulação. Estes fatores levam a alterações no comportamento das partículas fazendo com que estas possam não exercer a sua ação ^{12,21}.

A criação da coroa proteica pode também desencadear respostas imunológicas por parte do organismo, uma vez que as células do sistema imunitário podem detetar determinados componentes da coroa. Pode também apresentar alguma heterogeneidade uma vez que a coroa é uma mistura dinâmica e complexa de moléculas o que pode resultar em alguma variabilidade na ação das AuNPs. A coroa proteica é, então, uma estrutura altamente mutável com um grande impacto na biodistribuição das NPs pelo organismos,

uma vez que pode provocar alterações no tamanho e na carga das NPs, afetando o processo de internalização nas células ^{12,21}.

As NPs não modificadas são rapidamente opsonizadas no sangue, permitindo assim uma rápida depuração pelos macrófagos. As opsoninas, localizadas na superfície das AuNPs, são detetadas pelas células imunes que fazem parte do sistema reticuloendotelial (RES), processo que irá decidir o caminho de internalização das AuNPs e afetará o destino destas no organismo ^{20,21}.

O SPR é uma das características mais importantes das AuNPs, e o fator principal que controla este efeito é o tamanho e a forma das partículas. Este efeito é definido como uma oscilação coletiva de elétrons livres na interface do material que ocorre quando determinados comprimentos de onda interagem com a banda de condução da interface do material, o que resulta numa oscilação dipolo que depende do campo eletromagnético da luz incidente. O pico da oscilação ocorre numa frequência de luz específica, que é referida como SPR. Dependendo do tamanho das AuNPs, a banda de SPR pode-se estender da região da luz visível ao infravermelho (IR). O SPR, através da incidência de luz e oscilação dos elétrons à superfície da AuNP, também permite a ejeção de fótons com comprimento de onda igual ao da luz incidente. Estes processos permitem atingir o aquecimento direcionado, seja para danificar as células próximas das AuNPs ou para se proceder à libertação controlada de fármacos ^{21,25}.

Um outro efeito relacionado com o SPR das AuNPs é a modificação das características de fluorescência dos fluoróforos proximais. Isto deve-se ao fenómeno de transferência de energia de fluorescência (FRET), ao mecanismo de transferência de elétrons fotoinduzido (TEF), e às características fototérmicas causadas pela absorção da luz e sua subsequente dissipação. Estas propriedades manifestam-se no espectro da luz visível até ao infravermelho próximo (NIR), tornando assim as AuNPs em ótimas ferramentas em aplicações como imagiologia e diagnóstico, e também permite a monitorização das propriedades morfológicas das AuNPs durante a síntese destas ²⁶.

3. Síntese de nanopartículas de ouro

A síntese das AuNPs pode ser feita, principalmente, através de dois tipos de processos, Top-Down e Bottom-up. Os diversos métodos de síntese de AuNPs podem ser

agrupados dentro destes dois grupos sendo que dentro dos processos Top-Down encontram-se métodos como ablação a laser, ejeção de iões, moagem, ou tecnologia de aerossol enquanto os processos Bottom-up incluem métodos químicos, eletroquímicos, térmicos, ou fotoquímicos ^{12,27}. Os métodos Top-Down consistem na transformação de determinado material em partículas de tamanho inferior através da destruição da sua matriz cristalina ²⁸. Já os métodos Bottom-Up consistem em átomos, moléculas, ou nanopartículas que se agregam de forma a formar estruturas complexas significativamente maiores ²⁹.

O método de síntese utilizado tem um papel muito importante no tamanho e forma das NPs resultantes. Estes são, então, escolhidos tendo em conta as propriedades finais pretendidas.

3.1. Método de Turkevich

Este método foi utilizado pela primeira vez em 1951 e desde então é um dos métodos mais utilizados para a síntese de AuNPs. De um modo geral, envolve a redução de iões ouro (Au^{3+}) a átomos de ouro (Au^0). Ao controlar a quantidade do agente redutor utilizado, como ácido ascórbico, aminoácidos, luz UV, ou citrato, o pH, e a temperatura a que a reação ocorre pode-se obter NPs de tamanhos muito variados e com níveis de estabilidade diferentes ^{28,30}.

Esta reação envolve três passos ²⁸:

- Os iões metálicos sofrem um processo de redução muito rápido formando, assim, aglomerados de partículas metálicas com cerca de 1-2 nm de tamanho.
- A redução mantém-se, embora a um nível reduzido, e os aglomerados metálicos passam por um processo de coalescência, ou seja, vão-se juntar a outros aglomerados. As AuNPs vão aumentando de tamanho, atingindo os 2,5 nm, devido à incorporação de átomos de ouro.
- Quando os aglomerados alcançam cerca de 5 nm de tamanho verifica-se um aumento drástico do crescimento das AuNPs e a maioria dos átomos de ouro são rapidamente reduzidos.

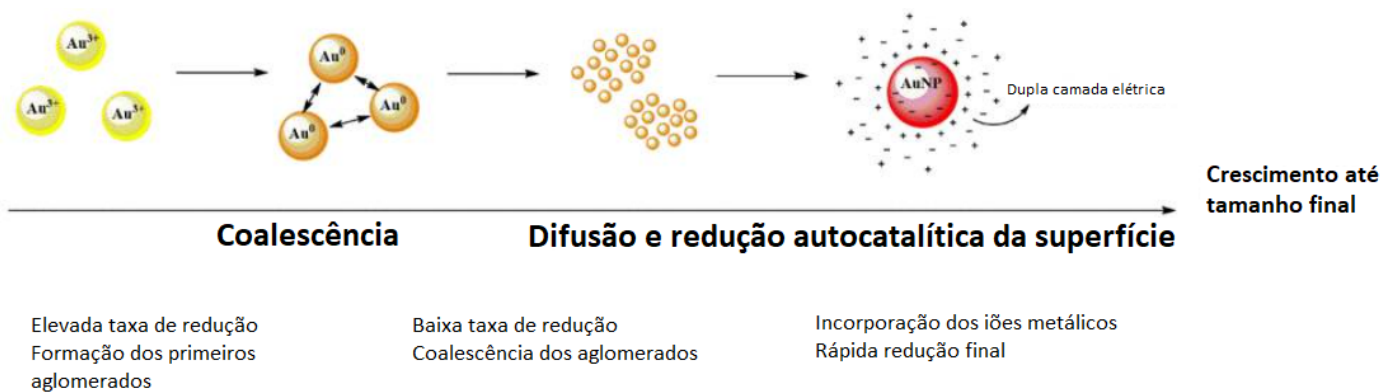


Figura 3.1. Formação de nanopartículas de ouro pelo método de Turkevich (adaptado de ²⁸).

O método de Turkevich é, então, um método simples e fácil de reproduzir capaz de produzir um elevado número de AuNPs esféricas de tamanho controlável. Este também apresenta algumas limitações como o facto de as AuNPs produzidas não poderem ser utilizadas para fins biomédicos, pois no processo de produção são utilizados reagentes tóxicos ³¹.

Desde a sua primeira utilização têm-se observado vários avanços em termos de conhecimentos e tecnologias o que permitiram desenvolver AuNPs numa ampla gama de tamanhos, cerca de 16-147 nm, utilizando este método ²⁷.

3.2. Método de Brust-Schiffrin

O método de Brust-Schiffrin foi pela primeira vez utilizado em 1994. Este é um processo rápido que consiste na produção de aglomerados hidrofóbicos de ouro altamente estáveis ³⁰. Isto é feito através da redução de Au^{3+} com um agente redutor, geralmente borohidreto de sódio (NaBH_4), e da estabilização com grupos tiol ²⁹. A superfície das AuNPs apresenta uma grande afinidade para o tiol, devido à troca de eletrões entre estes e a conseqüente formação de uma forte ligação covalente, e a ligação destes às NPs impede o seu crescimento permitindo assim produzir AuNPs predominantemente esféricas com tamanhos inferiores a 10 nm, altamente estáveis e com possibilidade de controlar os seus tamanhos ^{28,30}.

Este método pode dividir-se em dois tipos de sistemas, de uma fase e de duas fases, sendo o de duas fases o mais utilizado ²⁹. A principal diferença entre os dois sistemas é que no de uma fase o precursor do Au^{3+} e o agente redutor estão presentes num solvente polar. No sistema de duas fases, uma solução aquosa de ácido cloroáurico

(HAuCl_4) é combinada com uma solução de tolueno e de brometo de tetraoctilamônio (TOAB). Esta mistura é agitada, de forma a facilitar a transferência do tetracloroaurato (AuCl_4^-) para a fase orgânica, e adiciona-se dodecanotiol e borohidreto de sódio (NaBH_4). As fases são separadas e a fase orgânica é então evaporada com uso de um evaporador rotativo. É adicionado etanol, de forma a retirar o excesso de tiol, e a solução é mantida a 18°C durante 4 horas. Forma-se um precipitado que é então filtrado e lavado com etanol para que possa ser recolhido e, por fim, é dissolvido em tolueno e precipitado novamente com etanol. Este processo origina AuNPs com um tamanho de cerca de $2,5\text{ nm}$ ²⁸.

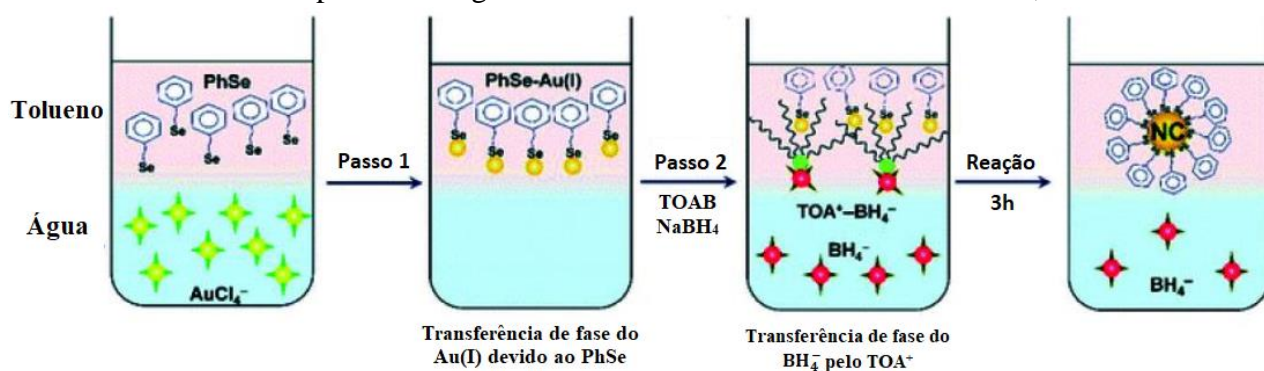


Figura 3.2. Síntese de nanopartículas de ouro pelo método de Brust-Schiffrin de duas fases (adaptado de²⁹).

3.3. Crescimento mediado por sementes

Este é um método relativamente simples muito utilizado para a síntese de NPs de várias formas e tamanhos. Este método consiste na utilização de AuNPs pré-formadas, as sementes, como modelos para a síntese de NPs de tamanhos maiores. Assim, neste método é possível o controlo preciso da forma e do tamanho final das NPs sintetizadas sendo assim um método com um alto nível de reprodutibilidade, de rendimento, e de qualidade^{27,32}.

A síntese por este método começa pela preparação das sementes com o tamanho e forma pretendidos. Os métodos de Turkevich e Brust-Schiffrin são comumente utilizados para a síntese das sementes. Estas são formadas em condições de supersaturação química possibilitando, assim, um processo de nucleação, definido como a rápida formação de pequenos aglomerados de átomos em solução. Quando os núcleos atingem um tamanho crítico, com uma estrutura bem definida e estável, obtêm-se as sementes³³.

Com as sementes já formadas, estas são transferidas para uma solução com iões metálicos e agentes redutores, como NaBH_4 ou ácido ascórbico, de forma a impedir um processo de nucleação adicional e acelerar a produção das AuNPs na forma pretendida. Estas continuam a crescer até obterem certos tamanhos e/ou características. Esta fase de crescimento é mais lenta do que a fase inicial de nucleação para que haja um melhor controlo do crescimento e forma final das NPs ^{25,33}.

3.4. Métodos Biológicos

Mais recentemente surgiram os métodos de síntese biológicos, considerados uma alternativa mais sustentável em relação aos métodos de síntese mais tradicionais. Para além disso, são métodos simples e económicos. São chamados de métodos verdes por serem menos agressivos para o ambiente ^{28,34}.

Estes métodos utilizam certos componentes encontrados em bactérias, fungos, plantas, e algas com potencial redutor para produzir as NPs ³⁵. Dentro dos mencionados, as plantas são preferidas para a biossíntese de NPs em larga escala. Isto porque a cinética deste processo é superior à de outras metodologias biossintéticas, sendo ainda equivalente à produção de NPs por via química ³⁶.

Assim, os processos biossintéticos à base de plantas apresentam algumas vantagens em relação a métodos à base de microrganismos ou métodos químicos, como rapidez de preparação, não são poluentes, não apresentam toxicidade, são fáceis de realizar, e produzem NPs estáveis. Apesar disso, também apresentam algumas limitações como a impossibilidade de modificar geneticamente como se pode fazer com os microrganismos, e a dificuldade de controlar os tamanhos e as formas das NPs resultantes ^{31,36}.

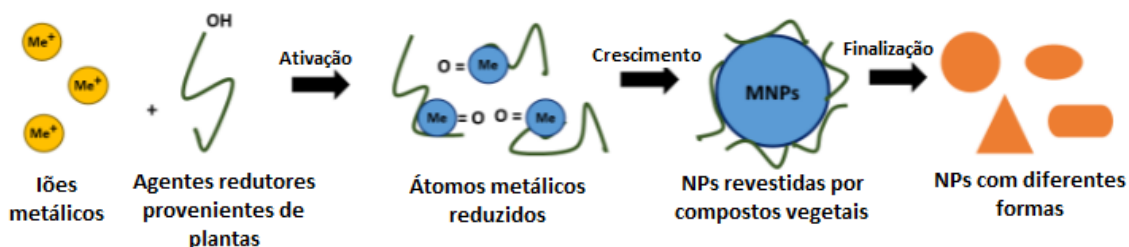


Figura 3.3. Síntese biológica de nanopartículas metálicas através de extratos de plantas (adaptado de ³⁶).

Os processos de síntese mediados por microrganismos funcionam através da captura dos íons metálicos, que são então convertidos em átomos pela atividade de enzimas resultantes da atividade celular. Dependendo do local onde ocorre a síntese das NPs, o processo pode ser considerado intracelular ou extracelular. Nestes processos, ao controlar parâmetros como pH, temperatura, concentração de ouro, e tempo de exposição, a velocidade de formação de NPs e o tamanho destas podem ser controladas ³⁴.

A síntese biológica também pode ser concretizada através do uso de algas. Os polissacarídeos, as proteínas, e as enzimas encontradas nas algas podem ser utilizados como catalisadores, agentes redutores, ou como tampão nas reações com os íons metálicos. Esta reação ocorre em três fases: a fase de ativação, a fase de crescimento, e a fase de terminação. Na fase de ativação, ocorre a redução dos íons metálicos. A fase de crescimento é caracterizada pela coalescência espontânea das NPs em partículas maiores, e na fase de terminação é definida a forma final das NPs. Em comparação com os outros biorredutores, estas oferecem algumas vantagens como a sua estrutura macroscópica, a sua elevada capacidade de absorção de metais, e o seu baixo custo ^{35,34}.

3.5. Ablação a laser

O método de ablação a laser é um método Top-Down muito eficaz que permite a síntese de NPs com tamanho controlado através da adição de moléculas específicas, e formas variáveis. Os parâmetros do laser, como comprimento de onda, duração do pulso, composição do líquido, absorção do metal, podem ser controlados de forma a controlar diversas características das NPs como o tamanho, a forma, as propriedades da superfície, e o seu estado de agregação. O processo de ablação a laser, de um modo geral, resulta em NPs de elevada estabilidade e rendimentos elevados ^{28,34}. O processo de ablação a laser pode ser realizado tanto em vácuo como num meio líquido, sendo que em líquido é considerado o mais eficaz ³⁴. A ablação a laser em líquido é um método muito utilizado devido à sua simplicidade, ao seu baixo custo, e à rápida formação de AuNPs ³¹.

Neste método, de um modo geral, uma placa de metal é irradiada com um laser e, como resultado disto, os eletrões são ejetados da superfície metálica na forma de uma pluma de plasma, contendo as nanopartículas. Devido à pressão exercida pelo líquido circundante e à diferença de temperatura entre a pluma e o líquido, esta fica contida no

líquido sendo a energia transferida para este formando uma bolha de cavitação. Esta, por fim, passa por um período de expansão e contração até colapsar, libertando as NPs para o líquido, sendo assim possível extraí-las ³⁷.

3.6. Moagem

Este é um processo físico que envolve a destruição de materiais até serem obtidas estruturas na escala nanométrica. Durante a moagem, a destruição dos materiais é resultante da energia mecânica aplicada pelas bolas ou rolos que realizam o processo. Esta pode ocorrer por diversos processos como, impacto, cisalhamento, compressão, e fricção. A forma e o tamanho das NPs resultantes deste processo estão dependentes de vários fatores como o tempo, a intensidade, a temperatura, e o meio onde é realizada a moagem ^{28,38}.

Dentro destes processos de moagem, existem diversos métodos que podem ser utilizados para a produção de NPs. Estes métodos envolvem processos com recurso a impacto de bolas e impacto de bolas de alta energia, moinhos planetários, ou através de moagem húmida. As moagens com impacto de bolas e de bolas de alta energia são muito semelhantes com a diferença que as bolas de alta energia são de um material capazes de gerar maiores forças de impacto. Estes métodos processam-se da mesma forma, as partículas de ouro e as bolas são colocadas num contentor numa plataforma que roda. A redução das partículas dá-se devido ao impacto entre estas e as bolas e as bolas umas com as outras ³⁹.

O processo de moagem húmida refere-se à moagem de um sólido em suspensão num meio líquido. Neste, à semelhança dos outros métodos de moagem, as partículas são introduzidas num contentor mas com a adição de um solvente líquido que, ao ser adicionado, irá ajudar a prevenir a aglomeração das partículas ³⁸.

Os métodos de síntese com recurso a moagem são muito utilizados uma vez que são processos económicos que permitem um grande nível de produção em larga escala. Para além disso, também são métodos que requerem poucos ou nenhuns químicos sendo, assim, processos com um baixo impacto ambiental. Apesar das vantagens apresentadas por estes métodos, há a possibilidade de se criarem aglomerados de partículas e de serem introduzidas impurezas nos meios durante o processo.

3.7. Microemulsão

Uma microemulsão pode ser descrita como um sistema termodinamicamente estável com duas fases imiscíveis. Este método envolve a formação de pequenas micelas, as gotículas, de água em óleo (A/O), de óleo em água (O/A), ou de óleo em óleo (O/O). As microemulsões têm pelo menos três componentes, a fase polar, a fase não polar, e um surfactante. O surfactante tem a função de agente emulsificante. A microemulsão A/O tem especial interesse na preparação de coloides metálicos e é muitas vezes obtida através de processos de redução química. Este interesse deve-se à capacidade da água, presente no interior das micelas, de solubilizar os precursores metálicos e utilizá-los na produção de NPs ⁴⁰.

O método de microemulsão permite obter NPs com tamanho e distribuição controlados, sendo que os parâmetros da produção podem ser ajustados de forma a obter NPs com vários tamanhos e com formas maioritariamente esféricas. Esta é uma reação muito estável que pode ser realizada em apenas um passo de forma a reduzir o tempo e os custos da preparação ⁴¹.

Há, então, duas formas principais de obter as NPs através do método de microemulsão. Pode-se misturar o precursor metálico com o agente redutor na microemulsão ou misturar uma microemulsão com o precursor metálico com outra microemulsão contendo o agente redutor ⁴⁰.

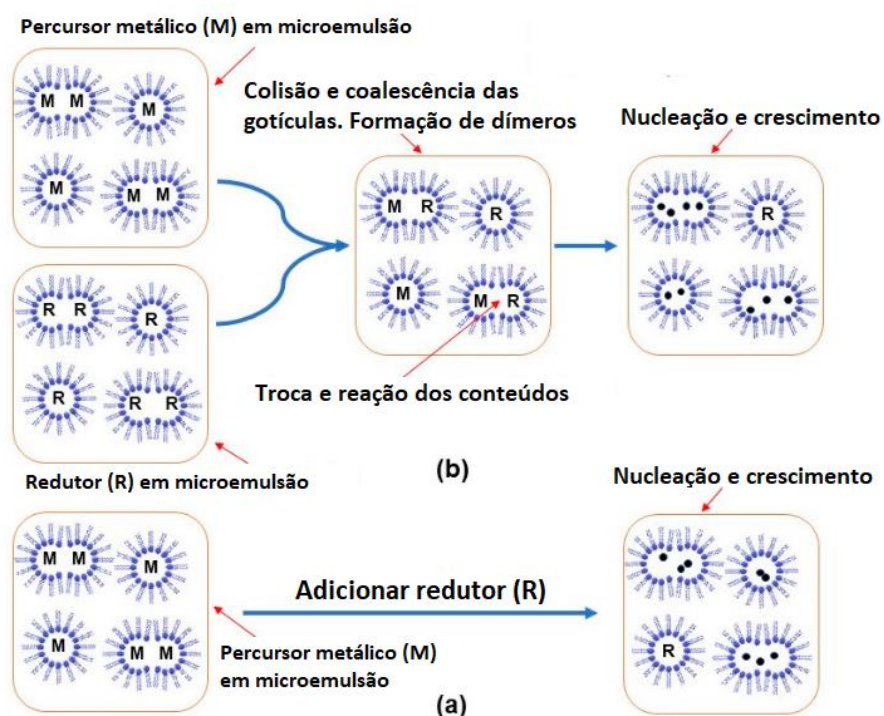


Figura 3.4. Formação de nanopartículas de ouro pelo método de microemulsão (a) pela adição do agente redutor à microemulsão contendo o precursor metálico e (b) pela mistura das duas microemulsões contendo o precursor metálico e o agente redutor (adaptado de ⁴⁰).

4. Funcionalização de superfície

A funcionalização da superfície das NPs é um dos aspectos mais importantes, juntamente com o tamanho e a forma, que determina a aplicação final das NPs bem como a toxicidade e a biodistribuição destas. Estes processos de modificação da superfície das NPs podem ter diversos efeitos como uma maior proteção contra agregação, um aumento da biocompatibilidade e da biodisponibilidade das NPs, interações mais específicas com determinadas células, um transporte mais direcionado, uma maior acumulação em determinados órgãos, um aumento do tempo de semivida das NPs no plasma, e uma redução da toxicidade e imunogenicidade destas ^{25,26}.

Os componentes que participam na modificação da superfície das NPs, os ligandos funcionais, bem como as biomoléculas, têm as suas funções adicionais. Estes permitem manter a estabilidade do complexo, fazer modificações adicionais da superfície, impedir a agregação com outras NPs, permitindo ainda fazer outras reações de funcionalização ²⁸.

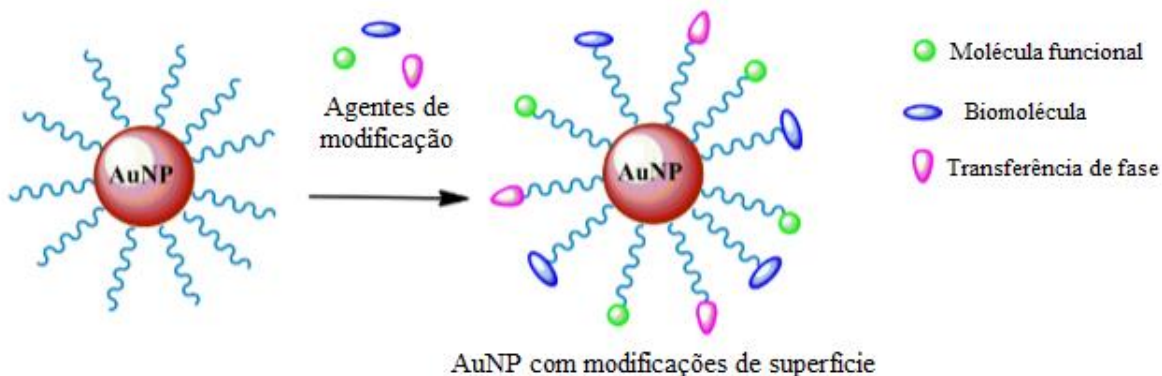


Figura 4.1. Nanopartículas de ouro com modificação de superfície multifuncional (adaptado de ²⁷).

A acumulação nas células alvo pode ser realizada por dois mecanismos, direcionamento passivo e ativo. As NPs não modificadas apresentam um direcionamento passivo para as zonas tumorais devido ao efeito de retenção e permeabilidade aumentada (EPR), que segundo este certas moléculas e partículas têm tendência a ficar mais retidos em zonas tumorais em comparação com tecido normal devido ao aumento da angiogênese estimulada pelos tumores ²². Este permite a acumulação das NPs nas zonas tumorais devido às características destas como o tamanho e a forma. Neste caso, não havendo um direcionamento específico para as células tumorais, as NPs podem também acumular em órgãos e tecidos saudáveis podendo originar problemas de toxicidade ¹².

O direcionamento ativo para as zonas tumorais envolve a funcionalização da superfície das AuNPs para que estas sejam mais específicas para determinados recetores em células cancerígenas como, por exemplo, o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) ou o recetor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2). A funcionalização pode ser feita por diversos métodos, o que permite obter várias possibilidades de aplicações para as AuNPs, nomeadamente como sistemas de entrega de fármacos (DDS). Cada vez mais estão a ser desenvolvidos métodos de modificar as superfícies das NPs de forma a aumentar as suas especificidades a moléculas biológicas. Estes métodos para a funcionalização das AuNPs podem ser feitos através do uso de grupos funcionais ou combinações destes, como polietilenoglicol (PEG), albumina de soro bovino (BSA), aminoácidos, péptidos, oligonucleótidos, anticorpos, e outras moléculas semelhantes ²⁷.

Existem diversos métodos pelos quais se pode realizar a modificação da superfície das AuNPs, que podem ser divididos em métodos por interações covalente e métodos por interações não covalentes. Os métodos por interações covalentes consistem na ligação de moléculas à superfície das AuNPs através de ligações químicas, sendo que a ligação do enxofre ao ouro é das mais importantes e mais utilizadas para a funcionalização das AuNPs devido à forte ligação covalente metal-ligando entre o ouro e o enxofre. Já as modificações por interações não covalentes são interações mais simples que não envolvem a troca de eletrões, e estas podem ser interações eletrostáticas, interações π , e por forças de Van der Waals ⁴².

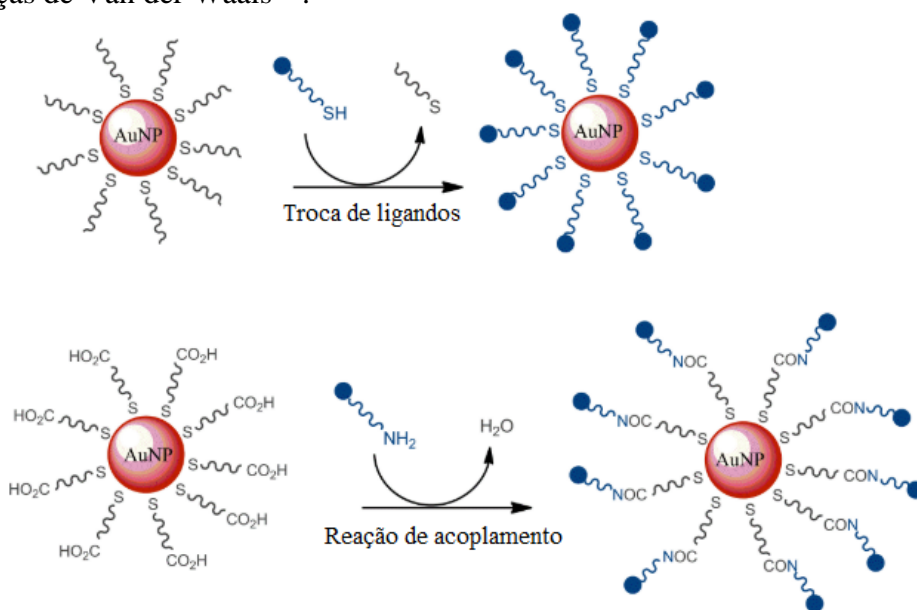


Figura 4.2. Funcionalização de superfície de nanopartículas de ouro pelo método de troca de ligandos (adaptado de ²⁸).

Um dos métodos mais utilizados para a funcionalização de superfície de AuNPs é pela troca de ligandos. A troca de ligandos para a funcionalização da superfície das AuNPs é um método por interações covalentes em que os ligandos iniciais ligados às AuNPs são substituídos por outros. Neste método, as moléculas que são inseridas na NP deslocam os ligandos já lá ligados para fora da superfície da NP. Isto acontece pois os ligandos que se estão a ligar têm uma interação mais forte com a superfície metálica da NP do que os ligandos que saem na troca ⁴³.

Este método, geralmente, envolve a substituição de um grupo tiol de forma a incorporar vários outros tipos de moléculas na superfície das AuNPs. Os ligandos utilizados neste processo são vários, podendo ser polímeros, biomoléculas, fármacos, entre outros. Após esta substituição dos ligandos pode ainda ocorrer uma reação de acoplamento que possibilita funcionalizações adicionais ²⁸.

A modificação de superfície das AuNPs por interações eletrostáticas é um método não covalente que também pode ser utilizado para a funcionalização destas. Este método aproveita a carga do citrato, que é um agente protetor muito utilizado na produção das AuNPs uma vez que este faz um revestimento das partículas estabilizando-as e impedindo a sua agregação e oferecendo um controlo do tamanho e da forma final das NPs, e, assim, estará presente na superfície da NP, para realizar as interações eletrostáticas com outras moléculas que possuam uma carga oposta. Para a realização deste método, o controlo do pH da solução é essencial pois uma variação deste pode alterar a carga das moléculas e assim alterar o seu grau de ligação às AuNPs, bem como a sua funcionalidade. Assim, é geralmente adicionada uma solução tampão de forma a estabilizar o pH da solução de forma a maximizar as interações eletrostáticas ^{28,43}.

A química de clique é uma classe de reações simples, que englobam um elevado número de substratos, rápidas, altamente seletivas em que participam duas moléculas pequenas e biocompatíveis, e que geram rendimentos elevados com nenhuns ou produtos secundários benignos. Estas são reações muito utilizadas em processos de bioconjugação e permitem fazer a combinação de determinados substratos com certas biomoléculas através da criação de fortes ligações covalentes entre estas ⁴⁴.

A funcionalização por química de clique é um método muito versátil e eficaz na modificação de superfície de AuNPs que permite a adição de diversos grupos funcionais e moléculas compatíveis com a superfície metálica da NP ⁴³.

5. Caracterização

São vários os métodos utilizados para se fazer a caracterização das AuNPs. Dependendo dos requisitos experimentais e posteriores aplicações, as NPs têm de ser caracterizadas da forma considerada mais adequada. A caracterização de NPs é um parâmetro complexo que não pode ser definido por métricas convencionais, como composição química e concentração uma vez que as NPs possuem propriedades químicas e físicas únicas ⁴⁵. Assim, a caracterização através do uso das diversas técnicas tem uma grande importância no controlo de qualidade das AuNPs produzidas.

Estas propriedades e, conseqüentemente, os comportamentos das AuNPs estão dependentes dos tamanhos, das formas, das modificações feitas, entre outros, é necessária a utilização dos diversos métodos em conjunto para que seja feita uma caracterização mais precisa possível e, assim, alcançar um controlo de qualidade mais elevado na produção das AuNPs.

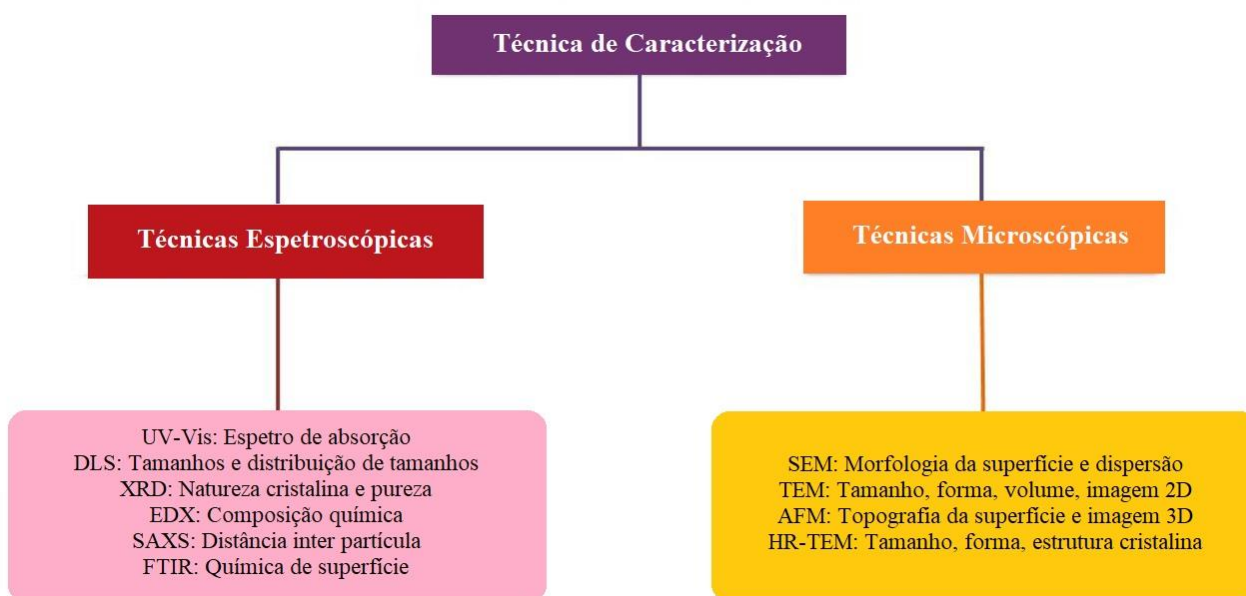


Figura 5.1. Métodos de caracterização das nanopartículas e as informações que podem ser obtidas a partir destes (adaptado de ⁴⁶).

Há dois métodos gerais para a caracterização das AuNPs, os métodos espectroscópicos e os métodos microscópicos. Os métodos espectroscópicos baseiam-se nas propriedades físicas das NPs, como o tamanho, a morfologia, a forma, a estabilidade coloidal, e o comportamento eletrónico das suas superfícies sendo estas propriedades atribuíveis aos efeitos quânticos presentes na nanoescala. Técnicas como espectroscopia UV-Vis, dispersão dinâmica de luz (DLS), difração de raios-X (XRD), espectroscopia de raios-X por dispersão de energia (EDX), dispersão de raios-X de ângulo curto (SAXS), e

espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) são muito utilizadas para a caracterização espectroscópica de NPs ^{45,46}. Os métodos microscópicos para caracterização de NPs incluem técnicas como microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varrimento (SEM), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), e microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HR-TEM). Estas técnicas fornecem, maioritariamente, informações sobre o tamanho, forma, e estado de dispersão das NPs e também servem como meio de visualização das NPs ⁴⁵.

A espectrofotometria UV-Vis é um dos métodos mais comuns para a caracterização do *surface plasmon resonance* localizado (LSPR). A banda de LSPR é suscetível a mudanças de tamanho, distribuição, agregação, e de superfície, sendo que o pico de absorção varia com as variações dos tamanhos e das formas das partículas. Assim, este é um método simples e rápido para a análise do tamanho e distribuição das AuNPs ²⁸.

A DLS é uma técnica utilizada para obter a distribuição de tamanhos hidrodinâmicos das AuNPs e também para obter os seus estados de agregação. A determinação da distribuição depende da intensidade das flutuações da luz dispersa. Esta é uma técnica útil quando é necessário analisar o estado das partículas em solução e, para além disso, o diâmetro da camada exterior das AuNPs funcionalizadas pode ser determinado ao comparar o diâmetro destas antes e depois da funcionalização ²⁸.

O FTIR é uma excelente ferramenta que permite a caracterização da química da superfície das NPs e as modificações feitas a esta. Este método permite a identificação de moléculas presentes na superfície das AuNPs, através do espectro obtido durante a análise com este método. Este método também permite a identificação de trocas de ligandos na superfície, observadas através das alterações no espectro. Assim, este é um método que permite a avaliação da superfície das AuNPs e das suas interações com outras moléculas. No entanto, este método funciona no espectro de infravermelho sendo que o comprimento de onda que atinge as NPs é muito maior do que estas e, assim, a interação entre estes é fraca e origina sinais de baixa intensidade. Embora este método não seja o mais adequado para a caracterização de NPs de tamanhos mais reduzidos, este permite a caracterização dos componentes na superfície das AuNPs. Assim, este método deve ser associado a outros métodos ^{47,48}.

A microscopia de transmissão eletrônica (TEM) é outra técnica muito utilizada na nanotecnologia uma vez que possibilita a obtenção de imagens de alta resolução de

partículas na nanoescala. As imagens providenciadas pela TEM permitem fazer a determinação dos tamanhos, das formas, e da distribuição dos tamanhos das AuNPs ²⁸. Neste, um raio de elétrons atravessa a amostra e, ao chegar ao detetor, uma imagem é formada com base na intensidade dos elétrons transmitidos.

A SEM é muito utilizada para o estudo das AuNPs e providencia informação relativamente à distribuição de tamanhos, estado de agregação, e morfologia das nanopartículas ⁴⁹. Esta é uma técnica que complementa outros métodos de caracterização de AuNPs como TEM e DLS.

A AFM é um método de caracterização de NPs que pode ser aplicado às AuNPs para a sua caracterização. Neste método são avaliadas as forças de interação entre a amostra, neste caso a AuNP, com um sensor. Isto permite a obtenção e a visualização de imagens topográficas de alta resolução da superfície de AuNPs individuais e o estudo da superfície de AuNPs individuais ⁵⁰. Este é, então, um método versátil e útil na caracterização de AuNPs individuais ou de pequenos conjuntos de partículas que pode ser utilizado juntamente com outros métodos para uma caracterização mais precisa.

6. Aplicações médicas

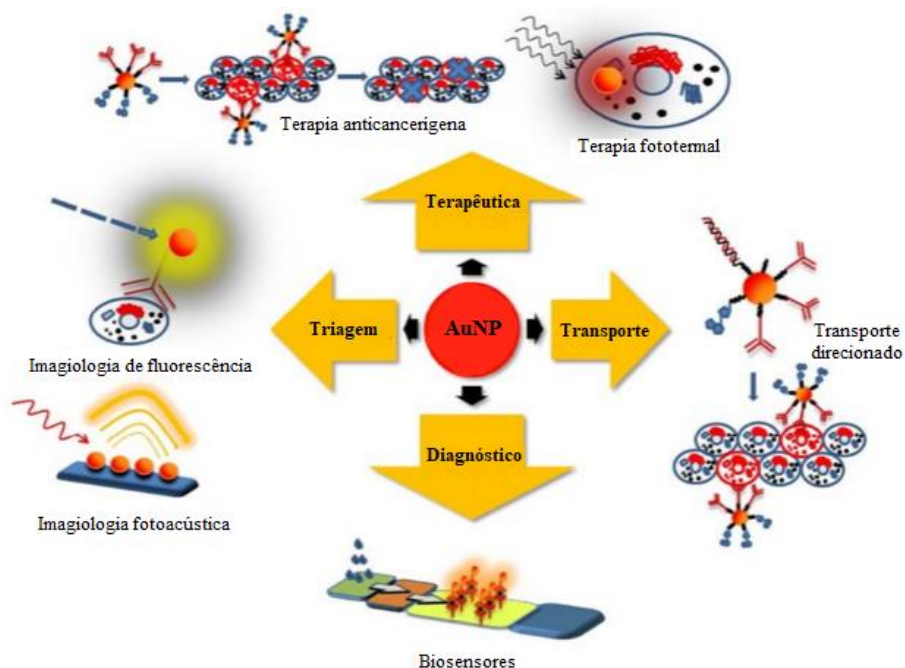


Figura 6.1. Esquematização de várias aplicações das nanopartículas de ouro (adaptado de ⁴⁵).

O ouro já é utilizado na medicina desde há vários séculos, desde o antigo Egito à medicina tradicional chinesa em que foi utilizado para o tratamento de vários problemas

de saúde como doenças cardíacas e artrite reumatoide ⁵¹. Nas últimas décadas, as AuNPs têm sido desenvolvidas de diversos modos sendo que a síntese destas é cada vez mais confiável e com rendimentos elevados ⁵².

6.1. AuNPs como meio de diagnóstico

As AuNPs podem ser ferramentas potentes no diagnóstico de cancro e podem ajudar a superar algumas das limitações dos meios de diagnósticos atuais sendo, então, uma componente muito importante do tratamento do cancro. Um diagnóstico correto e precoce permitirá mais facilmente direcionar mais a terapêutica do cancro, permitindo assim melhores resultados no tratamento.

A utilização de AuNPs pode aumentar a sensibilidade e especificidade dos métodos de detecção de cancro. Como mencionado anteriormente, estas podem ter as suas superfícies funcionalizadas com diversos compostos. A adição de compostos como anticorpos ou aptâmeros às AuNPs, permitem o direcionamento para certos marcadores tumorais. Assim, a ligação das AuNPs funcionalizadas aos recetores tumorais permite uma maior acumulação das partículas facilitando assim a detecção e o diagnóstico do cancro ⁵³.

Podem, também, ser adicionados às NPs compostos que apresentem algum grau de fluorescência que, permitindo que estas sejam detetadas por diversos instrumentos e possibilitando assim o diagnóstico do cancro através da observação das imagens obtidas. Para além disso, as próprias AuNPs também apresentam fluorescência. Esta forte fluorescência pode ser detetada quando nas AuNPs é incidida uma forte luz e estas atingem um estado de energia de alta excitação ⁵³.

As AuNPs são muito versáteis e podem ser utilizadas para realizar o diagnóstico tanto *in vitro* como *in vivo*, uma vez que as suas propriedades óticas e eletrónicas as tornam ótimos agentes em imagiologia e detecção do cancro. As AuNPs são, de entre os vários nanomateriais, excelentes candidatas como componentes de agentes de contraste para diferentes métodos de diagnóstico instrumental como tomografia computadorizada (TC), ressonância magnética (MRI), tomografia por emissão de positrões (PET), por fluorescência (FI) e fotoacústica (PAI). As AuNPs podem funcionar como agentes

multimodais uma vez que podem ser ativas em várias destas técnicas de diagnóstico simultaneamente ¹⁴.

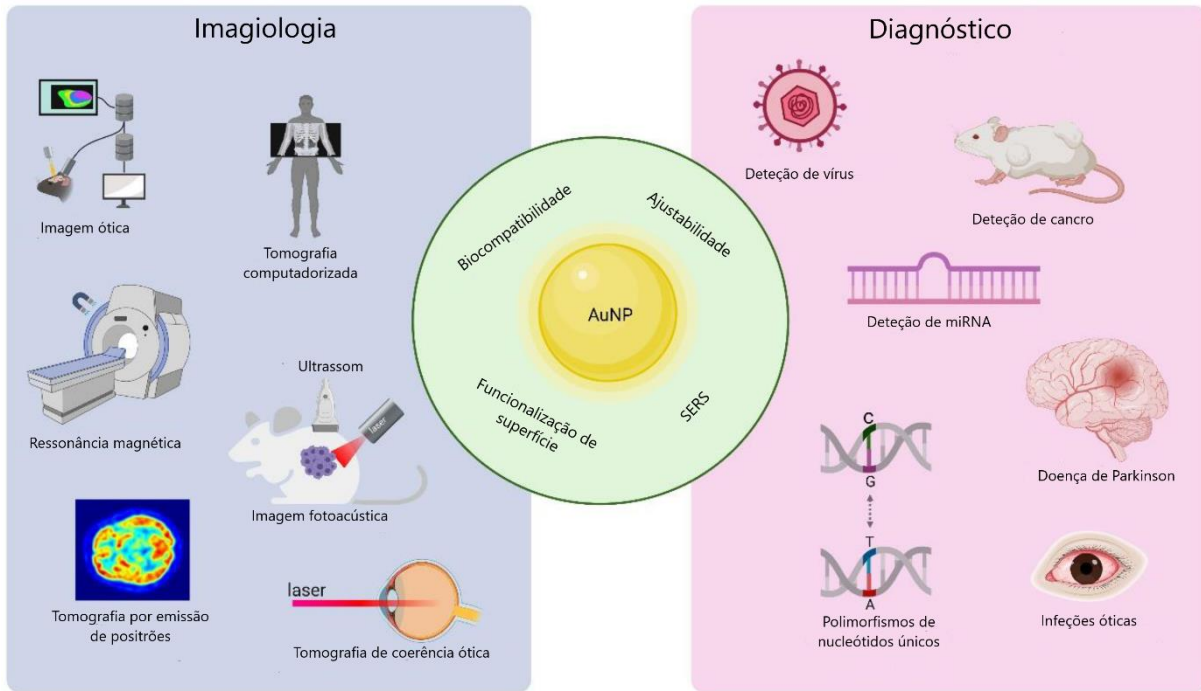


Figura 6.2. Aplicações das nanopartículas em imagiologia e diagnóstico (adaptado de ²⁴).

6.1.1. Imagem por tomografia computadorizada

A TC é uma técnica de imagiologia que permite obter uma imagem a três dimensões (3D) do objeto em estudo. Esta técnica utiliza o poder penetrante dos raios-X de forma a obter uma série de imagens a duas dimensões (2D) de diversos pontos de vista. Após a captação destas imagens, um algoritmo de reconstrução analisa as imagens e junta-as de modo a se obter então a representação 3D desejada ⁵⁴.

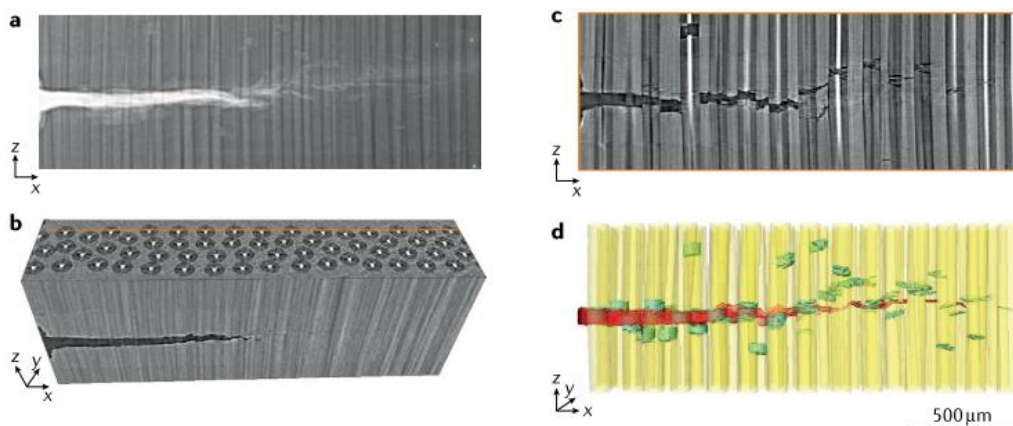


Figura 6.3. Tomografia computadorizada de uma falha num compósito monofilamentar. (a) radiografia; (b) tomografia reconstruído; (c) corte transversal virtual; (d) renderização final (adaptado de ⁵⁴).

A TC baseada na atenuação dos raios-X por parte dos tecidos é um dos métodos mais utilizados no diagnóstico clínico devido à sua alta precisão. Neste método,

geralmente são utilizados elementos com um número atômico elevado e com uma elevada densidade uma vez que têm tendência a ter uma melhor absorção dos raios-X. Uma vez que os tecidos moles do organismo são compostos por carbono, hidrogénio, oxigénio, e outros elementos, estes não apresentam grande capacidade de atenuação dos raios-X, sendo que a utilização dos agentes de contraste com um número atômico elevado é necessário para a TC ⁵⁵.

Os agentes de contraste mais utilizados são compostos baseados em moléculas contendo iodo como o iopamidol, iodixanol ou ioexol. No entanto, estes compostos apresentam um curto tempo de permanência no organismo devido aos seus pequenos pesos moleculares e são necessárias concentrações elevadas para um contraste adequado, que podem levar a efeitos adversos como vómitos e reações anafiláticas. Estas características podem limitar o seu uso na prática clínica ⁵⁶. Devido às limitações apresentadas pelos compostos de iodo, tem-se suscitado um interesse crescente em compostos baseados em NPs como agentes de contraste alternativos ⁵⁷.

Os agentes de contraste com NPs oferecem várias vantagens comparativamente com os agentes de contraste de moléculas pequenas. As NPs possuem uma boa biocompatibilidade, e as suas formas, os tamanhos, e a química de superfície podem ser ajustados para aplicações biomédicas específicas. As AuNPs, devido ao elevado número atômico do ouro e da densidade deste, possuem boas propriedades de atenuação de raios-X ⁵⁷. As AuNPs absorvem os raios-X mais fortemente do que os tecidos circundantes o que cria um forte contraste na imagem por TC ⁵⁸. Assim, as AuNPs são agentes ideais para a observação de vários tipos de tecidos como tecido tumoral, vasos sanguíneos, e outras estruturas anatómicas.

Para se obter imagens mais precisas e eficazes de zonas tumorais pelo uso de TC é benéfico modificar a superfície das AuNPs com ligandos que permitam fazer o direcionamento específico para essas zonas tumorais. Isto pode ser feito pela adição de diversos compostos como anticorpos, péptidos, aptâmeros, vitaminas, entre outros. Estes agentes provocam uma maior acumulação das AuNPs na zona tumoral o que permite a obtenção de imagens mais precisas dessa zona ^{59,60}.

Khademi *et. al.* investigaram a utilização de AuNPs funcionalizadas com ácido fólico e cisteamina para a imagiologia TC direcionada para células cancerígenas *in vitro*. Foi observado que estas AuNPs não afetam a morfologia celular, a viabilidade, nem o

ciclo celular das células tumorais e permitiram a observação da zona tumoral através da imagem TC. Estas AuNPs específicas para as células tumorais foram consideradas seguras para o uso em TC de tumores in vivo ⁵⁹.

6.1.2. Imagem por ressonância magnética

A MRI é uma técnica de imagiologia não invasiva e não ionizante que é particularmente útil na deteção e caracterização de patologias de tecidos moles. Esta fornece imagens 3D de alta resolução, penetração, e contraste. Isto faz da MRI uma das primeiras escolhas para o diagnóstico e monitorização de várias doenças sendo o cancro uma delas ⁶¹.

Este método apresenta algumas vantagens, relativamente a outros métodos de imagem, como uma melhor deteção, e diferenciação, de lesões de tecidos normais e uma melhor caracterização desta, não utiliza radiação ionizante sendo que pode ser utilizado em grávidas e crianças, e permite assim uma maior repetibilidade. Este método apresenta também algumas limitações como maiores tempos de análise, custo superior, ruído devido aos pulsos de radiofrequência (RF) e a própria construção da máquina podem induzir preocupação do doente ⁶².

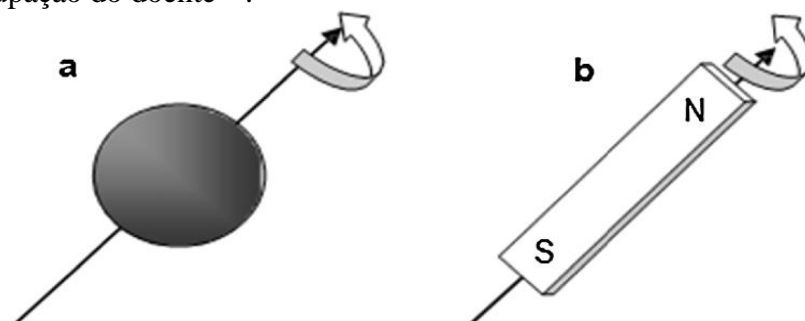


Figura 6.4. Spin nuclear. O núcleo, ao rodar, induz um campo magnético, apresentando um comportamento semelhante a um íman. A direção das setas representa a direção do campo magnético ⁶³.

O método de MRI faz uso das propriedades magnéticas dos prótons de água presentes no organismo de forma a gerar imagens. Após exposição a um campo magnético externo (B_0), os momentos magnéticos resultantes dos spins nucleares dos prótons, previamente dispostos de forma aleatória, alinham-se no plano longitudinal. De seguida, um pulso de RF é utilizado para excitar o sistema e mudar o momento magnético dos prótons para o plano transversal. Quando o pulso é desligado, a magnetização transversal decai com o tempo, processo chamado de relaxamento, que gera então os sinais que podem ser reconstruídos em imagens 3D ^{61,64}.

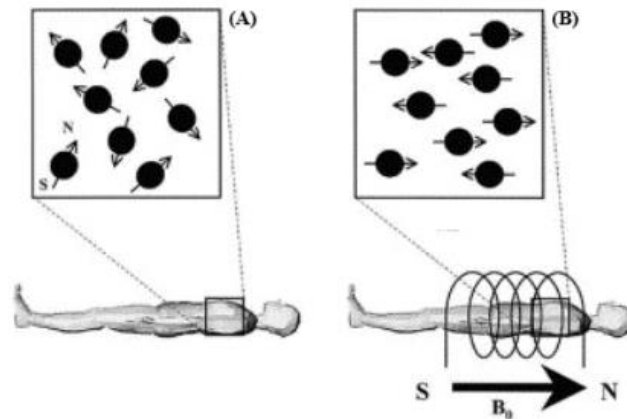


Figura 6.5. (A) Na ausência de um campo magnético, os momentos magnéticos dos núcleos estão distribuídos de forma aleatória. (B) Na presença de um forte campo magnético externo, os núcleos alinham-se paralelamente ou antiparalelamente ao campo externo (adaptado de ⁶⁵).

O processo de relaxamento pode seguir dois caminhos distintos, independentes e simultâneos: o relaxamento T_1 e o relaxamento T_2 . Diferentes tecidos do organismo têm tempos de relaxamento T_1 e T_2 diferentes sendo essa diferença explorada para criar o contraste em imagens de MRI. No entanto, dada a abundância de moléculas de água presentes no organismo, a razão sinal-ruído é muito baixa o que leva à obtenção de um baixo contraste, o que contribui para a baixa sensibilidade intrínseca da MRI ⁶⁶.

Devido a esta baixa sensibilidade intrínseca da MRI são utilizados agentes de contraste externos de forma a contornar esta limitação deste método de imagem ao encurtar os tempos de relaxamento dos prótons. Estes agentes de contraste podem ser divididos em dois grupos, de acordo com modo operacional. Estes podem ser agentes de contraste T_1 , ou agentes de contraste positivos, que diminuem os tempos de relaxamento longitudinal e aumentam a iluminação da zona de acumulação destes, ou agentes de contraste T_2 , ou agentes de contraste negativos, que diminuem o tempo de relaxamento transversal e escurecem a área à volta destes ⁶⁶.

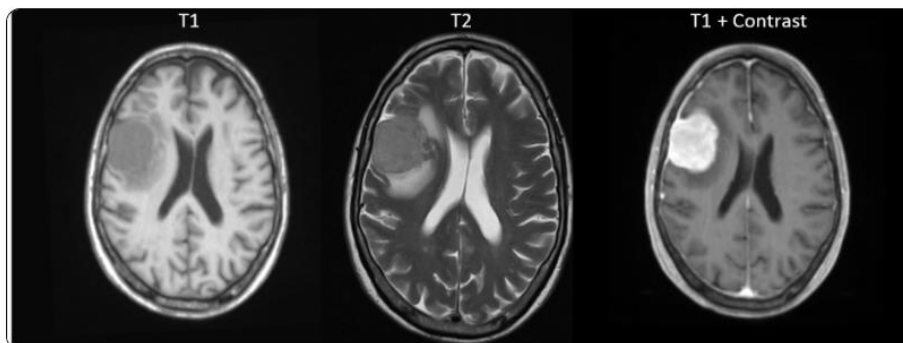


Figura 6.6. Menigioma visualizado mais facilmente devido à utilização do gadolínio como agente de contraste ⁶⁷.

Diversas formulações têm sido estudadas e utilizadas como agentes de contraste para MRI, desde complexos metálicos a nanopartículas, sendo que atualmente estão

aprovados para uso clínico agentes de contraste à base de gadolínio (Gd^{3+}). Estes apresentam alguns problemas relacionados principalmente com a sua rápida excreção e com a possibilidade de libertar metais pesados livres *in vivo*. De forma a ultrapassar esta limitação, têm-se estudado a utilização destes compostos na forma de NPs ou associados a estas. As NPs apresentam algumas vantagens como a composição facilmente ajustável, o controlo da farmacocinética da NP, e uma melhoria das características magnéticas destas ⁶⁶.

As AuNPs podem ser utilizadas como transportadoras dos agentes de contraste, uma vez que podem ser funcionalizadas com compostos que permitam o direccionamento para determinadas zonas do organismo. A utilização das AuNPs para transporte dos agentes de contraste permite a utilização de menores doses destes e pode-se observar uma menor acumulação nos tecidos, o que irá diminuir possíveis efeitos adversos que possam surgir com a utilização dos agentes de contraste. Alric *et. al.* investigaram a utilização de um complexo de AuNPs com Gd e observaram que apesar do baixo conteúdo de ouro e gadolínio utilizado, as partículas foram facilmente detetadas e demonstraram não se acumular nos vários órgãos, circulando livremente e reduzindo, assim, o aparecimento de efeitos tóxicos ⁶⁸.

Para além do seu uso como agente de contraste, as AuNPs podem ser associadas a materiais superparamagnéticos, como é o caso de óxidos de ferro. Esta associação combina as propriedades magnéticas únicas das NPs e permite a funcionalização com outros compostos, incluindo anticorpos que permitirá então uma ação mais direcionada ²⁴. Iancu *et. al.* avaliaram a capacidade de aumento do sinal MRI e a citotoxicidade *in vivo* do complexo de NPs de ferro revestidas com ouro, como agente de contraste. Neste estudo foram obtidas NPs estáveis que produziam um sinal T_2 quando injetadas em ratos indicando que podem ser utilizadas como agentes de contraste negativo em MRI e, para além disso, uma redução da toxicidade também foi observada ⁶⁹.

6.1.3. Imagem por tomografia por emissão de positrões

A PET é uma técnica de imagem que utiliza um vasto número de radiofármacos marcados com isótopos radioativos que permitem a obtenção de imagens da distribuição destes através de um detetor externo ⁷⁰. Este método é capaz de detetar e fornecer informações sobre alterações moleculares sugestivas de tecidos tumorais, em tempo real,

podendo ser direcionada a uma variedade de alvos moleculares ^{71,72}. A imagem obtida por este método não é geralmente adequada para uma localização anatômica precisa da patologia. Assim, este método pode ser associado à TC de forma a obter imagens anatômicas de alta resolução ⁷³.

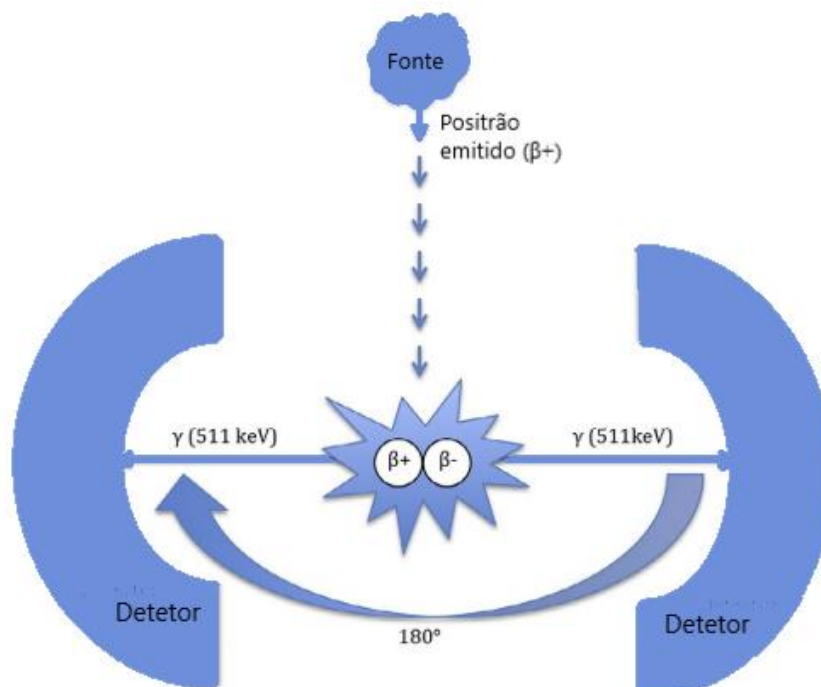


Figura 6.7. Após emissão, os positrões combinam com os elétrons. Isto resulta na produção de dois fótons antiparalelos que atingem detectores opostos (adaptados de ⁷⁴).

Os radiofármacos utilizados concentram-se num determinado tecido do organismo, de acordo com as características do fármaco e do tecido. Estes, devido ao seu decaimento, libertam positrões. Um positrão é uma antipartícula de um eletrão com massa e carga idênticas. Estes positrões, após a sua libertação, colidem com os eletrões e as massas destes são convertidas em energia. São emitidos dois fótons γ em direções opostas, que são então detetadas pelos instrumentos. Esta emissão simultânea de dois fótons está na base da imagem pelo método PET ⁷⁵.

São vários os radiofármacos que podem ser utilizados na imagem PET sendo que o ¹⁸F-fluorodesoxiglucose (FDG) é o mais importante e o mais utilizado, particularmente na imagem PET de diversos cancros. O FDG apresenta uma maior acumulação nos tecidos tumorais. Isto deve-se à elevada expressão do transportador de moléculas de glucose nas células tumorais e a um aumento da concentração e ação da enzima hexocinase. Assim, o FDG é um excelente radiofármaco para a imagem PET de tumores ^{75,76}.

Para além das aplicações da PET na delimitação do cancro, esta também pode ser utilizada para avaliar o perfil farmacocinético de vários compostos incluindo NPs ⁷⁷. A visualização da distribuição das NPs é muito importante sendo que a abordagem mais prudente é através da incorporação de radioisótopos nas NPs, processo chamado de marcação radioativa permitindo assim o seu acompanhamento através da PET ⁷⁸.

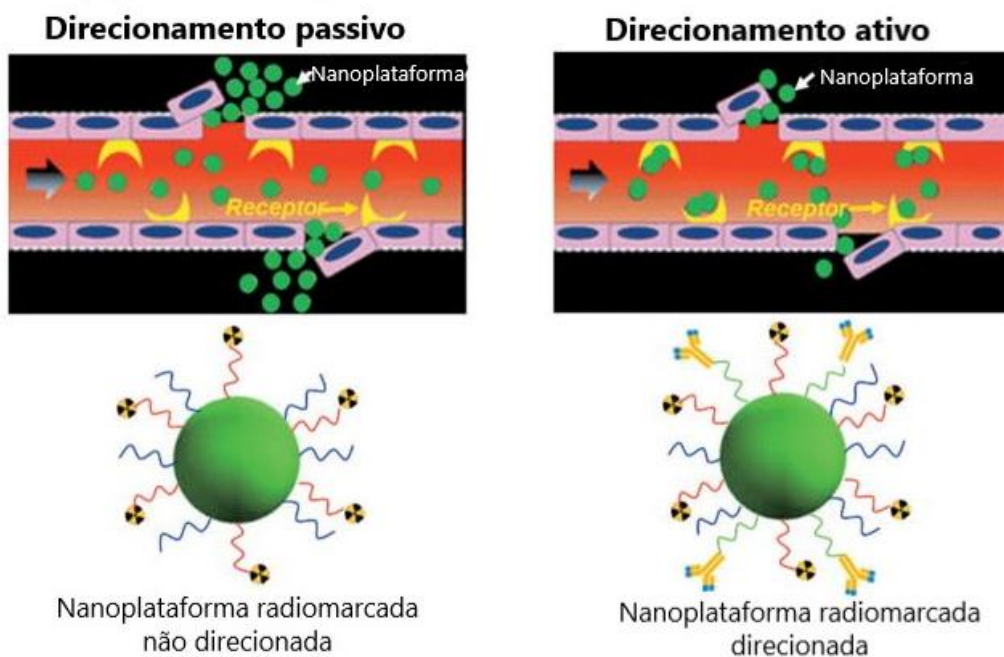


Figura 6.8. Esquematização do direcionamento passivo mediado pelo efeito de retenção e permeabilidade aumentada e do direcionamento ativo baseado em nanopartículas inorgânicas radiomarcadas (adaptado de ⁷⁸).

O uso de NPs radiomarcadas na PET apresenta algumas vantagens. As NPs podem atuar como amplificadores de sinal, uma vez que a sua elevada área superficial permite incorporar um maior número de radionuclídeos e agentes de direcionamento, possibilitando uma maior concentração de radionuclídeos no tecido alvo e um sinal mais forte. Esta amplificação de sinal leva a melhores índices de contraste e a uma maior sensibilidade do método em comparação com os radiofármacos convencionais. A incorporação de agentes de direcionamento para o alvo pretendido permite melhorar a deteção de diversos tipos de cancros, e leva a um maior tempo de semivida dos fármacos no organismo em comparação com os fármacos livres o que leva a uma melhor biocompatibilidade das NPs ^{77,78}.

As AuNPs representam uma excelente plataforma para funcionalização com compostos de direcionamento específicos e modificação para deteção por técnicas de imagem. A depuração renal rápida é uma característica apresentada pelas AuNPs preferível para o seu uso em diagnóstico radioativo de forma a evitar uma sobrecarga de

radiação nos tecidos saudáveis. Para além disso, a possibilidade de conjugação com radionuclídeos tornam-nas ótimas opções para a imagem PET ⁷⁹.

Ghiassian *et. al.* realizaram a síntese de AuNPs funcionalizadas com nitrona e radioetiquetadas com ¹⁸F. Este agente de imagem PET resultante foi então testado *in vivo* e apresentou uma ampla biodistribuição e captação pelos órgãos de fundo, como os rins, os pulmões, e o coração, relativamente baixa. As AuNPs com nitrona representam uma ferramenta versátil para ligação de radiofármacos, e outros compostos, e proceder à sua entrega direcionada a tecidos específicos ⁸⁰.

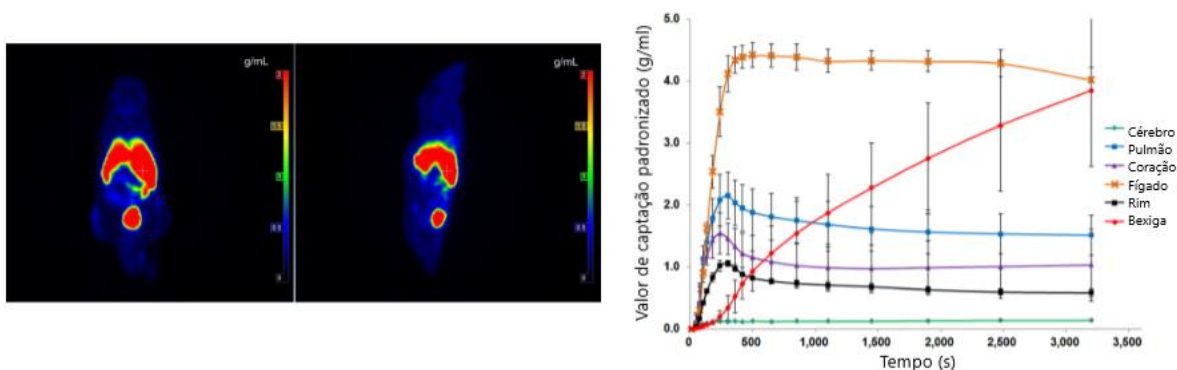


Figura 6.9. Esquerda: Imagem PET de [18F]AuNP 40-60 minutos após injeção IV em murganhos, imagem coronal (esquerda) e sagital (direita). Direita: Curvas do valor de captação padronizado 1 hora após injeção (adaptado de ⁸⁰).

Zhao *et. al.* demonstraram um novo método de radiomarcagem de ⁶⁴Cu para AuNPs e avaliou a sua farmacocinética *in vivo* bem como a sua capacidade de imagem PET num modelo de cancro da mama em murganhos. Observou-se que a incorporação direta do ⁶⁴Cu nas AuNPs proporcionou uma radiomarcagem estável e permitiu obter um controlo preciso da atividade desse complexo. Conseguiu-se obter direcionamento para alvos específicos e também uma minimização da interpretação incorreta das imagens PET, sendo que as AuNPs com ⁶⁴Cu podem ser consideradas como plataformas para futuras imagens PET oncológicas ⁸¹.

6.1.4. Imagem fotoacústica

O método de PAI é um método de imagiologia que combina os princípios da técnica de ultrassom e dos efeitos fotoacústicos induzidos por laser. Este método permite a visualização não invasiva de tecidos com alto contraste e resolução, nomeadamente o sangue presente na vasculatura. Assim, as principais aplicações clínicas são

predominantemente na detecção, no diagnóstico, ou monitorização terapêutica de patologias em que se verifica alterações na vasculatura, como cancro e inflamação ⁸².

Quando os tecidos são irradiados por fotões, dependendo do comprimento de onda da luz incidente, os fotões penetram até determinada profundidade. Já no tecido, os fotões são espalhados e absorvidos, o que ocorre devido a moléculas absorventes de luz, os cromóforos. A energia ótica absorvida induz um aumento transitório de temperatura localizado que gera pressão por meio de expansão termoelástica ⁸³.

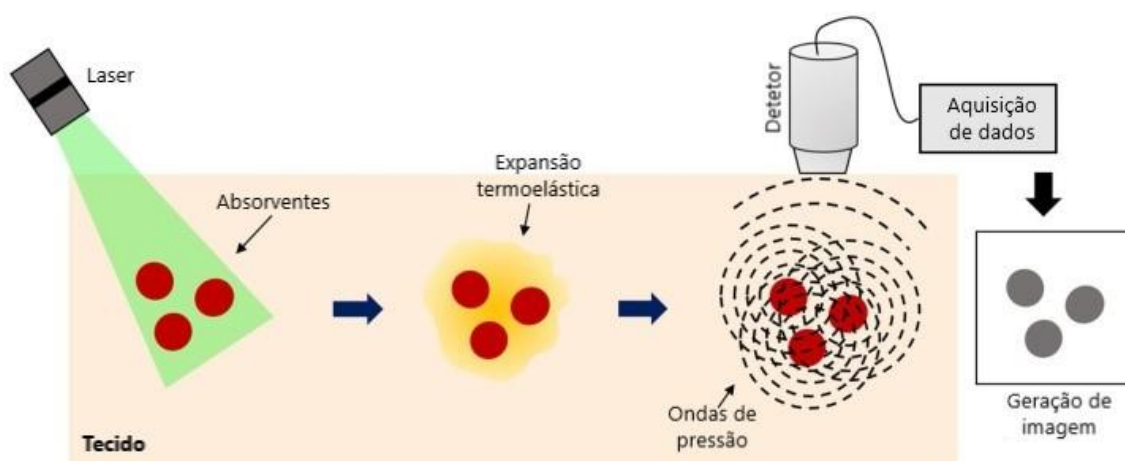


Figura 6.10. Princípio geral da imagem fotoacústica. Os cromóforos alvo absorvem a energia ótica, que resulta num aumento de temperatura localizado. Isto induz um aumento de pressão localizado que se propaga para fora e em direção a um transdutor ultrassónico. O sinal capturado é reconstruído de forma a mapear a deposição de energia ótica original dentro do tecido (adaptado de ⁸³).

A PAI baseia-se principalmente na absorção ótica intrínseca dos cromóforos nos tecidos humanos, sendo estes a hemoglobina, a melanina e os lípidos. Como cada um destes cromóforos exhibe os seus próprios espectros de absorção, o uso da PAI com múltiplos comprimentos de onda permite a quantificação relativa destes e permite a investigação de alterações fisiológicas em tecidos. Este método pode utilizar a melanina para obter imagens de melanomas e outras lesões pigmentadas. Se o contraste endógeno não for suficiente, devido a espectros de absorção dos cromóforos muito semelhantes, podem ser utilizados agentes de contraste exógenos de forma a melhorar o contraste e consequentemente as imagens obtidas ⁸⁴.

As AuNPs possuem propriedades que as têm tornado em opções viáveis para utilização como agente de contraste na PAI. Propriedades como a sua biocompatibilidade, a facilidade de ajuste das suas propriedades óticas, e a possibilidade de serem conjugadas com outros compostos. As AuNPs têm sido utilizadas para aumentar o contraste em técnicas de imagem ótica ⁸⁵. As AuNPs possuem uma forte absorção na região NIR do

espectro eletromagnético e, quando expostas a esta radiação, absorvem os fótons e convertem as suas energias em calor provocando uma expansão térmica que induz um aumento de pressão que resulta na criação de ondas fotoacústicas. Estas ondas fotoacústicas são captadas por detetores específicos que geram sinais fotoacústicos que são posteriormente processados e reconstruídos de forma a obter uma imagem ⁸⁶.

Para além do uso das AuNPs como agente de contraste em PAI, estas também podem apresentar outras funcionalidades. As AuNPs podem ser funcionalizadas com ligandos específicos que permitam o seu direccionamento para determinados tecidos tumorais o que permite uma visualização mais precisa das zonas tumorais ⁸⁷.

Jokerst *et. al.* prepararam AuNPs para obtenção de imagens de modelos de xenoenxertos de tumor subcutâneo do ovário *in vivo*. Observou-se que o agente de imagem molecular baseado em partículas de ouro permitiu a visualização por PAI do tumor. Para além disso, verificou-se que o agente utilizado é não tóxico para as células *ex vivo* ⁸⁶.

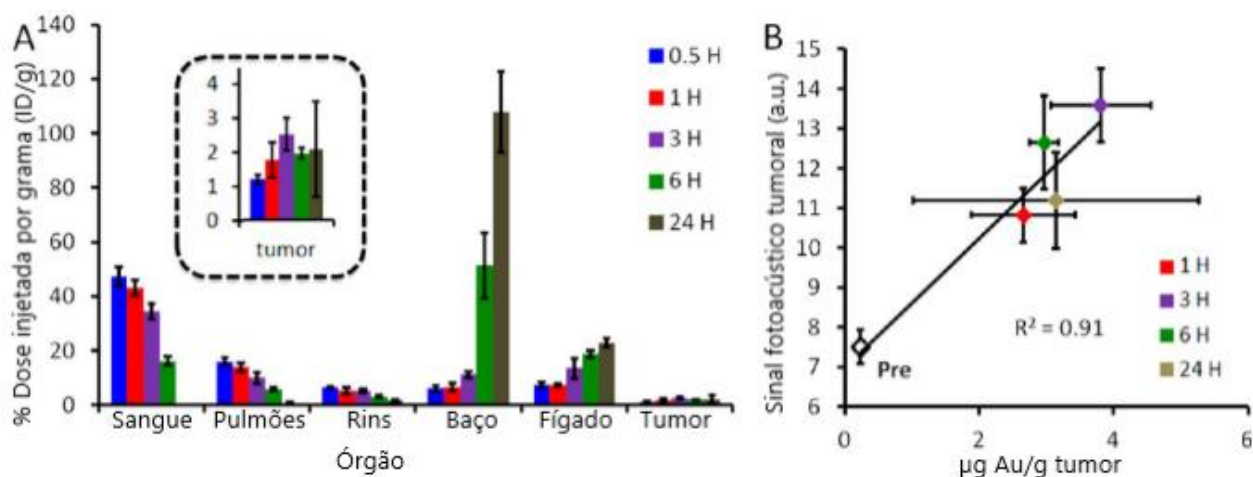


Figura 6.11. (A) Os dados de biodistribuição ao longo do tempo indicam um abastecimento de sangue superior a 10%ID/g por seis horas após a injeção intravenosa. Os principais locais de acumulação são o baço e o fígado, de acordo com internalização pelo sistema reticuloendotelial. (B) Verifica-se uma relação linear positiva entre a concentração de ouro no tumor e o sinal fotoacústico. Tanto o sinal fotoacústico como a concentração de ouro atingirem o pico a três horas após a injeção (adaptado de ⁸⁶).

6.2. AuNPs como meio de tratamento

Os métodos atuais utilizados para o tratamento do cancro incluem a cirurgia, a quimioterapia, e a radioterapia. Estes métodos sejam considerados eficazes e utilizados desde há várias décadas, estes também apresentam diversas limitações e efeitos adversos graves ⁸⁸.

O desenvolvimento da nanotecnologia permitiu um avanço significativo das aplicações biomédicas das AuNPs, sendo que estas têm sido o foco de especial atenção. As AuNPs são dos materiais mais estudados na área da nanotecnologia para aplicações biomédicas, uma vez que possuem propriedades específicas que as tornam valiosas na administração de fármacos, em imagiologia, e no tratamento do cancro, sendo que são considerados dos materiais com maior potencial para melhorar diversas estratégias terapêuticas no tratamento do cancro ⁸⁹.

6.2.1. AuNPs para transporte de fármacos

A quimioterapia é um método muito frequente para o tratamento do cancro que resulta em diversos efeitos secundários prejudiciais, como anemia, perda de peso, queda de cabelo e problemas nos sistemas renal e digestivo. Estes efeitos secundários têm um grande impacto na saúde dos doentes e pode levar a falhas na terapêutica e a alteração desta. Os sistemas de entrega de fármacos (DDS) são opções viáveis na terapia anticancerígena. Estes permitem a distribuição dos fármacos para zonas ou células específicas, o que permite a redução da dosagem terapêutica, o aumentando da concentração do fármaco no tecido alvo, minimizando os danos nos tecidos saudáveis. As AuNP são muito utilizadas como DDS devido à sua baixa toxicidade e boa biocompatibilidade e, para além disso, as características químicas superficiais destas permitem que estas sejam associadas a diversas moléculas de forma a atingir ativamente as células alvo ¹¹.

A acumulação nas zonas tumorais dos fármacos transportados pelas AuNPs pode ocorrer através de um direcionamento passivo, devido ao efeito EPR, direcionamento ativo, pela conjugação das NPs com compostos que permitam o direcionamento, ou mesmo uma combinação destes dois métodos. Estas abordagens permitem que as NPs libertem os fármacos apenas em determinadas circunstâncias como diminuição do pH, sobreexpressão de certos componentes celulares, ou em células numa determinada fase ²². Isto permite que uma menor concentração de fármaco se encontre em tecidos saudáveis diminuindo assim os efeitos adversos destes fármacos.

O direcionamento passivo é uma abordagem simples, baseada principalmente no tamanho das AuNPs, que permite a entrega de fármacos à zona tumoral. Neste método, as NPs acumulam-se nas zonas tumorais através do efeito EPR ¹¹. Este tipo de

direcionamento utiliza as características fisiopatológicas do tecido tumoral, sendo que este tem um sistema vascular subdesenvolvido e altamente permeável permitindo assim que as AuNPs se acumulem facilmente nestas zonas. No entanto, este método pode não ser suficiente para a terapia anticancerígena. A técnica do direcionamento ativo pode ser utilizada juntamente com a de direcionamento passivo. Com esta abordagem, as AuNPs podem ser conjugadas com compostos que permitam obter uma maior retenção e acumulação nas zonas tumorais ⁹⁰.

As AuNPs podem, então, ser conjugadas com diversos fármacos com atividade antitumoral como paclitaxel (PTX), doxorrubicina (DOX), metotrexato (MTX), complexos de platina, gemcitabina, 5-fluorocilo (5-FU), entre outros. Estes são fármacos muito utilizados no tratamento de diversos tipos de cancro cujo uso apresenta diversas limitações e potenciais efeitos adversos graves que podem estar por trás de falhas nas terapêuticas anticancerígenas.

O metotrexato (MTX) é um fármaco anticancerígeno, análogo do ácido fólico, muito utilizado no tratamento de vários cânceros como, cancro do pulmão, da mama, e da próstata. O uso do MTX apresenta algumas limitações como baixo tempo de semivida, baixa solubilidade, e baixa difusão pelo organismo e, para além disso, a utilização do MTX pode resultar no aparecimento de MDRs, sendo verificada uma menor internalização do fármaco por parte das células o que pode originar falhas terapêuticas ⁹¹. A conjugação deste com as AuNPs permite uma mais fácil entrada na célula e como consequência disso permite superar as MDRs obtidas. A utilização de AuNPs coloidais acopladas ao MTX demonstrou um maior efeito anticancerígeno em várias linhagens de células tumorais em comparação com o MTX livre ¹¹. Isto deve-se a um maior acúmulo e a uma maior concentração de MTX nas células tumorais devido à sua conjugação com as AuNPs.

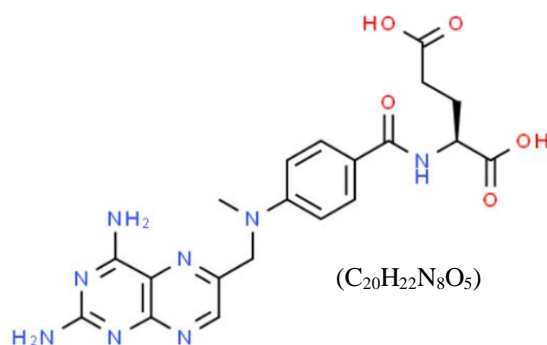


Figura 6.12. Estrutura e fórmula química do metotrexato (MTX) (adaptado de ⁹²).

Rizk *et. al.* investigaram a eficácia terapêutica de MTX com AuNPs funcionalizadas com ácido fólico e anticorpos contra o fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) como agentes específicos para fazer o direcionamento para o cancro da mama e para inibir o aparecimento de metástases. Neste caso, em comparação com o fármaco livre, demonstrou-se uma menor citotoxicidade contra as células normais do organismos e uma maior absorção celular por parte das células cancerígenas que sobressintem recetores folato, e também uma redução dos níveis de TGF- $\beta 1$ extracelular ⁹³.

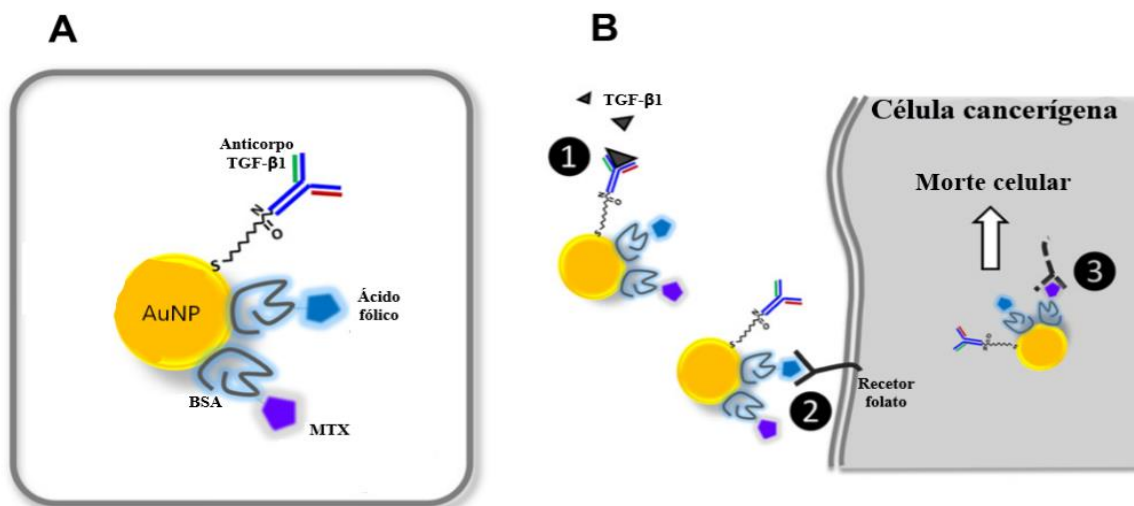


Figura 6.13. Desenho de AuNPs multifuncionais (A) e otimização de AuNPs conjugadas de forma o efeito anticancerígeno. O anticorpo TGF- $\beta 1$, o metotrexato, e o ácido fólico foram conjugados com as AuNPs (adaptado de ⁹³).

O paclitaxel (PTX) é um fármaco de primeira linha na quimioterapia de tumores sólidos. Este é um agente antimicrotubular que inibe a reorganização da rede de microtúbulos essencial para as funções vitais celulares. O seu uso apresenta limitações como baixa solubilidade, elevada toxicidade, e pode originar resistências durante a quimioterapia ⁹⁴. O PTX pode ser associado a AuNPs de forma a reduzir os efeitos adversos graves que a terapêutica com este pode produzir mas também aumentar a eficácia do tratamento anticancerígeno com PTX ⁹⁵. A associação do PTX com as AuNPs permite que haja, então, uma diminuição da toxicidade contra as células saudáveis do organismo e, assim, um menor aparecimento de efeitos adversos e também um aumento da captação pelas células tumorais e da atividade anticancerígena do PTX, em comparação com o fármaco livre.

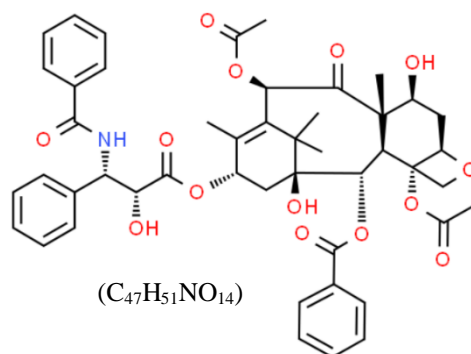


Figura 6.14. Estrutura e fórmula química do paclitaxel (PTX) (adaptado de ⁹⁶).

Ren *et. al.* investigaram o uso de AuNPs modificadas com PEG e ácido fólico como DDS para o transporte de PTX para as células tumorais das linhagens HCT-116, HeLa, e SMMC-7721. Observou-se que o PTX associado às AuNPs, com direcionamento específico para células tumorais que sobrexpressam o recetor folato, apresentava uma alta atividade contra estas linhagens celulares, era mais eficaz na indução da morte celular, e provoca um aumento de ROS intracelular comparativamente ao PTX por si só ⁹⁷.

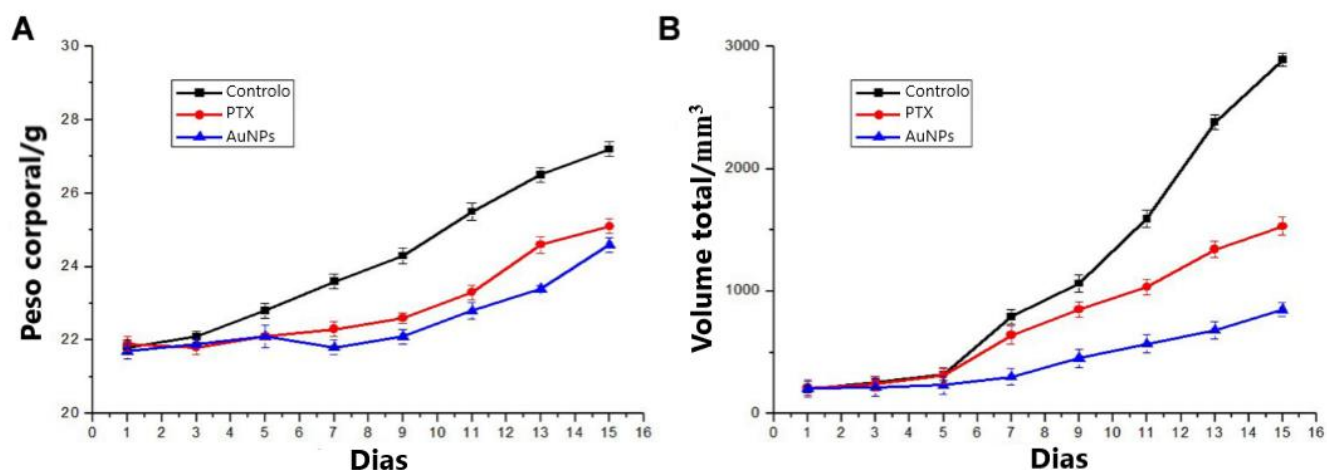


Figura 6.15. Eficácia antitumoral do PTX livre (5 mg/kg) e do PTX associado às AuNPs (5 mg/kg), investigada ao longo de sete administrações intravenosas. (A) Alterações do peso corporal durante o tratamento; (B) Alterações do volume dos tumores (adaptado de ⁹⁷).

A doxorubicina (DOX) é um fármaco citotóxico da família das antraciclina com efeito antineoplásico através de mecanismos de intercalação no DNA, por inibição da enzima topoisomerase II, e pela formação de espécies reativas de oxigénio (ROS). Estes mecanismos têm grandes impactos na síntese de DNA e promovem a apoptose das células cancerígenas ⁹⁸. A DOX é, então, um forte agente anticancerígeno embora apresente efeitos adversos graves dependentes da dose, como cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, e em vários outros órgãos devido a um transporte reduzido para a zona tumoral, e esteja suscetível ao aparecimento de resistências ⁹⁹. A conjugação das AuNPs com DOX pode ser benéfica uma vez que permite a redução da dose de DOX, mas mantendo a sua eficácia

terapêutica, devido a um maior direcionamento às células tumorais levando a uma redução dos efeitos adversos ¹⁰⁰.

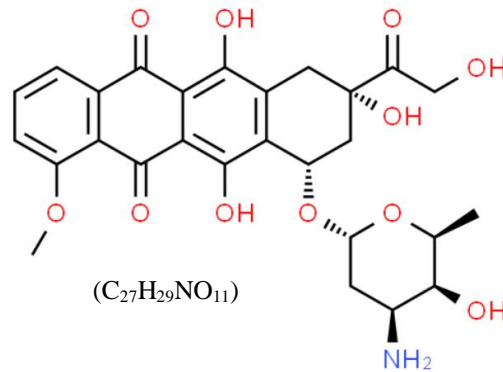


Figura 6.16. Estrutura e fórmula química da doxorubicina (DOX) (adaptado de ¹⁰¹).

Hung *et. al.* investigaram a capacidade de inibição tumoral do complexo de AuNP funcionalizada com PEG e grupo funcional pireno e conjugada com a DOX nas linhagens celulares DLD-1 e HCT-116 do cancro do colon, realizada em modelos animais. Foram utilizadas duas concentrações de pireno, 0,8 mg/ml e 1,5 mg/ml denominadas PPPyA e PPPyB, respetivamente. Este estudo demonstrou que estes complexos apresentaram uma inibição significativa das células tumorais estudadas bem como nos modelos *in vivo*. Esta inibição conseguiu-se com doses de DOX inferiores em relação ao que seria necessário de DOX livre para se obter o mesmo efeito, levando assim também a uma redução do aparecimento de efeitos adversos ¹⁰².

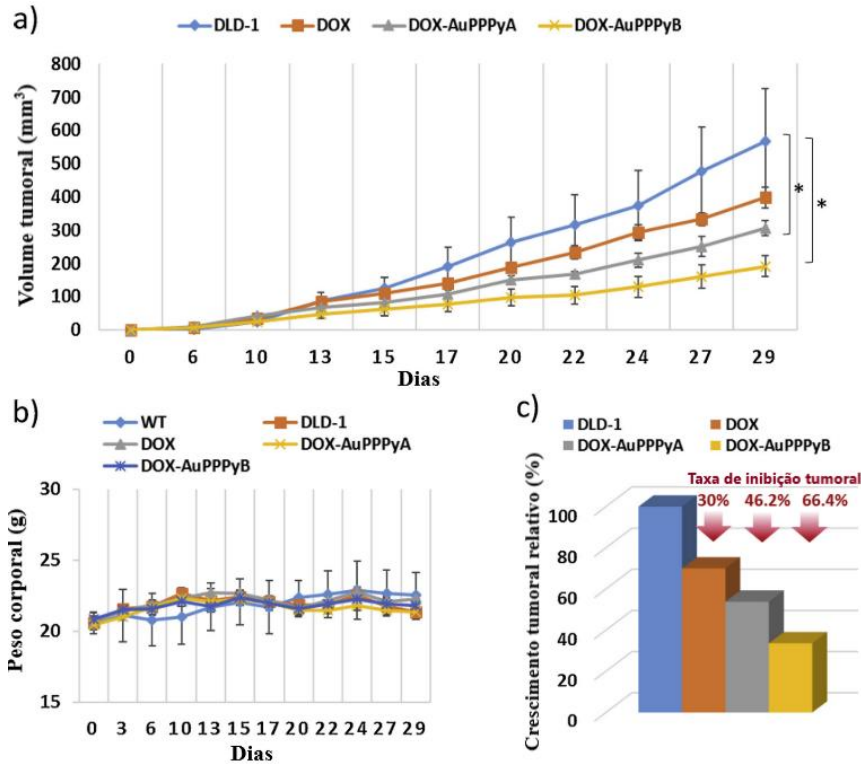


Figura 6.17. Capacidade de inibição tumoral dos compostos em ratos. (a) Crescimento tumoral em cada grupo medido ao longo do ensaio; (b) Peso corporal dos ratos de cada grupo que foi medido ao longo do ensaio; (c) O crescimento tumoral e a taxa de inibição tumoral foram por fim analisadas (adaptado de ¹⁰²).

O 5-fluorocilo (5-FU) é um dos fármacos mais utilizados para o tratamento de vários câncros. Este é um análogo do uracilo e atua como antimetabolito interferindo com a síntese de DNA levando, assim, à morte celular. Para além desta sua ação nas células tumorais, este fármaco também afeta as células saudáveis do organismo o que pode levar a potenciais efeitos adversos como mucosites orais graves, síndrome de mão-pé, mielosupressão, entre outros. Estes efeitos, juntamente com a sua janela terapêutica estreita e potenciais MDRs que podem aparecer, levam à necessidade de melhorar a terapêutica com 5-FU. A associação deste com AuNPs pode permitir o uso do 5-FU mas evitando estas desvantagens da sua utilização. A conjugação com as AuNPs pode, então, melhorar a sua biodisponibilidade e, para além disso, pode ainda permitir uma entrega do fármaco mais direcionada para as zonas tumorais o que leva a uma diminuição dos efeitos adversos da terapêutica ¹⁰³.

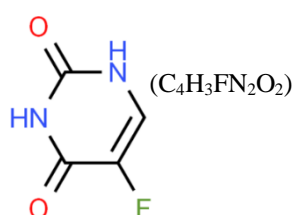


Figura 6.18. Estrutura e fórmula química da 5-fluorocilo (5-FU) (adaptado de ¹⁰⁴).

Liszbinski *et al.* investigaram o uso de AuNPs carregadas com 5-FU e anticorpos anti EGFR como forma de ultrapassar as resistências apresentadas pelas células do cancro colorretal. O uso destes anticorpos permite o direcionamento do complexo para as células cancerígenas que sobreexpressam o EGFR o que permitiu uma entrega do fármaco diretamente nas células. Isto levou a um aumento da apoptose das células cancerígenas e a uma menor proliferação destas células, em comparação com o uso do fármaco livre ¹⁰⁵.

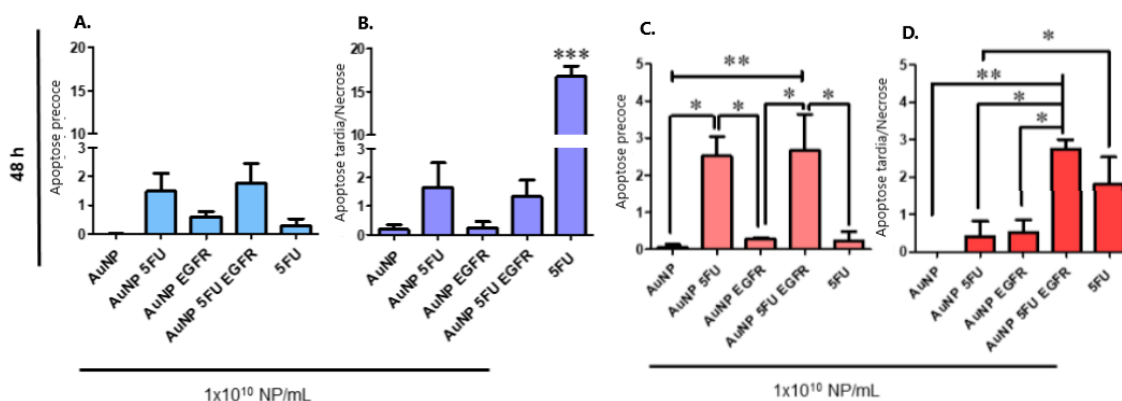


Figura 6.19. Citotoxicidade das AuNPs, do 5-FU, e dos compostos a uma concentração de 1×10^{10} NP/ml nas linhagens de células tumorais HCT-116 (esquerda) e HT-29 (direita) ao fim de 48 horas (adaptado de ¹⁰⁵).

As AuNPs apresentam uma grande versatilidade nas suas aplicações como DDS, como se pode comprovar pela variedade de fármacos e compostos que pode transportar. As suas capacidades de direcionamento aos tumores possibilita o combate não só aos vários tumores sólidos localizados mas também pode ajudar no tratamento e prevenção de tumores metastáticos em modelos animais. As AuNPs demonstram, então, um grande potencial de aplicação na prática clínica no tratamento do cancro ¹⁰⁶.

O uso das AuNPs como DDS tem atraído uma atenção significativa devido às suas diversas propriedades e, conseqüentemente, às vantagens que estas oferecem na sua utilização, desde a melhoria do direcionamento do fármaco a redução dos efeitos adversos. Embora as AuNPs ofereçam estas diversas vantagens, a sua passagem para a prática clínica ainda está dependente da realização de ensaios clínicos para fazer a revisão da sua segurança.

6.2.2. Radioterapia

A radioterapia é um dos métodos mais comuns utilizados no tratamento de cancro. Este método utiliza radiação de alta energia de forma a matar as células tumorais ¹⁰⁷. A radioterapia provoca danos no DNA através da ação direta ou indireta de raios-gama ou raios-x internos ou externos. A utilização de partículas alfa e beta é também possível neste tipo de tratamento.

A radioterapia apresenta diversas limitações principalmente devido aos efeitos secundários tóxicos associados com esta terapêutica como, heterogeneidade da dose e resposta, e a exposição a longo prazo dos tecidos saudáveis. Com o aparecimento de células tumorais resistentes a radiação podem ser necessárias doses superiores o que pode causar ainda mais danos e morte das células e tecidos saudáveis ¹⁰⁸.

Têm sido feitas diferentes propostas para balancear os resultados da terapêutica e os efeitos adversos associados à radioterapia através de processos como reversão das resistências à radiação por parte dos tumores, aumento da tolerância à radiação dos tecidos saudáveis, aumento da radiosensibilização dos tumores, e limitação da deposição da dose de radiação nos tecidos tumorais ¹⁰⁸.

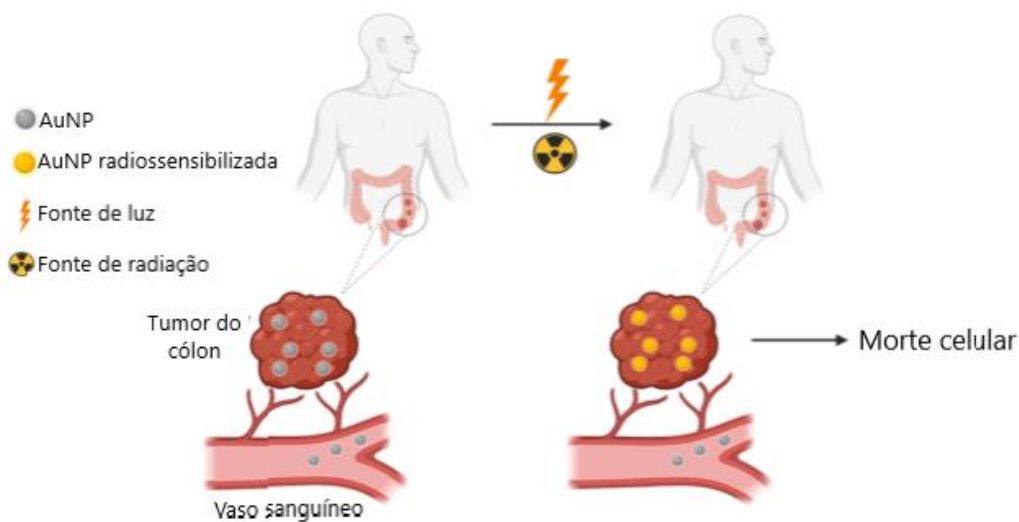


Figura 6.20. Radioterapia: Administração de nanopartículas de ouro na zona tumoral seguida da aplicação de uma fonte de radiação que resulta na sensibilização das nanopartículas de ouro e numa morte das células tumorais superior ¹⁰⁹.

Assim, os radiosensibilizadores, compostos químicos ou biológicos que aumentam a dose eficaz da radioterapia nas células cancerígenas, podem ser ferramentas eficazes na radioterapia do cancro. Em particular, nanomateriais com número atómico (Z) elevado, como o bismuto ($Z=83$), o ouro ($Z=79$), o tungsténio ($Z=74$), a prata ($Z=47$), entre outros, são comumente usados como potenciadores de dose na radioterapia ^{107,108}.

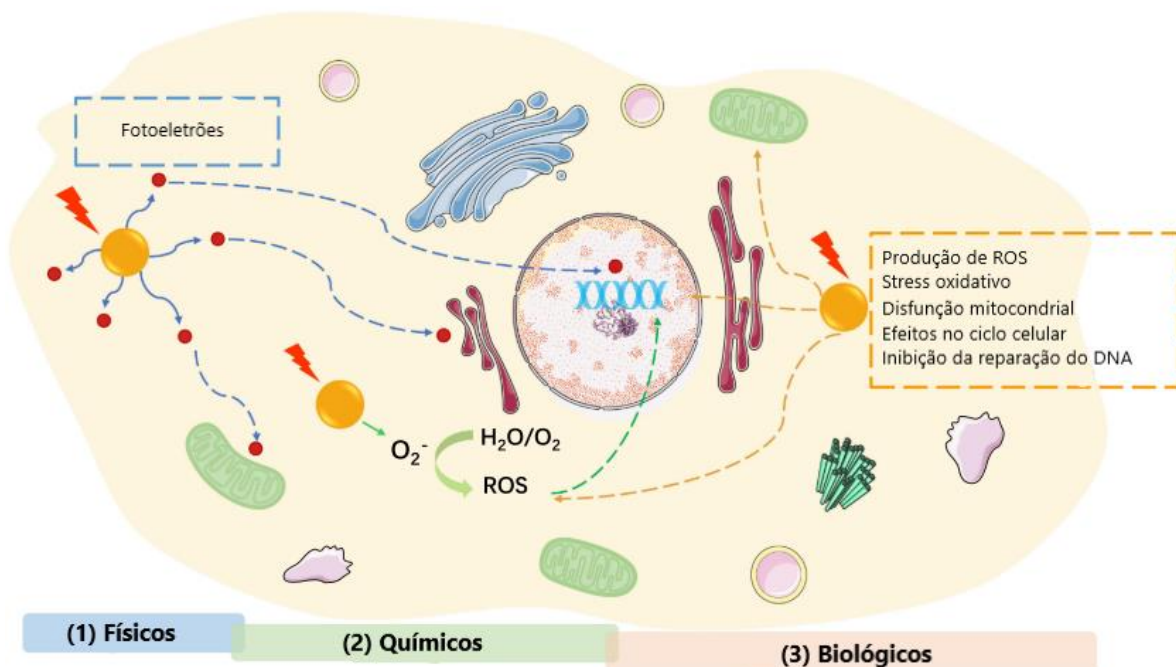


Figura 6.21. Potenciais mecanismos da radiosensibilização pelas nanopartículas de ouro. Podem ser resumidos em três partes: (1) Aumento da dose física, devido ao efeito fotoelétrico do ouro; (2) Contribuições químicas com base na sensibilização química do DNA aos danos induzidos pela radiação, bem como do aumento da geração e catálise de radicais; (3) A fase biológicas em diversos mecanismos como produção de espécies reativas de oxigénio, stress oxidativo, disfunção mitocondrial, efeitos no ciclo celular, e inibição da reparação do DNA ¹⁰⁸.

As AuNPs têm potencial uso como radiosensibilizadores em radioterapia. Este seu potencial deve-se à capacidade das AuNPs de quebrar as ligações de DNA quando expostas de raios- γ ou raios-X ¹⁰⁷. A interação dos fótons com as AuNPs leva à produção de elétrons secundários sendo que estes provocam a ionização do DNA. Os elétrons secundários podem também reagir com a água presente nos tecidos, produzindo radicais livres que se ligam ao DNA levando a oxidação e a danos neste. A produção dos radicais livres, do stress oxidativo, a indução dos danos no DNA, e os efeitos no ciclo celular são os principais mecanismos envolvidos na resposta biológica à radiosensibilização das AuNPs ¹⁰⁹.

Como radiosensibilizadores tumorais, as AuNPs, em particular, têm sido alvo de estudos devido às vantagens que oferecem, comparativamente com outros nanomateriais ¹⁰⁸. De forma a maximizar o efeito terapêutico das AuNPs é necessário determinar as características, principalmente tamanho e forma das partículas, que melhor se enquadram no alvo pretendido.

A hipoxia tumoral é um fenómeno muito observado em tumores sólidos que dificulta a terapêutica do cancro pelos diversos métodos, incluindo pela radioterapia. A hipoxia, é uma condição em que o corpo ou uma região do corpo está privada de oxigénio. Kim *et. al.* investigaram a utilização de AuNPs juntamente com radioterapia para a eliminação eficaz da radiorresistência de tumores hipóxicos. Os resultados do estudo demonstraram uma menor viabilidade celular e apoptose das células tumorais devido ao efeito sinérgico das AuNPs e da radioterapia na produção de ROS ¹¹⁰.

Mirrahimi *et. al.* investigaram a eficácia antitumoral *in vivo* do nanocomplexo ACA, com AuNP e cisplatina, nas células tumorais CT26 do adenocarcinoma do colon na presença de radiação raios-X. A interação sinérgica entre as AuNPs, a cisplatina, e os raios-X amplificou a eficácia da quimioterapia e radioterapia. Os resultados sugerem que este nanocomplexo pode ser uma plataforma promissora quimioradioterapia com potencial para reduzir as doses dos fármacos citotóxicos e dos raios-X, o que permite minimizar os efeitos adversos associados a altas doses de fármaco e radiação ¹¹¹.

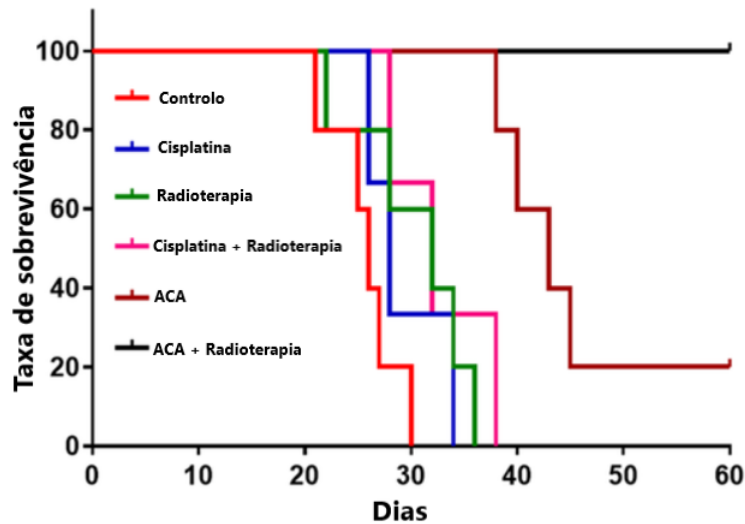


Figura 6.22. Taxa de sobrevivência de murganhos portadores de tumores CT26 em função do tempo, ao longo de 60 dias pós-tratamento (adaptado de ¹¹¹).

Embora as AuNPs sejam muito promissoras como radiosensibilizadores em radioterapia, ainda não está totalmente esclarecido quais as condições ideais para a sua utilização segura e eficaz. A terapêutica com AuNPs em radioterapia pode ser ainda mais otimizada de forma a reduzir os efeitos adversos, aumentar a sobrevivência do tecido saudável, melhorar a sua biodistribuição de forma melhorar os resultados no tratamento do cancro ^{112,113}.

6.2.3. Terapia fototérmica

A PTT refere-se ao método terapêutico que utiliza materiais que absorvem energia eletromagnética e convertem-na em energia térmica, induzindo assim a apoptose ou necrose de células cancerígenas. A radiação NIR (800 – 2500 nm) é mais frequentemente utilizada na PTT devido à sua maior transparência tecidual e, assim, materiais com uma elevada conversão da radiação desta gama de comprimentos de onda em calor, denominados agentes fototérmicos (PTA), podem ser utilizados de forma a otimizar a eficácia do tratamento fototérmico do cancro ¹¹⁴.

Os PTAs incluem materiais orgânicos, como polímeros conjugados, corantes NIR encapsulados em lipossomas ou micelas, entre outros, e inorgânicos, que inclui diversas NPs, incluindo as AuNPs. Os PTAs inorgânicos incluem diversas NPs, incluindo as AuNPs. Estes PTAs possuem uma elevada absorção de radiação na gama NIR e alta eficiência na conversão fototérmica, apresentando assim uma eliminação significativa de células cancerígenas ¹¹⁴.

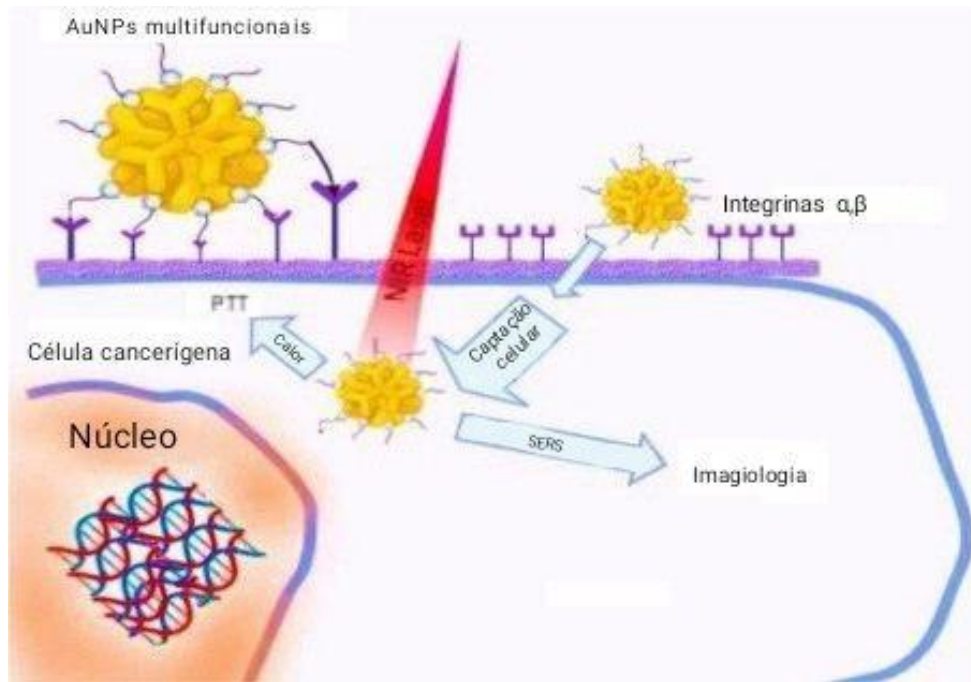


Figura 6.23. Terapia fototérmica para o tratamento de cancro (adaptado de ¹¹⁵).

A hipertermia está na base do método da PTT. Temperaturas acima de 42°C podem induzir a morte celular em alguns tecidos, sendo que entre os 41°C e os 47°C as células podem começar a demonstrar sinais de apoptose e a partir dos 50°C estas começam a apresentar sinais de necrose. Neste processo, as AuNPs podem ser administradas sistemicamente e são direcionadas para os tumores, de forma passiva ou ativa. São expostas a uma fonte de excitação, como laser NIR ou ondas de rádio. As AuNPs absorvem a energia incidente e convertem-na em calor, aumentando a temperatura do tecido circundante danificando as células ^{116,117}.

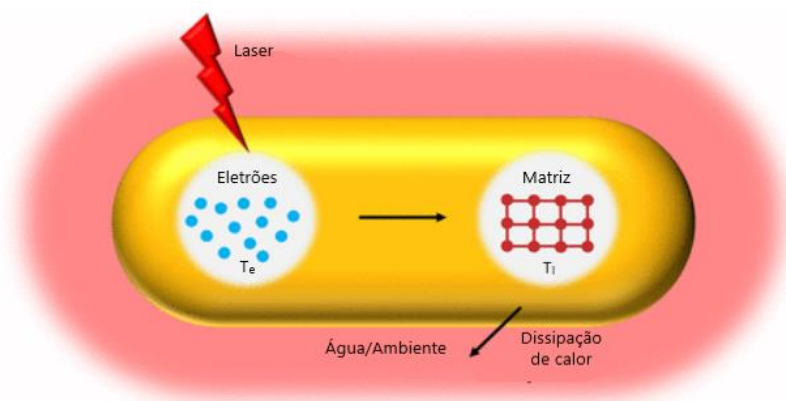


Figura 6.24. Processos fotofísicos de uma nanopartícula de ouro excitada por um laser no processo de hipertermia na terapia fototérmica (adaptado de ¹¹⁸).

O processo de hipertermia das AuNPs começa pela absorção de um pulso de radiação NIR que excita os eletrões livres, criando assim um pulso de eletrões excitados que provocam o aumento da temperatura. Este pulso arrefece rapidamente devido a

interações elétron-fonão ao colidir com a matriz do ouro, aquecendo-a. Por fim, o calor é transferido das AuNPs para o ambiente que as rodeia através de interações fonão-fonão, retornando as AuNPs à sua temperatura inicial. Quando é utilizada uma fonte de laser de onda contínua, o calor produzido é continuamente dissipado para o ambiente ¹¹⁸.

As AuNPs de vários tamanhos e formas podem ser aplicadas na terapêutica do cancro por PTT. As AuNPs, na PTT, atuam num intervalo terapêutico de comprimentos de onda entre os 800-1200 nm uma vez que os tecidos corporais são moderadamente transparentes à luz NIR e estes comprimentos de onda podem penetrar profundamente o tecido saudável de forma segura. Uma vantagem da utilização das NPs é a sua elevada área superficial, devido aos seus tamanhos reduzidos, sendo que as NPs de tamanho mais reduzido são preferidas. A elevada área superficial das AuNPs permite uma maior absorção de radiação e conseqüentemente, permite uma transformação da energia em calor mais eficaz ^{115,119}.

As AuNPs que absorvem no infravermelho próximo têm-se mostrado como agentes muito promissores para a PTT do cancro, demonstrando uma grande capacidade de danificar tecido cancerígeno tanto *in vitro* como *in vivo*. A otimização desta terapêutica com PTT e AuNPs passa pela melhoria do método, de forma a alcançar mesmo os tecidos tumorais de mais difícil acesso, pela melhoria dos métodos de transporte das NPs para o local indicado de forma a permitir uma maior acumulação e conseqüentemente um melhor efeito terapêutico, e pela compreensão das conseqüências do acúmulo das AuNPs a longo prazo e da utilização desta terapêutica a longo prazo ¹¹⁶.

A geração de calor, induzida pela PTT, leva à morte celular, tanto das células tumorais como das células saudáveis, levando a conseqüências indesejadas, como danos no tecido normal próximo do tumor. Outros efeitos adversos como resposta inflamatória e produção de ROS induzidos por stress térmico também podem surgir durante a PTT ¹²⁰. Outro fenómeno que pode limitar o uso da PTT é a termotolerância, definida como a capacidade de manter a homeostase a determinada temperatura, numa duração ou frequência estável. As proteínas de choque térmico (HSP) podem permitir que algumas células permaneçam viáveis após tratamentos por hipertermia ¹¹⁷.

De forma a reduzir os efeitos adversos e a aumentar a indução da apoptose e necrose das células tumorais, e conseqüentemente os resultados da terapêutica, pode-se variar algumas das propriedades do método como a potência da radiação incidente, do

período de exposição, e o tipo de PTA e a sua concentração. As AuNPs são, então, agentes fototérmicos ideais devido às suas propriedades ajustáveis, principalmente a sua forma e tamanho. As dimensões das AuNPs têm um impacto significativo na eficácia fototérmica, isto porque o aumento do volume das partículas, por exemplo, provoca uma diminuição da eficiência da conversão da energia em calor. Para além das vantagens oferecidas pelo controlo do tamanho das AuNPs, e uma vez que estas oferecem facilidade na sua modificação, estas também podem ser conjugadas com agentes de direcionamento para as zonas tumorais. Isto permite que as AuNPs se acumulem mais facilmente no seu alvo permitindo, assim, uma terapêutica mais localizada e um diminuição dos possíveis efeitos adversos da terapêutica fototérmica ^{121,122}.

Xia *et. al.* investigaram a combinação de quimioterapia com PTT, através da administração conjunta de DOX e AuNPs sensíveis à luz que foi então irradiada por um laser de 405 nm de comprimento de onda. Após irradiação as AuNPs formam agregados no tecido tumoral que resulta numa retenção prolongada de forma a facilitar a captação de DOX no tecido tumoral. As AuNPs também provocam um aumento de temperatura, suprimindo assim o tumor e facilitando a ação da DOX no tumor ¹²³.

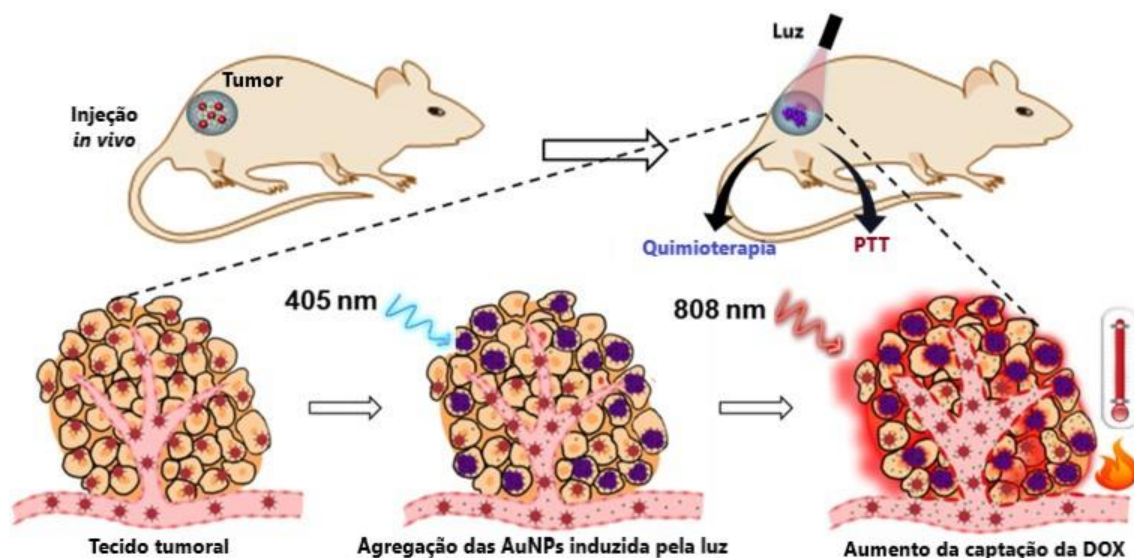


Figura 6.25. Agregação das nanopartículas de ouro induzida por luz para uma terapêutica sinérgica baseada em terapia fototérmica e em quimioterapia, pelo uso de doxorrubicina (adaptado de ¹²³).

6.2.4. Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma técnica que se mostra como uma alternativa promissora, em comparação com monoterapia convencionas como quimioterapia e radioterapia, contra diversos tipos de cancro devido à sua seletividade, baixa toxicidade

sistêmica, e por ser um método pouco invasivo. Neste método, é administrado um fotossensibilizador (PS) e posteriormente a zona tumoral é irradiada por uma fonte de luz. Sob esta radiação, e na presença de oxigênio, os PS geram espécies de oxigênio reativas (ROS) ¹²⁴. Estas ROS promovem a destruição das células tumorais, uma vez que são citotóxicas.

Os efeitos antitumorais da PDT, e conseqüentemente os resultados terapêuticos, são altamente dependentes dos mecanismos celulares e moleculares desencadeados pelos danos oxidativos induzidos. Estes incluem danos irreversíveis às células cancerígenas, levando a processos de apoptose e necrose celular, a destruição da microvasculatura tumoral, e a ativação do sistema imunitário para se obter uma resposta anticancerígena a longo prazo ¹²⁴.

A PDT também apresenta algumas limitações como a hipoxia tumoral e a ativação oncogênica após as sessões de tratamento. Esta é das principais limitações deste método uma vez que é uma característica de muitos dos tumores e a PDT necessita de oxigênio para realizar a sua ação ¹²⁴. A utilização de fotossensibilizadores associados às AuNPs pode permitir não só uma maior acumulação na zona tumoral mas também um aumento da produção de ROS, necessárias para a realização da PDT ¹²⁵. O efeito SPR das AuNPs na região NIR aumenta a produção de oxigênio singlete e de ROS, potenciando o tratamento do cancro por PDT.



Figura 6.26. Diferentes métodos para o desenho de fotossensibilizadores contra a hipoxia (adaptado de ¹²⁶).

Os fotossensibilizadores têm influência na eficácia da PDT com base nos seus transportes sistêmicos e nas suas localizações celulares e podem influenciar também a profundidade terapêutica alcançável pela PDT devido aos seus comprimentos de onda de ativação ¹²⁶. O comprimento de onda selecionado para PDT normalmente coincide com a banda de absorção de comprimento de onda mais longo do PS, ocorrendo idealmente entre 650 e 850 nm. Esta faixa de comprimento de onda corresponde a uma maior penetração no tecido, bem como à luz com energia suficiente para gerar estados excitados capazes de reagir com o oxigênio molecular ¹²⁷.

Após a irradiação, um PS excitado pode sofrer reações do tipo I e/ou do tipo II, levando à produção de ROS. Na PDT tipo I, a energia de um PS num estado de tripleto excitado é transferida para as biomoléculas que rodeiam os tumores de forma a criar radicais que então interagem com o oxigênio molecular criando, então, ROS como aniões superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e radicais hidroxilo ($\cdot OH$). Já nas reações da PDT tipo II, a energia de um PS num estado tripleto excitado é diretamente transferida para um oxigênio tripleto (3O_2) de forma a produzir um oxigênio singleto (1O_2). Tanto as ROS como o oxigênio singleto podem induzir a morte das células tumorais através de processos de apoptose e necrose. As ROS, no entanto, têm uma vida muito curta, sendo que reagem apenas com as biomoléculas próximas do local onde estas são produzidas ^{126,127}.

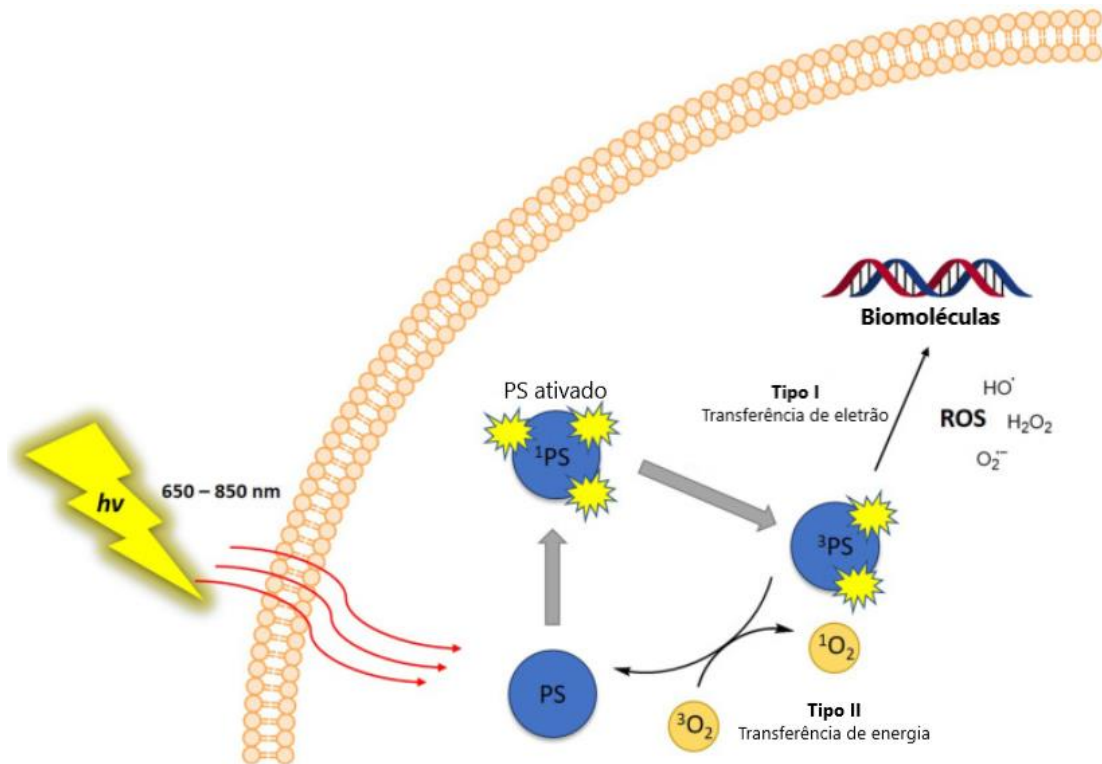


Figura 6.27. Mecanismo da terapia fotodinâmica. Na reação tipo I, o $3PS^*$ pode transferir um elétron para biomoléculas vizinhas, ou diretamente para o oxigênio, formando radicais de reagir com o O_2 de forma a produzir $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , ou $\cdot OH$. Na reação tipo II, a energia do fotossensibilizador excitado pode ser diretamente transferida para o oxigênio molecular para formar oxigênio singleto, 1O_2 (adaptado de ¹²⁷).

Os PS podem ser divididos em três gerações, sendo que os mais utilizados atualmente são os de terceira geração. Os PS de terceira geração são baseados em substâncias com maior afinidade para o tecido tumoral, que reduz os danos causados ao restante tecido saudável. Estas substâncias, quando associadas aos PS, permitem aumentar eficazmente a biodisponibilidade dos PS utilizados neste método. As AuNPs, e outros nanomateriais, podem ser utilizadas para este fim uma vez que permitem aumentar a seletividade dos PS e também uma maior acumulação destes na zona tumoral, permitindo então reduções de dose de fármaco mas mantendo efeitos terapêuticos satisfatórios ¹²⁸.

Assim, as AuNPs podem ser utilizadas de modo a superar muitas das desvantagens do uso de PS em PDT. As AuNPs podem ser utilizadas como transportadores, através de processos de encapsulação ou conjugação, de outros agentes de PS, facilitando não só o transporte do PS para a zona tumoral pretendida, permite fazer uma melhor proteção do composto, e também permite uma maior acumulação deste na zona alvo ¹²⁵.

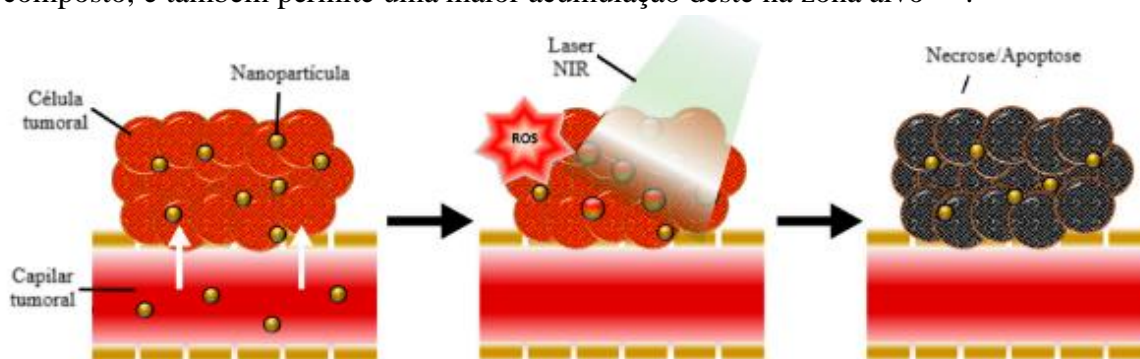


Figura 6.28. Ilustração dos efeitos fisiológicos e biológicos das nanopartículas de ouro na terapia fototérmica e na terapia fotodinâmica. As nanopartículas de ouro acumulam-se devido à vasculatura do tecido tumoral que resulta num efeito fototérmico em resposta à radiação de infravermelho próximo e às espécies reativas de oxigênio produzidas pela presença do fotossensibilizador levando assim à apoptose e necrose dos tecidos tumorais (adaptado de ¹²⁵).

A combinação das AuNPs com os PS, quando incididas com a luz, pode levar a efeitos sinérgicos, podendo sensibilizar as células cancerígenas aos efeitos da PDT potenciando a produção de ROS levando, assim, a um mais eficaz combate às células cancerígenas.

7. Conclusões

Os avanços que se têm verificado nos últimos anos na área da nanotecnologia têm permitido a investigação da utilização das nanopartículas, materiais com dimensões na nanoescala, em diversas áreas, sendo a nanomedicina uma delas. As nanopartículas de ouro têm suscitado particular interesse nesta área.

As nanopartículas de ouro apresentam diversas propriedades que as tornam candidatas atraentes para a investigação e aplicação na nanomedicina. O interesse pelas nanopartículas de ouro deve-se a propriedades como a sua baixa toxicidade, as suas propriedades óticas únicas, o controlo fácil dos tamanhos e das formas destas, feito através dos seus vários métodos de síntese, e a possibilidade de modificar a sua superfície.

As nanopartículas de ouro demonstram ter um potencial benéfico nas suas aplicações quer no diagnóstico quer no tratamento do cancro. A sua capacidade de direcionamento específico para as zonas tumorais permite uma terapêutica mais seletiva. Ao alcançarem o tecido alvo as nanopartículas de ouro realizam a sua função quer seja de transporte de fármacos, potenciação da terapêutica com radiação e/ou por hipertermia. O direcionamento mais específico, em comparação com outros fármacos comumente utilizados na terapêutica anticancerígena, pode permitir uma terapêutica mais eficaz e com menos efeitos adversos.

A utilização das nanopartículas de ouro como meio de diagnóstico do cancro permite superar algumas das limitações que os métodos de diagnóstico habituais apresentam. Estas podem aumentar a sensibilidade e especificidade dos métodos de deteção do cancro devido às suas propriedades óticas e eletrónicas. As nanopartículas de ouro são ferramentas muito versáteis na imagiologia médica podendo ser utilizadas em várias das técnicas de diagnóstico em simultâneo, quer como agentes de diagnóstico quer como meio de transporte de agentes de contraste.

As nanopartículas de ouro são, então, ferramentas com um grande potencial na terapêutica anticancerígena, na de deteção e no diagnóstico de diversos cancros. Devido aos seus potenciais usos e resultados positivos há um grande interesse na investigação das nanopartículas de ouro e espera-se que no futuro as suas aplicações continuem a ser extensivamente investigadas de forma a desenvolver fármacos baseados em nanopartículas de ouro para uso na prática clínica.

Referências

1. *Cancer*. (n.d.). Retrieved February 21, 2023, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. *Risk factors for cancer - NCI*. (n.d.). Retrieved February 21, 2023, from <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk>
3. Wei, G., Wang, Y., Yang, G., Wang, Y., & Ju, R. (2021). Recent Progress in Nanomedicine for Enhanced Cancer Chemotherapy. *Theranostics*, *11*(13), 6370.
4. *What Is Nanotechnology? | National Nanotechnology Initiative*. (n.d.). Retrieved February 28, 2023, from <https://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition>
5. Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2020). The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules*, *25*(1), 112.
6. *Nanotechnologies: 1. What is Nanotechnology?* (n.d.). Retrieved July 20, 2023, from https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/en/nanotechnologies/1-2/1-introduction.htm#0
7. Dessale, M., Mengistu, G., & Mengist, H. M. (2022). Nanotechnology: A promising Approach for Cancer Diagnosis, Therapeutics and Theragnosis. *International Journal of Nanomedicine*, *17*, 3735.
8. *Nanotechnologies: 3. What Are the Physical and Chemical Properties of Nanoparticles?* (n.d.). Retrieved July 20, 2023, from https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/en/nanotechnologies/1-2/3-nanoparticle-properties.htm#0
9. Khursheed, R., Dua, K., Vishwas, S., Gulati, M., Jha, N. K., Aldhafeeri, G. M., Alanazi, F. G., Goh, B. H., Gupta, G., Paudel, K. R., Hansbro, P. M., Chellappan, D. K., & Singh, S. K. (2022). Biomedical Applications of Metallic Nanoparticles in Cancer: Current Status and Future Perspectives. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *150*, 112951.
10. Najahi-Missaoui, W., Arnold, R. D., & Cummings, B. S. (2021). Safe nanoparticles: Are we there yet? *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(1), 1–22.
11. Aminabad, N. S., Farshbaf, M., & Akbarzadeh, A. (2019). Recent Advances of Gold Nanoparticles in Biomedical Applications: State of the Art. In *Cell Biochemistry and Biophysics* (Vol. 77, Issue 2, pp. 123–137). Humana Press Inc.
12. Bloise, N., Strada, S., Dacarro, G., & Visai, L. (2022). Gold Nanoparticles Contact with Cancer Cell: A Brief Update. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 14). MDPI.
13. Yousefi Rizi, H. A., Shin, D. H., & Rizi, S. Y. (2022). Polymeric Nanoparticles in Cancer Chemotherapy: A Narrative Review. *Iranian Journal of Public Health*, *51*(2), 226.
14. Medici, S., Peana, M., Coradduzza, D., & Zoroddu, M. A. (2021). Gold Nanoparticles and Cancer: Detection, Diagnosis and Therapy. *Seminars in Cancer Biology*, *76*, 27–37.
15. Chen, W., Cheng, H., & Xia, W. (2022). Progress in the Surface Functionalization of Selenium Nanoparticles and Their Potential Application in Cancer Therapy. *Antioxidants*, *11*(10).
16. Santhoshkumar, J., Rajeshkumar, S., & Venkat Kumar, S. (2017). Phyto-Assisted Synthesis, Characterization and Applications of Gold Nanoparticles – A Review. *Biochemistry and Biophysics Reports*, *11*, 46–57.
17. Vines, J. B., Yoon, J. H., Ryu, N. E., Lim, D. J., & Park, H. (2019). Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy. In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 7, Issue APR). Frontiers Media S.A.

18. Zhou, X. L., Yang, Y., Wang, S., & Liu, X. W. (2020). Surface Plasmon Resonance Microscopy: From Single-Molecule Sensing to Single-Cell Imaging. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 59(5), 1776.
19. Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2021). Engineering Precision Nanoparticles for Drug Delivery. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 20(2), 101.
20. Szewczyk, O. K., Roszczenko, P., Czarnomysy, R., Bielawska, A., & Bielawski, K. (2022). An Overview of the Importance of Transition-Metal Nanoparticles in Cancer Research. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 12). MDPI.
21. Singh, P., Pandit, S., Mokkapati, V. R. S. S., Garg, A., Ravikumar, V., & Mijakovic, I. (2018). Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7).
22. Wu, J. (2021). The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. *Journal of Personalized Medicine*, 11(8).
23. Fan, J., Cheng, Y., & Sun, M. (2020). Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis, Properties and Biomedical Applications. *The Chemical Record*, 20(12), 1474–1504.
24. Milan, J., Niemczyk, K., & Kus-Liśkiewicz, M. (2022). Treasure on the Earth—Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Materials*, 15(9).
25. Dheyab, M. A., Aziz, A. A., Khaniabadi, P. M., Jameel, M. S., Oladzadabbasabadi, N., Mohammed, S. A., Abdullah, R. S., & Mehrdel, B. (2022). Monodisperse Gold Nanoparticles: A Review on Synthesis and Their Application in Modern Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7400.
26. Sztandera, K., Gorzkiewicz, M., & Klajnert-Maculewicz, B. (2019). Gold Nanoparticles in Cancer Treatment. *Molecular Pharmaceutics*, 16(1), 1–23.
27. Amina, S. J., & Guo, B. (2020). A Review on the Synthesis and Functionalization of Gold Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 9823.
28. Ielo, I., Rando, G., Giacobello, F., Sfameni, S., Castellano, A., Galletta, M., Drommi, D., Rosace, G., & Plutino, M. R. (2021). Synthesis, Chemical–Physical Characterization, and Biomedical Applications of Functional Gold Nanoparticles: A Review. *Molecules*, 26(19).
29. Zhu, Q., Huang, X., Zeng, Y., Sun, K., Zhou, L., Liu, Y., Luo, L., Tian, S., & Sun, X. (2021). *Controllable Synthesis and Electrocatalytic Applications of Atomically Precise Gold Nanoclusters*.
30. Slepíčka, P., Slepíčková Kasálková, N., Siegel, J., nka Kolská, Z., & Švorčík, V. (2019). *materials Methods of Gold and Silver Nanoparticles Preparation*.
31. Isa, S. Z. M., Zainon, R., & Tamal, M. (2022). State of the Art in Gold Nanoparticle Synthesis via Pulsed Laser Ablation in Liquid and Its Characterisation for Molecular Imaging: A Review. *Materials*, 15(3).
32. Xie, L., Zhang, X., Chu, C., Dong, Y., Zhang, T., Li, X., Liu, G., Cai, W., & Han, S. (2021). Preparation, Toxicity Reduction and Radiation Therapy Application of Gold Nanorods. *Journal of Nanobiotechnology*, 19(1), 454.
33. Li, M., Wei, J., Song, Y., & Chen, F. (2022). Gold Nanocrystals: Optical Properties, Fine-Tuning of the Shape, and Biomedical Applications. *RSC Advances*, 12(36), 23057.
34. Jiang, Z., Li, L., Huang, H., He, W., & Ming, W. (2022). Progress in Laser Ablation and Biological Synthesis Processes: “Top-Down” and “Bottom-Up” Approaches for the Green Synthesis of Au/Ag Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23).

35. Miu, B. A., & Dinischiotu, A. (2022). New Green Approaches in Nanoparticles Synthesis: An Overview. *Molecules*, 27(19).
36. Zuhrotun, A., Oktaviani, D. J., & Hasanah, A. N. (2023). Biosynthesis of Gold and Silver Nanoparticles Using Phytochemical Compounds. *Molecules*, 28(7), 3240.
37. Sportelli, M. C., Izzi, M., Volpe, A., Clemente, M., Picca, R. A., Ancona, A., Lugarà, P. M., Palazzo, G., & Cioffi, N. (2018). The Pros and Cons of the Use of Laser Ablation Synthesis for the Production of Silver Nano-Antimicrobials. *Antibiotics*, 7(3).
38. Malamataris, M., Taylor, K. M. G., Malamataris, S., Douroumis, D., & Kachrimanis, K. (2018). Pharmaceutical Nanocrystals: Production by Wet Milling and Applications. *Drug Discovery Today*, 23(3), 534–547.
39. Yadav, T. P., Yadav, R. M., & Singh, D. P. (2012). Mechanical Milling: a Top Down Approach for the Synthesis of Nanomaterials and Nanocomposites. *Nanoscience and Nanotechnology*, 2(3), 22–48.
40. Shiri, M. S. Z., Henderson, W., & Mucalo, M. R. (2019). A Review of The Lesser-Studied Microemulsion-Based Synthesis Methodologies Used for Preparing Nanoparticle Systems of The Noble Metals, Os, Re, Ir and Rh. *Materials*, 12(12).
41. Richard, B., Lemyre, J. L., & Ritcey, A. M. (2017). Nanoparticle Size Control in Microemulsion Synthesis. *Langmuir*, 33(19), 4748–4757.
42. Huang, H., Feng, W., Chen, Y., & Shi, J. (2020). Inorganic Nanoparticles in Clinical Trials and Translations. *Nano Today*, 35, 100972.
43. Mugaka, B. P., Hu, Y., Ma, Y., & Ding, Y. (2019). Surface Modification of Gold Nanoparticles for Targeted Drug Delivery. *Surface Modification of Nanoparticles for Targeted Drug Delivery*, 391–403.
44. Kumar, G. S., & Lin, Q. (2021). Light-Triggered Click Chemistry. *Chemical Reviews*, 121(12), 6991.
45. Borse, V. B., Konwar, A. N., Jayant, R. D., & Patil, P. O. (2020). Perspectives of Characterization and Bioconjugation of Gold Nanoparticles and their Application in Lateral Flow Immunosensing. *Drug Delivery and Translational Research*, 10(4), 878–902.
46. Hu, X., Zhang, Y., Ding, T., Liu, J., & Zhao, H. (2020). Multifunctional Gold Nanoparticles: A Novel Nanomaterial for Various Medical Applications and Biological Activities. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 556510.
47. Petit, T., & Puskar, L. (2018). FTIR Spectroscopy of Nanodiamonds: Methods and Interpretation. *Diamond and Related Materials*, 89, 52–66.
48. Tiernan, H., Byrne, B., & Kazarian, S. G. (2020). ATR-FTIR Spectroscopy and Spectroscopic Imaging for the Analysis of Biopharmaceuticals. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 241, 118636.
49. Pallares-Rusiñol, A., Bernuz, M., Moura, S. L., Fernández-Senac, C., Rossi, R., Martí, M., & Pividori, M. I. (2023). Advances in Exosome Analysis. *Advances in Clinical Chemistry*, 112, 69–117.
50. Toca-Herrera, J. L. (2019). Atomic Force Microscopy Meets Biophysics, Bioengineering, Chemistry, and Materials Science. *ChemSusChem*, 12(3), 603–611.
51. Balfourier, A., Kolosnjaj-Tabi, J., Luciani, N., Carn, F., Gazeau, F., & Murphy, C. J. (2020). Gold-Based Therapy: From Past to Present. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(37), 22639–22648.
52. Sakthi Devi, R., Girigoswami, A., Siddharth, M., & Girigoswami, K. (2022). Applications of Gold and Silver Nanoparticles in Theranostics. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(9), 4187.

53. Nukaly, H. Y., & Ansari, S. A. (2023). An Insight Into the Physicochemical Properties of Gold Nanoparticles in Relation to Their Clinical and Diagnostic Applications. *Cureus*, *15*(4).
54. Withers, P. J., Bouman, C., Carmignato, S., Cnudde, V., Grimaldi, D., Hagen, C. K., Maire, E., Manley, M., du Plessis, A., & Stock, S. R. (2021). X-Ray Computed Tomography. *Nature Reviews Methods Primers 2021 1:1*, *1*(1), 1–21.
55. Yu, Y., Yang, T., & Sun, T. (2020). New Insights into the Synthesis, Toxicity and Applications of Gold Nanoparticles in CT Imaging and Treatment of Cancer. *15*(11), 1127–1145.
56. Yin, M., Liu, X., Lei, Z., Gao, Y., Liu, J., Tian, S., Liang, Z., Wang, Y., Meng, F., & Luo, L. (2022). Precisely Translating Computed Tomography Diagnosis Accuracy into Therapeutic Intervention by a Carbon-Iodine Conjugated Polymer. *Nature Communications 2022 13:1*, *13*(1), 1–12.
57. Dong, Y. C., Hajfathalian, M., Maidment, P. S. N., Hsu, J. C., Naha, P. C., Si-Mohamed, S., Breuilly, M., Kim, J., Chhour, P., Douek, P., Litt, H. I., & Cormode, D. P. (2019). Effect of Gold Nanoparticle Size on Their Properties as Contrast Agents for Computed Tomography. *Scientific Reports*, *9*(1).
58. Bao, H., Xia, Y., Yu, C., Ning, X., Liu, X., Fu, H., Chen, Z., Huang, J., Zhang, Z. (2019). CT/Bioluminescence Dual-Modal Imaging Tracking of Mesenchymal Stem Cells in Pulmonary Fibrosis. *Small*, *15*(46), 1904314.
59. Khademi, S., Sarkar, S., Shakeri-Zadeh, A., Attaran, N., Kharrazi, S., Ay, M. R., & Ghadiri, H. (2018). Folic Acid-Cysteamine Modified Gold Nanoparticle as a Nanoprobe for Targeted Computed Tomography Imaging of Cancer Cells. *Materials Science and Engineering: C*, *89*, 182–193.
60. Khademi, S., Sarkar, S., Shakeri-Zadeh, A., Attaran, N., Kharrazi, S., Ay, M. R., Azimian, H., & Ghadiri, H. (2019). Targeted Gold Nanoparticles Enable Molecular CT Imaging of Head and Neck Cancer: An In Vivo Study. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *114*, 105554.
61. Brito, B., Price, T. W., Gallo, J., Bañobre-López, M., & Stasiuk, G. J. (2021). Smart Magnetic Resonance Imaging-Based Theranostics for Cancer. *Theranostics*, *11*(18), 8706.
62. Nagesh, C. P., Rao, R., Hiremath, S. B., & Honavar, S. G. (2021). Magnetic resonance imaging of the orbit, Part 1: Basic Principles and Radiological Approach. *Indian Journal of Ophthalmology*, *69*(10), 2574.
63. Grover, V. P. B., Tognarelli, J. M., Crossey, M. M. E., Cox, I. J., Taylor-Robinson, S. D., & McPhail, M. J. W. (2015). Magnetic Resonance Imaging: Principles and Techniques: Lessons for Clinicians. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, *5*(3), 246.
64. Bouché, M., Hsu, J. C., Dong, Y. C., Kim, J., Taing, K., & Cormode, D. P. (2020). Recent Advances in Molecular Imaging With Gold Nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry*, *31*(2), 303.
65. van Geuns, R. J. M., Wielopolski, P. A., de Bruin, H. G., Rensing, B. J., van Ooijen, P. M. A., Hulshoff, M., Oudkerk, M., & de Feyter, P. J. (1999). Basic Principles of Magnetic Resonance Imaging. *Progress in Cardiovascular Diseases*, *42*(2), 149–156.
66. Pellico, J., Ellis, C. M., & Davis, J. J. (2019). Nanoparticle-Based Paramagnetic Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2019.
67. Murphy, A., & Gaillard, F. (2015). MRI Sequences (Overview). *Radiopaedia.Org*.

68. Alric, C., Taleb, J., le Duc, G., Mandon, C., Billotey, C., le Meur-Herland, A., Brochard, T., Vocanson, F., Janier, M., Perriat, P., Roux, S., & Tillement, O. (2008). Gadolinium Chelate Coated Gold Nanoparticles as Contrast Agents for Both X-Ray Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging. *Journal of the American Chemical Society*, 130(18), 5908–5915.
69. Iancu, S. D., Albu, C., Chiriac, L., Moldovan, R., Stefancu, A., Moisoiu, V., Coman, V., Szabo, L., Leopold, N., & Bálint, Z. (2020). Assessment of Gold-Coated Iron Oxide Nanoparticles as Negative T2 Contrast Agent in Small Animal MRI Studies. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 4811.
70. Santos, B. S., & Ferreira, M. J. (2019). Positron Emission Tomography in Ischemic Heart Disease. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 38(8), 599–608.
71. Tarkin, J. M., Ā ĩorović, A., Wall, C., Gopalan, D., & Rudd, J. H. F. (2020). Positron Emission Tomography Imaging in Cardiovascular Disease. *Heart*, 106(22), 1712–1718.
72. Machado Rocha, J. M., & Jorge Pereira, B. A. G. (2019). Biological Principles and Clinical Application of Positron Emission Tomography-Tracers in Prostate Cancer: A Review. *Prostate International*, 7(2), 41.
73. Townsend, D. W. (2008). Positron Emission Tomography/Computed Tomography. *Seminars in Nuclear Medicine*, 38(3), 152–166.
74. Lameka, K., Farwell, M. D., & Ichise, M. (2016). Positron Emission Tomography. *Handbook of Clinical Neurology*, 135, 209–227.
75. Shukla, A., & Kumar, U. (2006). Positron Emission Tomography: An Overview. *Journal of Medical Physics / Association of Medical Physicists of India*, 31(1), 13.
76. Ayesa, S. L., & Murphy, A. (2022). Positron Emission Tomography: Evolving Modalities, Radiopharmaceuticals and Professional Collaboration. *Journal of Medical Radiation Sciences*, 69(4), 415–418.
77. Yang, J., Lu, W., Xiao, J., Zong, Q., Xu, H., Yin, Y., Hong, H., & Xu, W. (2018). A Positron Emission Tomography Image-Guidable Unimolecular Micelle NanoplatforM for Cancer Theranostic Applications. *Acta Biomaterialia*, 79, 306–316.
78. Chakravarty, R., Goel, S., Dash, A., & Cai, W. (2017). Radiolabeled Inorganic Nanoparticles for Positron Emission Tomography Imaging of Cancer: An Overview. *The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging : Official Publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR), [and] Section of the Society Of...*, 61(2), 181.
79. Pretze, M., van der Meulen, N. P., Wängler, C., Schibli, R., & Wängler, B. (2019). Targeted ⁶⁴Cu-Labeled Gold Nanoparticles for Dual Imaging With Positron Emission Tomography and Optical Imaging. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 62(8), 471–482.
80. Ghiassian, S., Yu, L., Gobbo, P., Nazemi, A., Romagnoli, T., Luo, W., Luyt, L. G., & Workentin, M. S. (2019). Nitrene-Modified Gold Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Potential as ¹⁸F-Labeled Positron Emission Tomography Probes via I-SPANC. *ACS Omega*, 4(21), 19106–19115.
81. Zhao, Y., Sultan, D., Detering, L., Cho, S., Sun, G., Pierce, R., Wooley, K. L., & Liu, Y. (2014). Copper-64-Alloyed Gold Nanoparticles for Cancer Imaging: Improved Radiolabel Stability and Diagnostic Accuracy. *Angewandte Chemie*, 126(1), 160–163.
82. Manohar, S., & Gambhir, S. S. (2020). Clinical Photoacoustic Imaging. *Photoacoustics*, 19.

83. Hosseinaee, Z., Le, M., Bell, K., & Reza, P. H. (2020). Towards Non-Contact Photoacoustic Imaging [Review]. *Photoacoustics*, 20, 2213–5979.
84. Attia, A. B. E., Balasundaram, G., Moothanchery, M., Dinish, U. S., Bi, R., Ntziachristos, V., & Olivo, M. (2019). A Review of Clinical Photoacoustic Imaging: Current and Future Trends. *Photoacoustics*, 16.
85. Mallidi, S., Larson, T., Tam, J., Joshi, P. P., Karpiouk, A., Sokolov, K., & Emelianov, S. (2009). Multiwavelength Photoacoustic Imaging and Plasmon Resonance Coupling of Gold Nanoparticles for Selective Detection of Cancer. *Nano Letters*, 9(8), 2825.
86. Jokerst, J. v., Cole, A. J., van de Sompel, D., & Gambhir, S. S. (2012). Gold Nanorods for Ovarian Cancer Detection with Photoacoustic Imaging and Resection Guidance via Raman Imaging in Living Mice. *ACS Nano*, 6(11), 10366.
87. Zhao, Z., Swartchick, C. B., & Chan, J. (2022). Targeted Contrast Agents and Activatable Probes for Photoacoustic Imaging of Cancer. *Chemical Society Reviews*, 51(3), 829.
88. Lim, Z. Z. J., Li, J. E. J., Ng, C. T., Yung, L. Y. L., & Bay, B. H. (2011). Gold Nanoparticles in Cancer Therapy. *Acta Pharmacologica Sinica* 2011 32:8, 32(8), 983–990.
89. Kang, M. S., Lee, S. Y., Kim, K. S., & Han, D. W. (2020). State of the Art Biocompatible Gold Nanoparticles for Cancer Theragnosis. *Pharmaceutics*, 12(8), 1–22.
90. Shi, Y., van der Meel, R., Chen, X., & Lammers, T. (2020). The EPR Effect and Beyond: Strategies to Improve Tumor Targeting and Cancer Nanomedicine Treatment Efficacy. *Theranostics*, 10(17), 7921.
91. Vasil'kov, A., Voronova, A., Batsalova, T., Moten, D., Naumkin, A., Shtykova, E., Volkov, V., Teneva, I., & Dzhabazov, B. (2023). Evolution of Gold and Iron Oxide Nanoparticles in Conjugates with Methotrexate: Synthesis and Anticancer Effects. *Materials*, 16(8).
92. *Methotrexate* | C20H22N8O5 | ChemSpider. (n.d.). Retrieved September 22, 2023, from <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.112728.html?rid=220a769b-80bf-4c5a-922d-72dbf205f8fb>
93. Rizk, N., Christoforou, N., & Lee, S. (2016). Optimization of Anti-Cancer Drugs and a Targeting Molecule on Multifunctional Gold Nanoparticles. *Nanotechnology*, 27(18).
94. Vemuri, S. K., Halder, S., Banala, R. R., Rachamalla, H. K., Devraj, V. M., Mallarpu, C. S., Neerudu, U. K., Bodlapati, R., Mukherjee, S., Venkata, S. G. P., Venkata, G. R. A., Thakkumalai, M., & Jana, K. (2022). Modulatory Effects of Biosynthesized Gold Nanoparticles Conjugated with Curcumin and Paclitaxel on Tumorigenesis and Metastatic Pathways—In Vitro and In Vivo Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4).
95. Wang, Z., Dong, J., Zhao, Q., Ying, Y., Zhang, L., Zou, J., Zhao, S., Wang, J., Zhao, Y., & Jiang, S. (2020). Gold Nanoparticle-Mediated Delivery of Paclitaxel and Nucleic Acids for Cancer Therapy. *Molecular Medicine Reports*, 22(6), 4475.
96. *paclitaxel* | C47H51NO14 | ChemSpider. (n.d.). Retrieved September 22, 2023, from <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10368587.html?rid=a7fe9b78-1523-4575-bdf3-401b0044b2b2>
97. Ren, B., Cai, Z. C., Zhao, X. J., Li, L. S., & Zhao, M. X. (2021). Evaluation of the Biological Activity of Folic Acid-Modified Paclitaxel-Loaded Gold Nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 7023–7033.

98. Nicoletto, R. E., & Ofner, C. M. (2022). Cytotoxic Mechanisms of Doxorubicin at Clinically Relevant Concentrations in Breast Cancer Cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 89(3), 285–311.
99. Peter, S., Alven, S., Maseko, R. B., & Aderibigbe, B. A. (2022). Doxorubicin-Based Hybrid Compounds as Potential Anticancer Agents: A Review. *Molecules*, 27(14).
100. Lee, C. S., Kim, T. W., Oh, D. E., Bae, S. O., Ryu, J., Kong, H., Jeon, H., Seo, H. K., Jeon, S., & Kim, T. H. (2020). In Vivo and In Vitro Anticancer Activity of Doxorubicin-Loaded DNA-AuNP Nanocarrier for the Ovarian Cancer Treatment. *Cancers*, 12(3).
101. *Doxorubicin / C27H29NO11 / ChemSpider*. (n.d.). Retrieved September 22, 2023, from <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.29400.html?rid=801efad1-14f3-43c2-bdda-ead6e16003c>
102. Hung, W. H., Zheng, J. H., Lee, K. C., & Cho, E. C. (2019). Doxorubicin Conjugated AuNP/Biopolymer Composites Facilitate Cell Cycle Regulation and Exhibit Superior Tumor Suppression Potential in KRAS Mutant Colorectal Cancer. *Journal of Biotechnology*, 306, 149–158.
103. Gazeau, F., Mulens-Arias, V., Nicolás-Boluda, A., Pinto, A., Balfourier, A., Carn, F., Silva, A. K. A., & Pocard, M. (2021). Tumor-Selective Immune-Active Mild Hyperthermia Associated With Chemotherapy in Colon Peritoneal Metastasis by Photoactivation of Fluorouracil-Gold Nanoparticle Complexes. *ACS Nano*, 15(2), 3330–3348.
104. *Fluorouracil / C4H3FN2O2 / ChemSpider*. (n.d.). Retrieved September 22, 2023, from <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.3268.html?rid=5da49d0b-b6b0-455c-b764-9675ff18334b>
105. Liszbinski, R. B., Romagnoli, G. G., Gorgulho, C. M., Basso, C. R., Pedrosa, V. A., & Kaneno, R. (2020). Anti-EGFR-Coated Gold Nanoparticles In Vitro Carry 5-Fluorouracil to Colorectal Cancer Cells. *Materials*, 13(2).
106. Huang, H. ;, Liu, R. ;, Yang, J. ;, Dai, J. ;, Fan, S. ;, Pi, J. ;, Wei, Y. ;, Guo, X., Ninh, L.-B., Liu, X., Huang, H., Liu, R., Yang, J., Dai, J., Fan, S., Pi, J., Wei, Y., & Guo, X. (2023). Gold Nanoparticles: Construction for Drug Delivery and Application in Cancer Immunotherapy. *Pharmaceutics 2023, Vol. 15, Page 1868*, 15(7), 1868.
107. Fan, M., Han, Y., Gao, S., Yan, H., Cao, L., Li, Z., Liang, X.-J., & Zhang, J. (2020). Ultrasmall Gold Nanoparticles in Cancer Diagnosis and Therapy. Issue 11 *Theranostics*, 10(11), 4944–4957.
108. Chen, Y., Yang, J., Fu, S., & Wu, J. (2020). Gold Nanoparticles as Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 9407–9430.
109. Aldahhan, R., Almohazey, D., & Khan, F. A. (2022). Emerging Trends in the Application of Gold Nanoformulations in Colon Cancer Diagnosis and Treatment. *Seminars in Cancer Biology*, 86, 1056–1065.
110. Kim, M. S., Lee, E. J., Kim, J. W., Chung, U. S., Koh, W. G., Keum, K. C., & Koom, W. S. (2016). Gold Nanoparticles Enhance Anti-Tumor Effect of Radiotherapy to Hypoxic Tumor. *Radiation Oncology Journal*, 34(3), 230.
111. Mirrahimi, M., Khateri, M., Beik, J., Ghoreishi, F. S., Dezfuli, A. S., Ghaznavi, H., & Shakeri-Zadeh, A. (2019). Enhancement of Chemoradiation by Co-Incorporation of Gold Nanoparticles and Cisplatin Into Alginate Hydrogel. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 107(8), 2658–2663.

112. Ngwa, W., Kumar, R., Sridhar, S., Korideck, H., Zygmanski, P., Cormack, R. A., Berbeco, R., & Makrigiorgos, G. M. (2014). Targeted Radiotherapy With Gold Nanoparticles: Current Status and Future Perspectives. *9*(7), 1063–1082.
113. Haume, K., Rosa, S., Grellet, S., Śmiałek, M. A., Butterworth, K. T., Solov'yov, A. v., Prise, K. M., Golding, J., & Mason, N. J. (2016). Gold Nanoparticles for Cancer Radiotherapy: A Review. *Cancer Nanotechnology 2016 7:1*, *7*(1), 1–20.
114. Shang, T., Yu, X., Han, S., & Yang, B. (2020). Nanomedicine-Based Tumor Photothermal Therapy Synergized Immunotherapy. *Biomaterials Science*, *8*(19), 5241–5259.
115. Gupta, N., & Malviya, R. (2021). Understanding and Advancement in Gold Nanoparticle Targeted Photothermal Therapy of Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1875*(2), 188532.
116. Kennedy, L. C., Bickford, L. R., Lewinski, N. A., Coughlin, A. J., Hu, Y., Day, E. S., West, J. L., & Drezek, R. A. (2011). A New Era for Cancer Treatment: Gold-Nanoparticle-Mediated Thermal Therapies. *Small*, *7*(2), 169–183.
117. Cherukuri, P., Glazer, E. S., & Curley, S. A. (2010). Targeted Hyperthermia Using Metal Nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *62*(3), 339–345.
118. Abadeer, N. S., & Murphy, C. J. (2016). Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, *120*(9), 4691–4716.
119. Riley, R. S., & Day, E. S. (2017). Gold Nanoparticle-Mediated Photothermal Therapy: Applications and Opportunities for Multimodal Cancer Treatment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, *9*(4), e1449.
120. Xia, Y., Li, C., Cao, J., Chen, Z., Wang, J., Wu, Y., & Zhang, X. (2022). Liposome-Templated Gold Nanoparticles for Precisely Temperature-Controlled Photothermal Therapy Based on Heat Shock Protein Expression. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *217*, 112686.
121. Kadkhoda, J., Tarighatnia, A., Tohidkia, M. R., Nader, N. D., & Aghanejad, A. (2022). Photothermal Therapy-Mediated Autophagy in Breast Cancer Treatment: Progress and Trends. *Life Sciences*, *298*, 120499.
122. Kesharwani, P., Ma, R., Sang, L., Fatima, M., Sheikh, A., Abourehab, M. A. S., Gupta, N., Chen, Z. S., & Zhou, Y. (2023). Gold Nanoparticles and Gold Nanorods in the Landscape of Cancer Therapy. *Molecular Cancer*, *22*(1), 98.
123. Xia, H., Zhu, J., Men, C., Wang, A., Mao, Q., Feng, Y., Li, J., Xu, J., Cheng, X., & Shi, H. (2023). Light-Initiated Aggregation of Gold Nanoparticles for Synergistic Chemo-Photothermal Tumor Therapy. *Nanoscale Advances*, *5*(11), 3053.
124. de Santana, W. M. O. S., Surur, A. K., Momesso, V. M., Lopes, P. M., Santilli, C. v., & Fontana, C. R. (2023). Nanocarriers for Photodynamic-Gene Therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *43*, 103644.
125. Kim, H. S., & Lee, D. Y. (2018). Near-Infrared-Responsive Cancer Photothermal and Photodynamic Therapy Using Gold Nanoparticles. *Polymers 2018*, Vol. 10, Page 961, *10*(9), 961.
126. Lin, L., Song, X., Dong, X., & Li, B. (2021). Nano-Photosensitizers for Enhanced Photodynamic Therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, *36*, 102597.
127. Donohoe, C., Senge, M. O., Arnaut, L. G., & Gomes-da-Silva, L. C. (2019). Cell Death in Photodynamic Therapy: From Oxidative Stress to Anti-Tumor Immunity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1872*(2), 188308.
128. Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzierska, E., Knap-Czop, K., Kotlińska, J., Michel, O., Kotowski, K., & Kulbacka, J. (2018).

Photodynamic Therapy – Mechanisms, Photosensitizers and Combinations.
Biomedicine & Pharmacotherapy, 106, 1098–1107.