



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIA DE EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS

ELTON MARLON DE ARAÚJO LIMA

COMPÓSITO AG/POLIPIRROL:
SÍNTESE, PROPRIEDADES E ATIVIDADE ANTITUMORAL

Recife

2019

ELTON MARLON DE ARAÚJO LIMA

COMPÓSITO AG/POLIPIRROL:
SÍNTESE, PROPRIEDADES E ATIVIDADE ANTITUMORAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Materiais.

Área de concentração: materiais não-metálicos.

Orientador: Prof. Dr. Celso Pinto de Melo

Recife

2019

Catálogo na fonte
Bibliotecária Mariana de Souza Alves CRB4-2106

L732c Lima, Elton Marlon de Araújo
Compósito Ag/Polipirrol: síntese, propriedades e atividade antitumoral / Elton Marlon de Araújo Lima. – 2019.
87 f.: il., fig., tab.

Orientador: Celso Pinto de Melo
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Ciência de Materiais. Recife, 2019.
Inclui referências, anexos e apêndices.

1. Materiais não-metálicos. 2. Polímero condutor. 3. Nanopartícula de prata. 4. Câncer cervical humano. I. Melo, Celso Pinto de (orientador). II. Título.

540

CDD (22. ed.)

UFPE-FQ 2019-77

ELTON MARLON DE ARAÚJO LIMA

**COMPÓSITO AG/POLIPIRROL:
SÍNTESE, PROPRIEDADES E ATIVIDADE ANTITUMORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência de Materiais.

Aprovada em: 11/04/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Pinto de Melo (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Severino Alves Junior (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Maria Teresa dos Santos Correia (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Patrícia Maria de Albuquerque Farias (Examinadora Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha (Examinador Externo)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

AGRADECIMENTOS

A Deus, por se fazer presente na minha vida nas suas mais diversas formas. Quando na forma de destino me mostrando o quanto nossos planos e desejos são influenciados pela sua ação, e assim provando que podemos encontrar muito mais do que um dia quisemos ou sonhamos. Por ser responsável pelo meu encontro com seres que me permitem crescer, aprender e amadurecer.

Aos meus pais, Vicente e Rosa, pela proteção e cuidado. Por me encherem constantemente com amor, dedicação, incentivo e zelo. Por não medirem esforço para minha formação pessoal e profissional, me mostrando sempre a importância e o valor das minhas conquistas. Eu não poderia nunca ter chegado até aqui sem vocês!

A minha irmã e sobrinho, Erika e Heitor, pelo amor e apoio incondicional.

Ao meu namorado/companheiro Vanderlan Holanda, por me encorajar a não desistir diante das adversidades. Por ser minha fonte inesgotável de amor, afeto, sorrisos sinceros e momentos felizes. Serei eternamente grato pela ajudar na idealização e realização dos experimentos desse trabalho, e por ter sido o responsável por me fazer seguir um caminho que eu já tinha esquecido. Por me ensinar, diariamente, a ser um ser humano mais proativo, produtivo e confiante. Por me fazer refletir sobre minhas ações e palavras, o que me auxilia na construção de um pensamento mais maduro. Sem você, nem eu e nem essa pesquisa, seriam o que são hoje.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Celso P. de Melo, que sempre foi muito solícito comigo desde minha chegada a Recife. Por sempre está disponível para me ajudar nos momentos de desespero, quando minha autocobrança não me deixava enxergar meu progresso. Pela receptividade com minhas propostas e ideias para esse trabalho. E por me permitir aprender tanto diante da sua tão admirada conduta científica e pessoal.

À Profa. Dra. Regina Célia Bressan (Instituto Aggeu Magalhaes - FIOCRUZ/PE), pela receptividade comigo e com meu trabalho. Pelas discussões científicas que me permitiam aprender bastante e me que traziam uma explosão de ideias. Por me mostrar que uma colaboração não se faz apenas de um simples aceite, mas deu uma preocupação com o andamento, com o cuidado em que tudo está sendo realizado e pelo constante incentivo para pensar mais adiante.

Ao Prof. Dr. César Andrade (UFPE), por ter sido peça essencial no início desse trabalho. Por sempre está disposto compartilhar ideias e discussões repletas de ensinamentos.

À Profa. Dra. Claudete Fernandes (UFPE), por sempre me receber com um sorriso e muita simpatia. Pela ajuda no entendimento do planejamento experimental, que foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho. Por ser sempre solícita comigo, mesmo quando estava “apagando vários incêndios de uma só vez”.

Aos familiares que sempre torcem e me incentivam a ir além.

Aos amigos do RN (Layse, Isabelle, Nadja, Vanessa, Rayssa e Raphaella) que emanam suporte e amizade na distância, e que me ensinam que amizade é uma questão de SER.

Aos amigos que fiz Recife, Angelina, Renato, Cléverton, Renata e Ricardo, por todo companheirismo, apoio e momentos compartilhados.

Aos amigos que compartilharam da mesma jornada que a minha, Andrey e Hanna, vocês trouxeram leveza e sorrisos para um período onde o novo era assustador. Guardo com muito afeto todos os altos e baixos, as loucuras e as alegrias que vivemos. Sem dúvida, esse momento não teria o mesmo significado sem vocês.

A todos os colegas do laboratório de Polímeros Não-Convencionais (PNC): Bruna, Adriana, Carol, Rubênia, Graciela, Filipe, Kamila, Hérica, Mauricio, Lindembergue, Jéssica, e em especial Gabriela, Winnie, Edson, Romário, pelas discussões científicas e bons momentos vividos.

A todos do Laboratório de Biologia Celular de Patógenos (Instituto Aggeu Magalhaes - FIOCRUZ/PE) Abigail, Lucas, Tuanne, Vitor, Tiago, em especial Pedro Henrique e Welson Vicente, que foram peças fundamentais para esse trabalho ser concluído. Agradeço pelo apoio, torcida, empenho em me ensinar e auxiliar nos experimentos.

A FACEPE e o CNPq pela concessão da bolsa e apoio financeiro que foram essenciais para esse trabalho.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências de Materiais, por compartilharem todo conhecimento e experiência para minha formação.

*“Amigos a gente encontra
O mundo não é só aqui
Repare naquela estrada
Que distância nos levará
As coisas que eu tenho aqui
Na certa terei por lá
Segredos de um caminhão
Fronteiras por desvendar
Não diga que eu me perdi
Não mande me procurar
Cidades que eu nunca vi
São casas e braços a me agasalhar”.*
(Dominginhos, 1980)

RESUMO

Tem sido crescente busca por novos materiais compósitos formados pela combinação de partículas metálicas e polímeros condutores, por conta das possíveis aplicações que venham explorar as propriedades mecânicas, condutoras e físico-químicas diferenciadas desses materiais. Nesse contexto, destaca-se a utilização de tais compósitos para o sensoriamento de biomoléculas e antígenos, o desenvolvimento de dispositivos eletrônicos, a produção de plataformas de diagnóstico molecular, como marcadores fluorescentes, ou no uso como agente terapêutico alternativo para doenças. Ao mesmo tempo, materiais constituídos de polímeros condutores, e em especial de polipirrol, têm demonstrado alto potencial no combate a células tumorais *in vitro*. O presente trabalho consistiu na preparação de um compósito de Ag/Polipirrol e na avaliação de sua atividade antitumoral contra células de câncer cervical humano (HeLa). Para isso, a síntese do compósito foi feita segundo um planejamento fatorial 2^3 implementado para a otimização de suas propriedades fluorescentes, de seu potencial zeta e do tamanho das partículas formadas. O compósito foi caracterizado por UV-Vis, FTIR e MET, antes de sua utilização em ensaios *in vitro* de biocompatibilidade e atividade antitumoral. Para os aspectos de biocompatibilidade, foram utilizados ensaios de citotoxicidade em três linhagens de células de mamíferos (macrófagos, células VERO e fibroblastos) e testes de suas propriedades hemolíticas em amostras de sangue humano. Para as concentrações testadas, foi possível verificar que enquanto a adição do compósito de Ag/Polipirrol não levava a uma redução significativa na viabilidade das células de mamíferos, perfis distintos de sua interação com as hemácias dos diferentes fenótipos eram observados. Ao mesmo tempo, no estudo da atividade antitumoral com células HeLa foi confirmada uma redução significativa dos grupos tratados, com a concentração citotóxica que reduz a viabilidade em 50% da cultura (CC_{50}) sendo estimada em 210,6 $\mu\text{g/mL}$. Através de imagens de MEV, foi possível observar que as alterações nas ultraestruturas das células HeLa é dependente da concentração utilizada do Ag/Polipirrol. O fato que o compósito Ag/Polipirrol apresenta atividade antitumoral sem que se faça necessária a utilização simultânea de uma radiação eletromagnética externa sugere que esse material aparece como um candidato promissor para uso como um agente terapêutico alternativo.

Palavras-chave: Polímero condutor. Nanopartícula de prata. Câncer cervical humano

ABSTRACT

It has been a growing search for new composite materials formed by the combination of metallic particles and conducting polymers, due to the possible applications that will exploit the differentiated mechanical, conductive and physicochemical properties of these materials. In this context, the use of such composites for the sensing of biomolecules and antigens, the development of electronic devices, the production of molecular diagnostic platforms, as fluorescent markers, or in the use as an alternative therapeutic agent for diseases is highlighted. At the same time, materials consisting of conductive polymers, and especially polypyrrole, have demonstrated high potential in the fight against tumor cells *in vitro*. The present work consisted of the preparation of an Ag/Polypyrrole composite and the evaluation of its antitumor activity against human cervical cancer cells (HeLa). For this, the synthesis of the composite was made according to a factorial planning 2^3 implemented for the optimization of its fluorescent properties, its zeta potential and the size of the formed particles. The composite was characterized by UV-Vis, FTIR and TEM, prior to its use in *in vitro* biocompatibility and antitumor activity assays. For biocompatibility aspects, cytotoxicity assays were performed on three mammalian cell lines (macrophages, VERO cells and fibroblasts) and tests for their hemolytic properties on human blood samples. For the concentrations tested, it was possible to verify that while the addition of the Ag/Polypyrrole composite did not lead to a significant reduction in the viability of the mammalian cells, different profiles of its interaction with the erythrocytes of the different phenotypes were observed. At the same time, in the study of the antitumor activity with HeLa cells a significant reduction of the treated groups was confirmed, with the cytotoxic concentration reducing the viability in 50% of the culture (CC_{50}) being estimated in 210.6 $\mu\text{g/mL}$. Through SEM images, it was possible to observe that the changes in the ultrastructures of HeLa cells is dependent on the Ag/Polypyrrole concentration used. The fact that Ag/Polypyrrole composite exhibits antitumor activity without requiring the simultaneous use of an external electromagnetic radiation source suggests that this material appears as a promising candidate for use as an alternative therapeutic agent.

Keywords: Conductive polymer. Silver nanoparticle. Human cervical cancer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Aumento da condutividade do trans-poliacetileno com o aumento da dopagem.....	19
Figura 2 -	Algumas das possíveis aplicações de polímeros condutores.	21
Figura 3 -	Diagrama das bandas de energia em um sólido.....	23
Figura 4 -	Estrutura de bandas associadas à presença de sólitons no poliacetileno. A ação do dopante pode alterar o número de elétrons no estado localizado. (A) sólito neutro, (B) sólito negativamente carregado e (C) sólito positivamente carregado.....	24
Figura 5 -	Formas do sólito no trans-poliacetileno: (A) carregado positivamente, (B) neutro e (C) carregado negativamente.	25
Figura 6 -	Oxidação do pirrol e formação do pólaron e bipólarons.	26
Figura 7 -	Estrutura molecular do pirrol.....	27
Figura 8 -	Representação geométrica do planejamento fatorial 22 (A) e 23 (B)	33
Figura 9 -	Representação espacial de taxas ajustadas de incidência de câncer de colo de útero por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2018..	38
Figura 10 -	Lesões de colo de útero relacionadas ao CC.	39
Figura 11 -	Intensidade de fluorescência do composto Ag/Polipirrol para diferentes comprimentos de onda de excitação.....	48
Figura 12 -	A) espectro de emissão do composto Ag/Polipirrol para $\lambda_{exc} = 350$ nm; B) gráfico de coordenada de cor no espectro RGB.....	49
Figura 13 -	Gráfico de Pareto para a intensidade de fluorescência dos compostos Ag/Polipirrol.	51
Figura 14 -	Interpretação geométrica dos efeitos significativos para a intensidade de fluorescência do composto Ag/Polipirrol.	51
Figura 15 -	Gráfico cúbico das respostas de intensidade de fluorescência do planejamento fatorial.	52
Figura 16 -	Gráfico de Pareto para a medidas de potencial zeta dos compostos Ag/Polipirrol.	54
Figura 17 -	Gráfico cúbico das respostas de potencial zeta do composto Ag/Polipirrol.	55

Figura 18 -	Gráfico de Pareto para o diâmetro médio das partículas dos compósitos Ag/Polipirrol.....	56
Figura 19 -	Espectro de UV-Vis do compósito de Ag/Polipirrol.	57
Figura 20 -	Espectro de FTIR do compósito Ag/Polipirrol.	58
Figura 21 -	Imagens de MET do compósito Ag/polipirrol em diferentes magnificações.	59
Figura 22 -	Percentual Hemolítico de Ag/Polipirrol.	61
Figura 23 -	Efeito do Ag/Polipirrol sobre células de mamíferos.....	63
Figura 24 -	Efeito do compósito Ag/Polipirrol sobre células de carcinoma cervical humano.	64
Figura 25 -	Efeito do compósito Ag/Polipirrol sobre células HeLa.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Condutividade e estrutura química de diferentes polímeros condutores.	20
Tabela 2 -	Comparação entre os métodos de polimerização química e eletroquímica de polímeros condutores.....	21
Tabela 3 -	Matriz de coeficiente de contraste para um planejamento fatorial 2^2	32
Tabela 4 -	Matriz de coeficiente de contraste para um planejamento fatorial 2^3	32
Tabela 5 -	Estimativa das taxas de incidência brutas e ajustada de novos casos de câncer, no Brasil, para 100 mil habitantes.	37
Tabela 6 -	Fatores e níveis adotados no planejamento para a síntese do compósito de Ag/Polipirrol.	42
Tabela 7 -	Matriz de coeficiente de contraste do planejamento 2^3 para a síntese do compósito Ag/Polipirrol.	42
Tabela 8 -	Planejamento fatorial e intensidade de fluorescência dos compósitos Ag/Polipirrol.	50
Tabela 9 -	Planejamento fatorial e medidas de potencial zeta dos compósitos Ag/Polipirrol.	53
Tabela 10 -	Planejamento fatorial e diâmetro médio de partículas dos compósitos Ag/Pirrol.....	55
Tabela 11 -	Taxa de hémolises (HT_{50}) para os tipos de hemácias testadas.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag	Prata
AgNPs	Nanopartículas de prata
CC	Câncer cervicouterino
DMEM	Dulbecco modification of Minimum Essential Media
HeLa	Células de câncer cervical humano
HPV	Vírus do Papiloma Humano
MTT	[3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina]
PAc	Poliacetileno
PANI	Polianilina
TTF	Tetratiofulvaleno

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	Objetivo Geral	16
1.1.2	Objetivos Específicos.....	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1	POLÍMEROS CONDUTORES.....	18
2.1.1	Condução em polímeros condutores	21
2.1.1.1	Mecanismo de condução em polímeros condutores	24
2.1.2	Polipirrol	26
2.2	COMPÓSITO DE NANOPARTICULAS DE PRATA/POLIPIRROL..	28
2.3	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	30
2.3.1	Planejamento fatorial completo	30
2.3.2	Cálculo dos efeitos	31
2.3.3	Interpretação geométrica dos resultados	33
2.3.4	Estimativa do erro experimental e erro padrão dos efeitos.....	33
2.4	BIOCOMPATIBILIDADE E ATIVIDADE ANTI-TUMORAL DE POLÍMEROS CONDUTORES, NANOPARTÍCULAS DE PRATA E MATERIAIS COMPÓSITOS	34
2.5	ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER.....	36
2.5.1	Câncer de colo de útero.....	37
3	METODOLOGIA.....	41
3.1	PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³	41
3.1.1	Síntese do compósito Ag/Polipirrol.....	43
3.1.2	Métodos de caracterização.....	44
3.1.2.1	Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis	44
3.1.2.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	44
3.1.2.3	Espectroscopia de fluorescência.....	44
3.1.2.4	Determinação do tamanho de partícula e do potencial zeta	44
3.1.2.5	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	44
3.2	ENSAIOS DE BIOCOMPATIBILIDADE	45
3.2.1	Atividade hemolítica in vitro	45
3.2.2	Ensaio de citotoxicidade.....	45

3.2.3	Atividade antitumoral <i>in vitro</i>	46
3.2.4	Análise estatística do ensaio de biocompatibilidade e da atividade tumoral <i>in vitro</i>	47
3.2.5	Ensaio ultraestrutural	47
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1	PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³	48
4.1.1	Medidas de espectroscopia de fluorescência	48
4.1.2	Medidas de potencial zeta	52
4.1.3	Diâmetro médio das partículas.....	55
4.2	MEDIDAS DE UV-VIS	56
4.3	MEDIDAS DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	58
4.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	58
4.5	TESTE HEMOLÍTICO	59
4.6	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	61
4.7	ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i>	63
4.8	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL.....	66
5	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	69
	REFERÊNCIAS	70
	ANEXO A – MECANISMO PROPOSTO PARA A POLIMERIZAÇÃO DO PIRROL POR Ag⁺	84
	APÊNDICE A – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DE PROJETO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS	85

1 INTRODUÇÃO

Polímeros condutores (PCs) exibem a combinação de propriedades típicas dos metais – como a capacidade de conduzir eletricidade e excelentes propriedades elétricas e óticas – com a facilidade de síntese e flexibilidade de processamento dos polímeros convencionais (isolantes). Sendo sistemas conjugados, onde ocorre a alternância de ligações covalentes simples e duplas ao longo da cadeia principal, esses polímeros não-convencionais apresentam propriedades físico-químicas peculiares, que são bastante exploradas em aplicações biomédicas (Balint *et al.*, 2014).

De fato, essa classe de polímeros apresenta propriedades vantajosas para a integração em sistemas biológicos, tais como i) a condução de carga eletrônica e iônica, que é útil para a interação biológica, ii) a formação de interfaces com soluções eletrolíticas, que resulta da facilidade de sua modificação estrutural, iii) a possibilidade de ter sua superfície funcionalizada através da deposição de substratos ou moléculas (por métodos químicos e eletroquímicos), e iv) apresentar uma estrutura polimérica condutora que tem propriedades mecânicas quase semelhantes às da maior parte dos tecidos biológicos, ou seja, exibir uma baixa incompatibilidade mecânica (Joy *et al.*, 2017).

Nesse contexto, destaca-se o polipirrol (PPi), um dos polímeros condutores mais conhecidos, que é utilizado em inúmeras aplicações, incluindo o desenvolvimento de ferramentas cirúrgicas (Lee *et al.*, 2006), sistemas para administração de medicamentos (Ferraz *et al.*, 2012), sensoriamento de biomoléculas e patógenos (Aoki *et al.*, 1996), e até mesmo como agentes terapêuticos (Liao *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2014). A diversidade de aplicações dos PCs está relacionada com sua alta condutividade, boa estabilidade ambiental e compatibilidade para com organismos vivos (células, tecidos e órgãos) (Zha *et al.*, 2013).

É de interesse combinar o PPi com outros tipos de materiais, de modo a otimizar as propriedades resultantes e também levar a uma ampliação de sua aplicabilidade. Nessas circunstâncias, a utilização de nanopartículas metálicas é vantajosa em virtude da possibilidade de que elas possam vir a atuar diretamente na síntese química polimérica, guiar a formação de nanoestrutura poliméricas condutoras e permitir a otimização das propriedades térmicas e elétricas do compósito (Ghosh Chaudhuri e Paria, 2012; Suryawanshi *et al.*, 2014; Oliveira e Camilo, 2019).

O uso de nanopartículas de prata para a síntese de PPi já é muito bem estabelecido na literatura, pois o cátion de prata oxida o monômero (Pirrol), do que resulta a formação do PPi ao mesmo tempo em que se origina a prata metálica (Ag^0), que fica imersa na matriz polimérica

produzida (Stejskal, 2013), resultando assim na formação do compósitos de Ag/Polipirrol. Esses compósitos podem ser empregados para a redução do crescimento microbiano dos mais diferentes tipos de bactérias (Babu *et al.*, 2012; Maráková *et al.*, 2017), na catálise de grupos aminas usando álcoois em diversas condições (Mandi *et al.*, 2016) e na estabilização de emulsões de óleo em água (Fujii *et al.*, 2007).

Ao mesmo tempo, a investigação de compósitos constituídos de PCs e nanopartículas metálicas voltados ao tratamento e imageamento de células cancerígenas *in vitro* tem se tornado promissora, tendo como base os resultados de estudos que comprovaram a eficácia de polipirrol (Zha *et al.*, 2013) como plataforma terapêutica, e o uso de nanopartículas de prata fluorescentes para a identificação de tumores (De Matteis *et al.*, 2018). Sabe-se também que compósitos formados de polipirrol/óxido de ferro/nanopartícula de ouro exibem propriedades bifuncionais, ou seja podem ser usados tanto em terapia e quanto na obtenção de imagens (Han, L. *et al.*, 2017). Por sua vez, a biocompatibilidade dos compósitos à base de PPI aumenta ainda mais a possibilidade de seu uso no combate de células malignas, ao oferecer uma maior seletividade *in vitro* e *in vivo* na ação anti-tumoral (Wang *et al.*, 2004). Os fármacos atualmente disponíveis costumam causar muitos efeitos colaterais sistêmicos, por não apresentarem seletividade suficiente para com os sistemas biológicos, o que acaba fazendo com que atinjam células saudáveis, resultando em um alto índice de reações medicamentosas adversas (Mahmoudi *et al.*, 2011).

Diante disso, a síntese e caracterização de materiais compósitos formados por PCs e nanopartículas metálicas é uma etapa preliminar essencial para possíveis aplicações desses materiais em modelos experimentais *in vitro* no uso contra células neoplásicas malignas humanas. A identificação de um agente ativo que alie um alto potencial antitumoral a uma baixa toxicidade representa um campo de trabalho ainda em aberto. O presente estudo trata da otimização de propriedades de um compósito de nanopartículas de prata e polipirrol (Ag/Polipirrol) e da avaliação de seu efeito sobre células de câncer cervical humano (HeLa) e células de mamíferos não-neoplásicas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Preparar e caracterizar um compósito de nanopartículas de prata e polipirrol, e avaliar seu potencial citotóxico e antitumoral *in vitro*

1.1.2 Objetivos Específicos

- Otimizar as propriedades de um compósito de Ag/Polipirrol a partir da variação controlada das condições de preparação;
- Caracterizar o compósito híbrido mais promissor obtido a partir do planejamento experimental;
- Determinar o percentual hemolítico desse compósito sobre hemácias humanas do tipo A, B, O e AB;
- Avaliar a citotoxicidade desse compósito sobre células Vero, macrófagos J774 e fibroblastos F1072;
- Investigar o efeito do compósito sobre células de câncer cervical humano.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nesta seção serão abordados tópicos importantes para elaboração deste trabalho, através de uma breve revisão dos principais conceitos relativos a polímeros condutores, planejamento experimental, biocompatibilidade e aspectos gerais sobre o câncer.

2.1 POLÍMEROS CONDUTORES

Por muito tempo os compostos orgânicos – formados basicamente por átomos de carbono e hidrogênio, eventualmente combinados com heteroátomos (oxigênio, enxofre e nitrogênio) – foram considerados exemplos típicos de materiais isolantes (Padilla, 2011). Nessa classe estão inseridos os polímeros, que são formados por moléculas orgânicas pequenas (monômeros) unidas por uma reação de polimerização, e que podem ser de origem natural ou sintética. Os polímeros sintéticos ganharam bastante atenção devido a sua ampla utilização pela indústria, principalmente a elétrica, na forma de materiais isolantes (Faez *et al.*, 2000).

Em meados dos anos 60 começaram a surgir hipóteses de que certos compostos orgânicos – como os sais de tetratiofulvaleno (TTF) – poderiam ter características supercondutoras, exibindo temperaturas críticas de transição relativamente mais elevadas. Alguns anos depois esses compostos foram sintetizados, o que abriu caminho para a síntese numerosos polímeros orgânicos com propriedades condutoras (Melo, 1987).

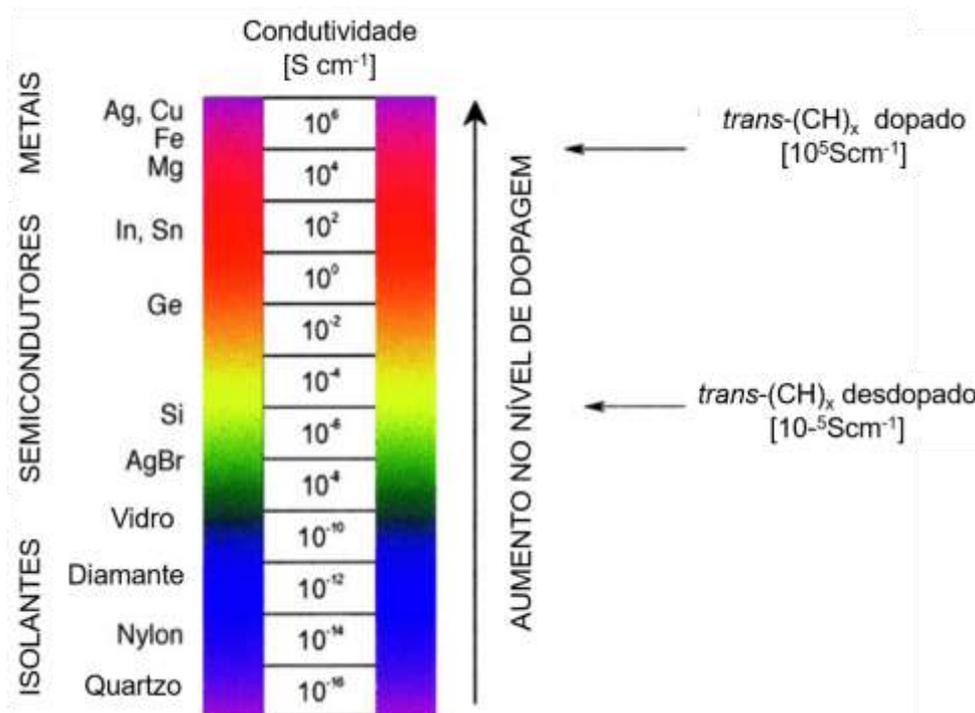
Muito embora o primeiro polímero orgânico condutor tenha sido descrito em 1862, com a síntese eletroquímica da polianilina (PANI), até o início da década de 1970 presumia-se que os materiais orgânicos (inclusive os polímeros) teriam comportamento de isolantes ou semicondutores. Com a preparação de poliacetileno através da polimerização do acetileno em hexano e utilizando catalisadores de alumínio e titânio, foi possível constatar que moléculas orgânicas poderiam apresentar características semicondutoras associadas à presença de ligações duplas conjugadas (Natta *et al.*, 1958).

Apenas no final da década de 1970 houve um maior interesse na condutividade de polímeros orgânicos, devido à descoberta das propriedades semicondutoras do trans-poliacetileno (trans-PAc), por Hideki Shirakawa, Alan MacDiarmid e Alan Heeger (Chiang *et al.*, 1977; Shirakawa *et al.*, 1977). A partir disso, intensificou-se o estudo das propriedades elétricas e condutivas dos materiais poliméricos. Foi possível aumentar a condutividade do trans-PAc em até 13 ordens de grandeza após seu tratamento com iodo (Macdiarmid, 2001), como mostrado na Fig. 1. Essa ampliação na capacidade condutiva foi então atribuída ao processo de remoção ou adição de elétrons na cadeia polimérica, em um procedimento que

passou a ser chamado de “dopagem” (Shirakawa e Ikeda, 1974). Esse trabalho é considerado o marco inicial do desenvolvimento e aplicação dos polímeros condutores, por chamar a atenção da comunidade científica internacional, o que culminou na concessão do prêmio Nobel de Química em 2000 para Alan G. MacDiarmid, Alan J. Heeger e Hideki Shirakawa.

O poliacetileno apresentava uma alta instabilidade química ao ser exposto ao ar (Masuda e Higashimura, 1984; Padilla, 2011), o que impulsionou a busca por polímeros conjugados que apresentassem comportamento condutor semelhante, mas que fossem mais estáveis, como a polianilina, o polipirrol, o politiofeno, poli(p-fenileno) e poli(p-fenileno vinileno), cujas unidades de repetição e condutividades estão representadas na Tabela 1 (Mattoso, 1996). Esses PCs apresentam propriedades físico-químicas distintas e podem ser obtidos por diferentes métodos de preparação, encontrando as mais diversas aplicações (Balint *et al.*, 2014), como mostrado na Fig. 2.

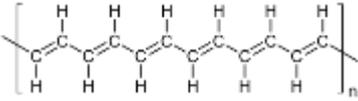
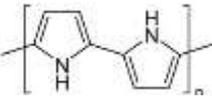
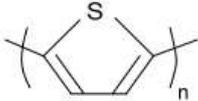
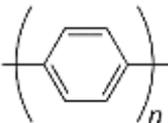
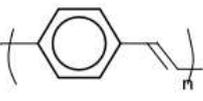
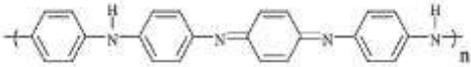
Figura 1 - Aumento da condutividade do trans-poliacetileno com o aumento da dopagem.



Fonte: (Macdiarmid, 2001).

Os PCs podem ser classificados como moléculas formadas por uma cadeia principal contendo ligações simples e duplas alternadas, ou conjugadas, como mostrado na Tabela 1. Cada ligação dupla (C=C) consiste em uma ligação “sigma” (σ) e uma ligação “pi” (π), que é mais fraca e menos localizada, um vez que os elétrons π são mais deslocalizados ao longo da cadeia conjugada (Medeiros *et al.*, 2012).

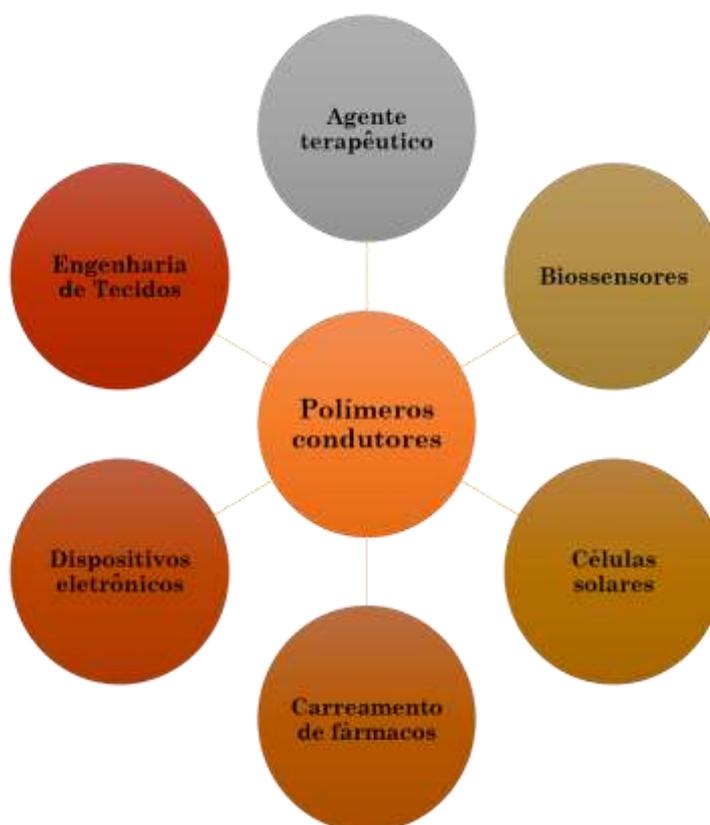
Tabela 1 - Condutividade e estrutura química de diferentes polímeros condutores.

Polímero	Estrutura química	Condutividade (S/m)
Poliacetileno		$10^3 - 1.7 \times 10^5$
Polipirol		$10^2 - 7.5 \times 10^3$
Politiofeno		$10 - 10^3$
Poli(p-fenileno)		$10^2 - 10^3$
Poli(fenileno vinileno)		$3 - 5 \times 10^3$
Polianilina		30 - 200

Fonte: adaptado de (Kumar e Sharma, 1998).

Os PCs podem ser obtidos através de métodos de polimerização química ou eletroquímica, e cada um desses métodos apresentam suas vantagens e desvantagens específicas, como mostrado na Tabela 2 (Diaz e Bargon, 1986), sendo a polimerização química a mais utilizada na indústria por permitir a obtenção do material em larga escala. Durante a polimerização via reações de oxidação-redução, há o surgimento de defeitos estruturais que podem se deslocar ao longo da cadeia polimérica; tais defeitos são responsáveis por conferir a condutividade aos PCs, com o transporte de carga sendo associado aos elétrons que são adicionados e removidos aos defeitos provenientes da oxirredução da cadeia (Faez *et al.*, 2000).

Figura 2 - Algumas das possíveis aplicações de polímeros condutores.



Fonte: adaptado de (Jang, 2016).

Tabela 2 – Comparação entre os métodos de polimerização química e eletroquímica de polímeros condutores.

Tipo de polimerização	Vantagens	Desvantagens
Polimerização química	<ul style="list-style-type: none"> • Possibilidade de produção em larga escala; • Diferentes rotas de síntese; • Mais opções de funcionalizações na cadeia polimérica; 	<ul style="list-style-type: none"> • Não é utilizada na preparação de filmes finos; • Síntese mais complexas;
Polimerização eletroquímica	<ul style="list-style-type: none"> • Melhores para a produção de filmes finos; • Síntese simples; • Controle de espessura dos filmes; • Temperatura ambiente; 	<ul style="list-style-type: none"> • Dificuldade para remover filmes finos que são produzidos na superfície do eletrodo;

Fonte: adaptado de (Diaz e Bargon, 1986).

2.1.1 Condução em polímeros condutores

A estrutura eletrônica de uma molécula é determinada pelo número e pelo tipo de distribuição espacial dos átomos nela presentes. Esse número é relativamente pequeno, do que

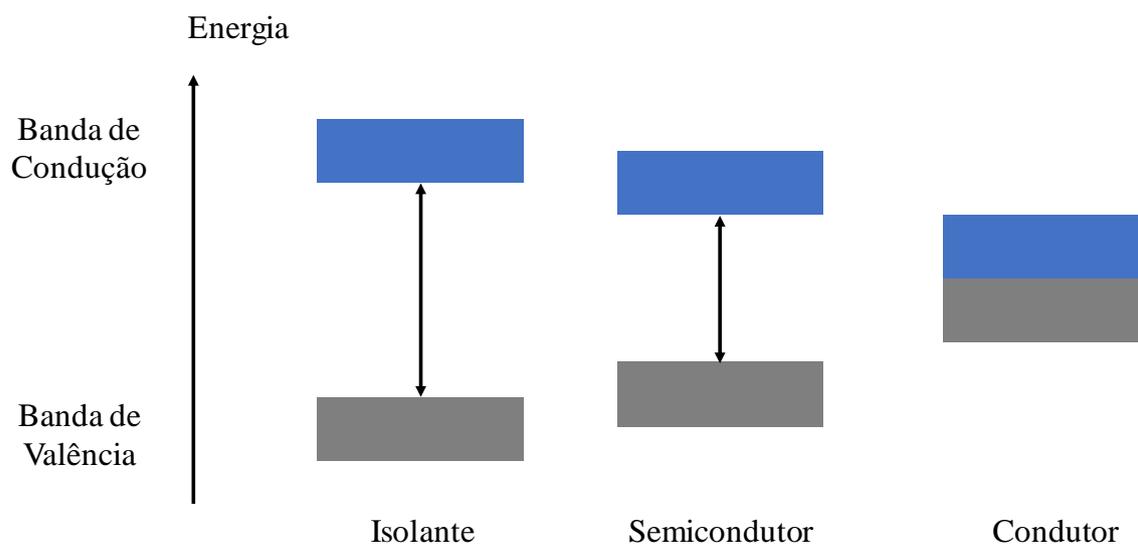
resultam níveis de energias que podem ser enumerados (Melo, 1987). Quimicamente, isso é explicado pela teoria do orbital molecular, onde a partir de orbitais degenerados há a formação do orbital ocupado de mais alta energia (HOMO, highest occupied molecular orbital) e do orbital de mais baixa energia desocupado (LUMO, lowest unoccupied molecular orbital), separados por uma dada energia (E_g) (Brown, 2009).

Já para um polímero ou sólido, os níveis de energia são inúmeros e tão próximos que quase não é possível distingui-los, de modo que eles acabam por se concentrar em regiões de energias permitidas, que recebem o nome de bandas (Padilla, 2011). Essas bandas são separadas entre si por regiões de energias inacessíveis aos elétrons, chamadas de regiões de energia proibida, mais conhecidas pelo termo inglês “*gap*”. Quando átomos se unem para formar um polímero ou sólido, a ligação química resultante se dá pela interação dos elétrons mais externos, também conhecidos como elétrons de valência.

Assim, por exemplo, enquanto que para um metal (condutor) esses elétrons são deslocalizados por todo o material, para o diamante (isolante) os elétrons de valência do carbono formam apenas ligações localizadas entre cada átomo e seus vizinhos (Melo, 1987; Faez *et al.*, 2000). Os elétrons são alocados a partir dos estados de menor energia (Princípio de Aufbau), e como consequência dessa distribuição podem surgir bandas (ou seja, faixas de energia totalmente vazias ou parcialmente preenchidas, originando assim a banda de valência (BV) — banda que contém os elétrons de valência ou elétrons de maior estado de energia — e a banda de condução (BC), onde estão inseridos níveis eletrônicos vazios de menor energia (Medeiros *et al.*, 2012). Em termos comparativos entre a teoria dos orbitais moleculares e a teoria de bandas, o orbital HOMO corresponde aos limites superiores da banda de valência, enquanto que ao orbital LUMO estão associados os limites inferiores da banda de condução (Hümmelgen *et al.*, 1998).

O nível de condutividade de um material é dado pelo número de portadores de carga que estejam livres para se deslocar frente a aplicação de um campo externo (Melo, 1987). Para os materiais condutores, como os metais, ocorre a ausência do *gap*, e então a excitação térmica dos elétrons da BV para BC se faz facilmente, do que resulta sua boa condutividade. Nos semicondutores, como o silício, onde o *gap* de energia tem valor menor que o encontrado nos materiais isolantes, a condutividade é mais baixa à temperatura ambiente, mas pode crescer à medida que se aumenta a temperatura. Nos isolantes, essa separação é suficientemente grande, de tal modo que mesmo em condições elevadas de temperaturas todos os elétrons permanecem emparelhados na banda de valência (Faez *et al.*, 2000; Padilla, 2011), como mostrado na Fig. 3.

Figura 3 - Diagrama das bandas de energia em um sólido.



Fonte: (Padilla, 2011).

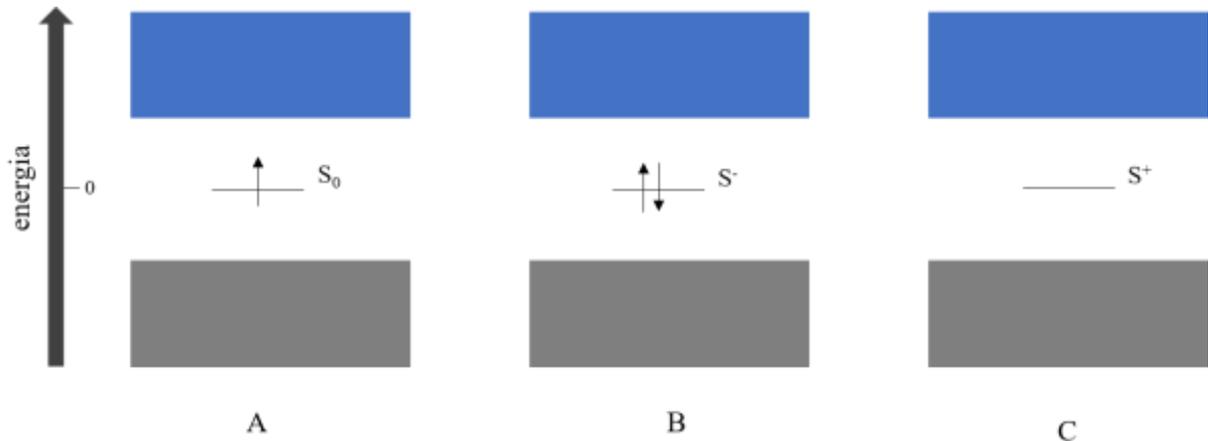
A condutividade de um polímero conjugado ocorre quando há a criação de defeitos conformacionais ao longo da cadeia principal do polímero. Para os PCs, com sequências planares ou quase planares de ligações duplas e simples alternadas ao longo da cadeia, a condutividade elétrica acontece em consequência da mobilidade dos portadores de carga que são introduzidos no sistema π conjugado (dos orbitais p_z) através do processo de “dopagem” (Padilla, 2011).

A “dopagem” em PCs ocorre por efeito de processos químicos, como a oxidação (retirada de elétrons – dopagem do tipo- p) ou pela redução (doação de elétrons – dopagem do tipo- n) das cadeias conjugadas. O termo “dopagem” é utilizado devido à analogia com o caso dos semicondutores inorgânicos cristalinos, porém o que diferencia o processo de dopagem nos polímeros é que impurezas não são introduzidas diretamente na cadeia polimérica, mas sim nas vizinhanças, criando assim deformações e defeitos de carga localizados que são responsáveis pelo aumento da condutividade em PCs (Maia *et al.*, 2000). Esse defeito – em termos químicos, um radical – recebe o nome de sóliton, em analogia ao nome dado em algumas áreas da física a uma onda que se propaga sem dispersão de energia (Melo, 1987).

Em termos da estrutura eletrônica, a presença do defeito representa uma quebra de simetria da cadeia, o que dá origem a um estado eletrônico localizado na região entre as bandas (*gap*). Como mostrado para o poliacetileno, cujo defeito ocorre exatamente no meio do *gap* por estar associado a um elétron desemparelhado, esse nível fica então semipreenchido. A ação do dopante se faz pela ação de agentes doadores que irão transferir o elétron para completar o nível localizado, ou de um agente aceitador, quando o elétron desemparelhado é transferido

para impureza, como demonstrado pela estrutura de bandas com a presença do sóliton para estrutura do poliacetileno (Fig. 4) (Melo, 1987).

Figura 4 - Estrutura de bandas associadas à presença de sólitons no poliacetileno. A ação do dopante pode alterar o número de elétrons no estado localizado. (A) sóliton neutro, (B) sóliton negativamente carregado e (C) sóliton positivamente carregado.



Fonte: (Melo, 1987).

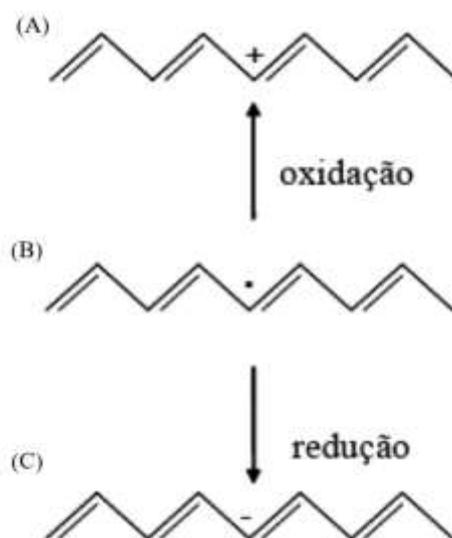
Portanto, o mecanismo de transporte de carga prevalente nos PCs não é o mesmo observado nos semicondutores usuais, de modo que suas propriedades não podem ser explicadas apenas com base da teoria de banda usual (Padilla, 2011). Frente a isso, e levando em conta o fato de que diversos polímeros condutores de estruturas mais complexas que o poliacetileno (como, por exemplo, o polipirrol, politiofeno e polianilina – que não possuem sólitons livres) também atingem condutividades em nível metálico ao serem dopados – se fez necessário o desenvolvimento de uma explicação única e genérica para condutividade em polímeros orgânicos condutores (Su *et al.*, 1979; Su *et al.*, 1980), como será discutido na próxima seção.

2.1.1.1 Mecanismo de condução em polímeros condutores

Para explicar o processo de condução observado no poliacetileno, foi proposto um modelo baseado na existência de sólitons presentes na estrutura da cadeia, que eram criados durante a polimerização, e que corresponderiam a radicais não dopados (Su *et al.*, 1979). Como mencionado anteriormente, os elétrons podem ser adicionados ou retirados à cadeia, do que resultará um sóliton carregado, mas sem spin (Zoppi e De Paoli, 1993). Logo, o trans-PAc (Fig. 5) apresenta esses defeitos neutros, mas de *spin* $\frac{1}{2}$ (como ilustrado na Figura 5 (A), ou seja,

correspondendo a um nível semipreenchido com um elétron livre no meio do *gap*), ou carregados.

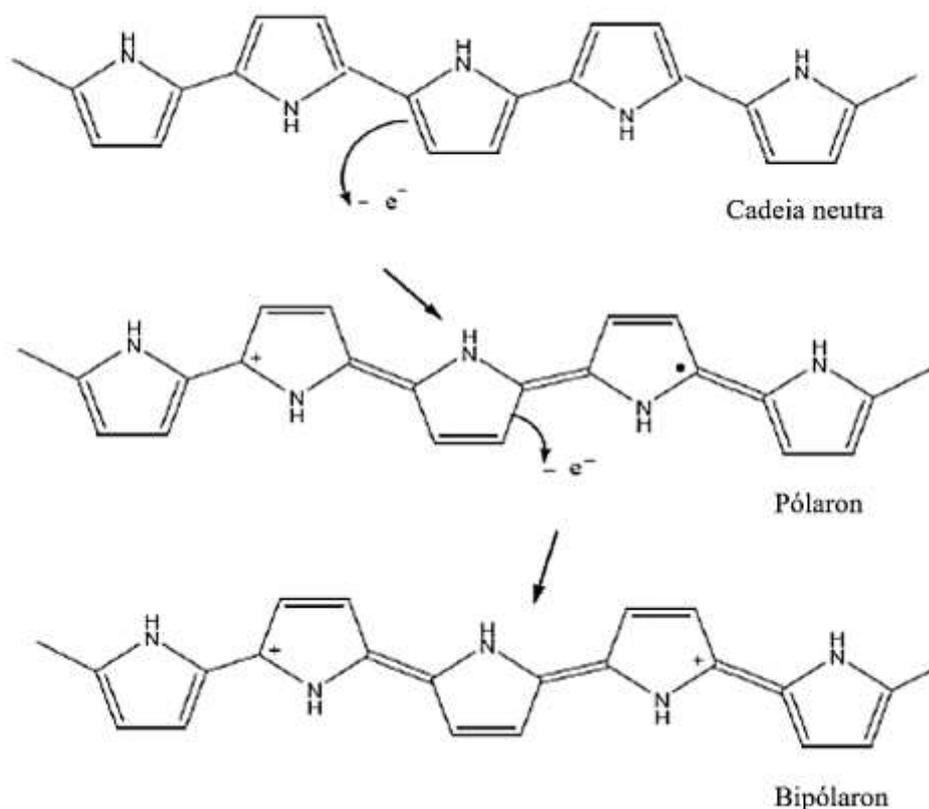
Figura 5 - Formas do sóliton no trans-poliacetileno: (A) carregado positivamente, (B) neutro e (C) carregado negativamente.



Fonte: (Zoppi e De Paoli, 1993).

Para polímeros condutores como o polipirrol, que apresentam estados fundamentais não degenerados, a modificação mais simples que poderia ser proposta seria admitir que na estrutura desses PCs haveria a interação entre dois sólitons (Melo, 1987). Dessa forma, quando um elétron é removido do topo da banda de valência do PC, cria-se uma vacância, do que resulta a formação de um cátion radical, no que foi denominado de pólaron – ou seja, um íon radical que carrega um elétron desemparelhado de *spin* $\frac{1}{2}$ e uma carga positiva sem *spin* (Bredas e Street, 1985) – produzindo uma distorção da cadeia conjugada (com o anel aromático passando da forma aromática para a forma quinóide) e o surgimento de estados localizados no *gap*. Quando há a remoção de um segundo elétron em uma cadeia que já apresenta um pólaron, ocorre então a formação de um bipólaron — par de cargas iguais, ou seja um dicátion com *spin* igual a zero, o que estaria associado a uma forte distorção da cadeia conjugada (Bredas e Street, 1985; Faez *et al.*, 2000). A formação do pólaron e do bipólaron é esquematicamente mostrada na Fig. 6.

Figura 6 - Oxidação do pirrol e formação do pólaron e bipólaron.



Fonte:(Zoppi e De Paoli, 1993).

Estudos teóricos para o caso do polipirrol mostraram que a formação do bipólaron é termodinamicamente mais favorável que a de dois pólarons, devido a um decréscimo de energia de ionização (Medeiros *et al.*, 2012). Quimicamente falando, o bipólaron é um dicátion que faz parte da estrutura polimérica, com suas cargas positivas sendo distribuídas em muitos sítios carregados ao longo da cadeia (Shirakawa *et al.*, 1977).

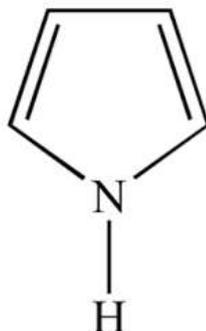
Tendo em vista a grande diversidade de polímeros condutores atualmente conhecidos, o foco do presente estudo foi direcionado para a investigação e o uso do polipirrol.

2.1.2 Polipirrol

O PPI foi sintetizado eletroquimicamente pela primeira vez em 1916 por A. Angeli e L. Alessandro, mas apenas em 1968 foi possível a descrição das suas propriedades condutoras (Dall'olio, 1968; Medeiros *et al.*, 2012). As cadeias são formadas a partir da monômeros aromáticos de pirrol (Fig. 7), ligados pelos átomos de carbono (Waltman e Bargon, 1986). Em meados de 1973 foi publicado o primeiro artigo que relatava a síntese química do PPI (Gardini, 1973), mas a partir de 1979 este polímero despertou a atenção da comunidade científica, ao

serem obtidos amostras de PPI na forma de um filme preto, resultante da eletrólise do pirrol em solventes orgânicos (Diaz *et al.*, 1981).

Figura 7 - Estrutura molecular do pirrol.



O PPI, assim como outros PCs, pode ser obtido através de vias químicas ou eletroquímicas. A primeira permite a produção em grande quantidade, na forma de pó ou dispersões coloidais, e com custo mais baixo. A síntese eletroquímica é mais voltada para a produção de filmes a serem usados em dispositivos eletrônicos, devido a sua maior condutividade, sendo porém a produção em grande escala limitada pela área do eletrodo (Nalwa, 1997; Ateh *et al.*, 2006a; Soares, 2011). Como mencionado na seção 2.1.1.1, o mecanismo de condução do PPI se baseia na criação de defeitos conformacionais do tipo pólarons e bipólarons.

Dentre os diversos PCs, o PPI corresponde a uma boa parcela das investigações atuais para o desenvolvimento a aplicações tecnológicas, por conta de suas propriedades físicas, elétricas e ópticas, e sua alta estabilidade química. Exemplos dessas aplicações são o uso em dispositivos eletrônicos, baterias, sensores de biomoléculas, engenharia de tecidos, agentes terapêuticos alternativos (Linford, 1990; Nezakati *et al.*, 2018). Arelada à sua estabilidade, o PPI tem uma boa biocompatibilidade para com diferentes biomoléculas (Gerard *et al.*, 2002), tecidos biológicos (Ateh *et al.*, 2006b) e células de mamíferos (Vaitkuviene *et al.*, 2013).

Mais recentemente, um interesse especial tem sido dedicado à síntese química de materiais polipirrólicos em sistemas nanoestruturados (Kausaite-Minkstimiene *et al.*, 2015; Wysocka-Żołopa e Winkler, 2017), objetivando a criação de nanomateriais multifuncionais que possam vir a ser utilizados para os mais diferentes propósitos, principalmente em aplicações biomédicas (Vaitkuviene *et al.*, 2013). Nesse contexto, sistemas revestidos com PPI são frequentemente utilizados tanto em imunossensores, com a funcionalização da superfície polimérica para que haja uma reação específica antígeno-anticorpo (Ramanavicius *et al.*, 2010), e na detecção de bactérias através de ligação redox entre a membrana da bactéria e o polímero

eletroativo ou polímero condutor (Li *et al.*, 2009; Löffler *et al.*, 2019), quanto em implantes neurais devido a suas propriedades de condução elétrica e características biocompatíveis, que permitem o crescimento celular normal na região do implante (Nezakati *et al.*, 2018).

Buscando melhorar as propriedades condutoras do PPI e ampliar as possibilidades de sua aplicação, tem sido ainda investigada a incorporação de outros materiais, tais como grafeno, nanotubos de carbono e nanopartículas metálicas, à sua matriz polimérica (Nezakati *et al.*, 2018). Além das modificações nas propriedades elétricas e ópticas, como já mencionado anteriormente, essas junções dos PCs com nanopartículas metálicas (Au, Ag, e Pt, entre outras) auxiliam no direcionamento da nucleação das nanopartículas, pois, ao recobri-las, os PCs evitam a agregação devido à presença de grupos funcionais específicos (NH₂) que se ligam através de atrações de van der Waals (Han, J. *et al.*, 2017).

Será analisado no decorrer da próxima seção, a utilização de Prata como precursor metálico para atuar tanto como agente oxidante do pirrol, quanto formando nanopartículas metálicas através de reações redox.

2.2 COMPÓSITO DE NANOPARTICULAS DE PRATA/POLIPIRROL

A preparação de materiais compósitos híbridos acontece pela combinação de dois ou mais materiais com fases distintas, para que se possa alcançar novas propriedades para o compósito obtido. Em especial, os metais nobres têm se mostrado mais promissores para esse tipo de aplicação (Stejskal, 2013), principalmente se em escala nanométrica (1 – 100 nm), quando podem apresentar propriedades físicas e reatividade bastante distintas, a depender do tamanho e da forma da nanoestrutura (Melo Jr *et al.*, 2012).

Nanopartículas metálicas apresentam propriedades óticas bastante diversificadas. Um exemplo que merece atenção é sua diversidade de cores, que está relacionada com as oscilações dos elétrons de condução em respeito à ressonância com a luz incidente, no que é denominado como ressonância dos plásmons de superfície (Daniel e Astruc, 2004; Carbó-Argibay *et al.*, 2007). Por sua vez, as nanopartículas de prata (AgNPs) encontram aplicações biotecnológicas, como na catálise inteligente (para células combustíveis) e no tratamento de resíduos e microrganismos (Berni Neto *et al.*, 2008), face a sua atividade antibactericida, antifúngica e antiviral (Guggenbichler *et al.*, 1999). Essas nanopartículas exibem afinidade com grupos que possuam elementos como enxofre e fósforo, como aqueles encontrados tanto nas membranas como no interior das bactérias (Berni Neto *et al.*, 2008).

A combinação de AgNPs com CPs tem atraído interesse devido aos efeitos sinérgicos correspondentes (Stejskal, 2013), tendo principalmente em vista suas propriedades ópticas. De

fato, a interação de um metal com um CP é forte, e disso podem resultar mudanças significativas nas propriedades ópticas dos compósitos formados, quando em comparação aos componentes isolados (Ye *et al.*, 2011), fazendo com tal tipo de material seja um excelente candidato para aplicações em diversas áreas, tais como eletrocatalise em diferentes meios através da transferência de carga das cadeias poliméricas para o metal, onde ocorre a reação eletrocatalítica (Gao *et al.*, 2009; Armel *et al.*, 2012), biossensores para a detecção de DNA através de atrações eletrostáticas das cargas presentes na cadeia dos CPs com grupos fosfatos (DNA de cadeia dupla) ou com grupos aminos (DNA fita simples) (Huang *et al.*, 2014; Pedro *et al.*, 2019), dispositivos para diagnósticos moleculares através oxidação da glicose, que é catalisada por nanopartículas de Au presentes no compósito com PANI (e que ao mudar seu estado de oxidação através dessa reação, serve como indicador visual (Majumdar *et al.*, 2005)), dentre outros (O'mullane *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2011).

Destacamos também que assim como as AgNPs, o PPI apresenta ação antimicrobiana, e estudos comprovam na atividade antibacteriana de compósitos AgNPs/PPI contra diferentes tipos de bactérias, em um efeito que é mais pronunciado que aquele observado quando são utilizados cada um dos componentes separadamente (Salabat *et al.*, 2017). Além disso, essa junção de polipirrol e AgNPs costuma ser empregada na degradação de poluentes, como na utilização de nanofibras de polipirrol decoradas com Ag-TiO₂ (PPI- Ag-TiO₂), que exibem um efeito fotocatalítico ao serem irradiadas com luz UV, e por isso foram aplicadas para a fotodegradação eficiente de poluentes orgânicos (Yang, Y. *et al.*, 2013). Por sua vez, nanocompósitos de Ag@PPI (núcleo@casca) foram empregados como catalisadores heterogêneos reutilizáveis para a N-alquilação de aminas com álcool, sob diversas condições de reação (Mandi *et al.*, 2016).

Em nosso grupo, foi observado que um compósito híbrido de Polianilina (PANI) e nanopartículas de ouro (AuNPs) apresentava alta intensidade de fluorescência nas regiões do azul e verde, evidenciando a existência de um efeito cooperativo entre as cadeias de PANI e as AuNPs (Santos *et al.*, 2013). Com base nesse resultado, e considerando a escassez de relatos que analisem a fluorescência em compósitos constituídos de nanopartículas metálicas e CPs, decidimos investigar inicialmente a síntese de um compósito de Ag/PPI e analisar suas propriedades fluorescentes. Aliado a isso, nos propusemos a verificar alguns aspectos de sua biocompatibilidade que pudessem direcionar uma possível bioaplicação segura para o compósito.

Para a otimização da intensidade de fluorescência do compósito, implementou-se um planejamento fatorial, de modo a ser possível avaliar a contribuição dos diferentes reagentes

para o aumento da fluorescência e sobre as demais propriedades analisadas. Na próxima seção serão discutidos os fundamentos da técnica de planejamento fatorial.

2.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Quimiometria é ciência que relaciona medidas de um sistema (ou processo químico) com o estado desse sistema através da aplicação de métodos matemáticos e estatísticos (Hibbert, 2016). Pela utilização de um planejamento experimental com base em princípios estatísticos se faz possível extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil, a partir de um número otimizado de experimentos (Antony, 2003).

Essa técnica permite a avaliação das influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interações nas respostas (Teófilo e Ferreira, 2006). Para um planejamento experimental, deve-se primeiramente escolher quais serão os fatores que serão variados e quais as respostas de interesse. São denominados como fatores aquelas variáveis que o analista tem condições de controlar, seja de um modo qualitativo ou quantitativo. Já as respostas são as variáveis de saída, ou seja, aquelas do interesse para o experimentador, e que sofrerão (ou não) mudanças através da modificação dos fatores que foram manipulados. Essas variáveis também podem ser qualitativas e quantitativas (De Barros Neto *et al.*, 2010). O termo planejamento experimental permite (Miller e Miller, 2011):

1. Identificar os fatores que podem afetar o resultado de um experimento;
2. Projetar o experimento para que a influência dos fatores não controlados seja minimizada;
3. Utilizar análise estatística para separar e calcular os efeitos dos vários fatores envolvidos.

Na otimização do planejamento experimental é preciso considerar dois estágios: (a) a triagem dos fatores que serão estudados, de modo a permitir identificar aqueles que têm efeitos significativos sobre as variáveis, e (b) a otimização, ou seja, a determinação das melhores condições analíticas para o experimento (Vera Candioti *et al.*, 2014).

2.3.1 Planejamento fatorial completo

É preciso definir um domínio experimental para cada fator, ou seja, a forma de controle e medição a ser estabelecida. Para isso, é preciso que o fator de interesse tenha pelo menos dois níveis distintos, o que costuma ser o planejamento fatorial mais simples. Em um planejamento de dois níveis é usual representar os níveis superiores e inferiores com os sinais de (+) e (-), respectivamente. Essa codificação não segue critérios definidos e a atribuição desses códigos aos níveis é realizada de forma arbitrária, de modo que essa escolha não interfere na realização

ou interpretação dos resultados do experimento (De Barros Neto *et al.*, 2010). O nível (+) pode ser representado como 1, o nível (-) como -1 e pode-se incluir também um nível 0 (zero), o ponto central, no qual todas as variáveis têm seu valor definido como a média entre o nível superior e o inferior.

Portanto, se em um experimento existem k fatores, *i.e.*, k variáveis controladas pelo experimentador, um planejamento completo de dois níveis requer a realização de $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ ensaios diferentes, no que é intitulado de planejamento fatorial 2^k (Teófilo e Ferreira, 2006; De Barros Neto *et al.*, 2010; Vera Candiotti *et al.*, 2014).

Existem três princípios que regem o planejamento experimental, conhecidos como randomização, blocagem e replicação, e que são aplicados para reduzir ou remover qualquer viés experimental que poderia ocasionar configurações experimentais erradas ou mascarar efeitos dos fatores que seriam realmente significativos (Antony, 2003).

2.3.2 Cálculo dos efeitos

Os efeitos ocorrem quando há uma mudança na resposta quando se passa do nível inferior (-) para o nível superior (+) nos fatores que estão sendo analisados. Quando ocorrem interações entre os fatores em seus níveis distintos, há o surgimento de um efeito de interação, ou seja, o efeito de um fator mostra dependência com o nível de outro fator. Os efeitos de interações são classificados como sendo de segunda, terceira ou ordem superior, a depender do número de fatores considerados na otimização (Eiras *et al.*, 2000). Fazendo a média dos efeitos de um fator nos dois níveis obtemos o efeito principal da variável em questão (Antony, 2003; De Barros Neto *et al.*, 2010).

Então, para três variáveis 1, 2 e 3, os sinais dos efeitos de interação entre a variável 1 e 2 é definido como o produto do sinal da variável 1 pelo da variável 2, e da mesma maneira para todas as demais combinações de sinais das variáveis (1 x 3, 2 x 3, 1 x 2 x 3), seguindo a regra normal da operação de multiplicação de sinais. Assim obtém-se uma matriz de coeficientes de contraste, com colunas de sinais para todas as interações de um planejamento 2^2 (Tabela 3) e para um planejamento 2^3 (Tabela 4). Nota-se que todas as variáveis são alteradas simultaneamente de maneira controlada, e isso garante que cada experimento do planejamento seja uma combinação de todos os níveis (Lundstedt *et al.*, 1998; Teófilo e Ferreira, 2006).

Tabela 3 - Matriz de coeficiente de contraste para um planejamento fatorial 2².

Nº do experimento	Variáveis		Interações entre os sinais das variáveis
	X_1	X_2	X_{12}
1	-	-	+
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	+

Fonte: Adaptado de (Teófilo e Ferreira, 2006; De Barros Neto *et al.*, 2010).

Tabela 4 - Matriz de coeficiente de contraste para um planejamento fatorial 2³.

Nº do experimento	Variáveis			Interações entre os sinais das variáveis*			
	X_1	X_2	X_3	X_{12}	X_{13}	X_{23}	X_{123}
1	-	-	-	+	+	+	-
2	+	-	-	-	-	+	+
3	-	+	-	-	+	-	+
4	+	+	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	+
6	+	-	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+

* X_1 , X_2 e X_3 são os efeitos de interação de 2ª ordem; X_{123} é o efeito de interação de 3ª ordem.

Fonte: Adaptado de: (Lundstedt *et al.*, 1998; Teófilo e Ferreira, 2006).

Em um planejamento fatorial com n ensaios e y_i observações individuais, os efeitos em cada coluna da matriz de coeficiente de contraste (conforme mostrado na Tabela 3) são demonstrados por duas equações (De Barros Neto *et al.*, 2010):

$$ef_{médio} = \frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n} \quad (\text{Eq. 1})$$

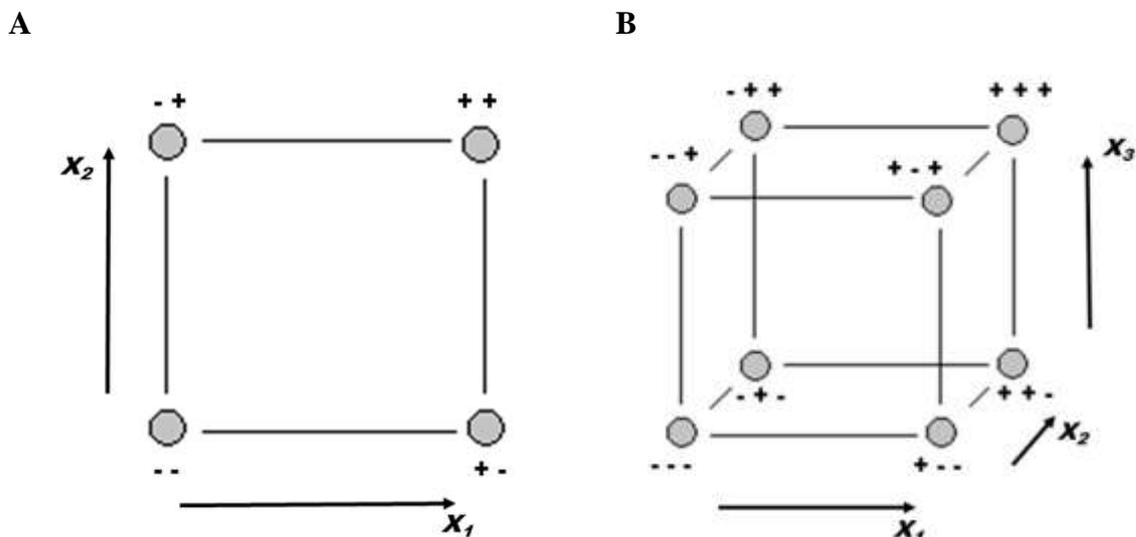
$$ef = \frac{\sum_{i=1}^n y_{i(+)} - \sum_{i=1}^n y_{i(-)}}{\frac{n}{2}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Na Eq. 1, tem-se a descrição do efeito principal, que é a média dos efeitos dos fatores nos níveis estabelecidos, enquanto que a Eq. 2 corresponde ao cálculo entre as médias das interações no nível ($y_{i(+)}$) e as médias das interações no nível ($y_{i(-)}$) (Teófilo e Ferreira, 2006; De Barros Neto *et al.*, 2010).

2.3.3 Interpretação geométrica dos resultados

A depender do número de fatores e de níveis escolhidos pelo analista, todos os efeitos calculados no planejamento fatorial podem ser interpretados geometricamente, em um sistema cartesiano, onde cada eixo representa um fator. Assim, a representação de um planejamento fatorial com dois níveis e dois fatores (planejamento 2^2) será na forma um quadrado, onde cada vértice representa a interação dos fatores nos níveis. Já para um planejamento fatorial com dois níveis e três fatores (planejamento 2^3), teremos um cubo, em que cada vértice representa as interações (Box *et al.*, 1978; De Barros Neto *et al.*, 2010), como mostrado na Fig. 8.

Figura 8 - Representação geométrica do planejamento fatorial 2^2 (A) e 2^3 (B)



Fonte: Adaptado de Lundstedt *et al.* (1998).

2.3.4 Estimativa do erro experimental e erro padrão dos efeitos

Como uma maneira de estimar o erro experimental e avaliar a significância estatística dos efeitos, a realização dos ensaios do experimento deve ser feita em replicatas, as quais devem ser repetições autênticas. Caso as repetições não possam refletir a variabilidade total do

processo, serão estimados erros menores do que os reais, o que poderia levar a serem considerados como significativos efeitos que na realidade não existem. Dessa forma, todos os experimentos e suas replicatas devem ser realizados de forma aleatória, para evitar distorções estatísticas que possam comprometer a qualidade dos resultados obtidos e dos efeitos investigados para as variáveis analisadas (De Barros Neto *et al.*, 2010).

A estimativa da variância experimental é dada pela média aritmética das variâncias observadas nos ensaios individuais. De maneira geral, se cada ensaio for repetido n_i vezes, com m ensaios diferentes, a estimativa conjunta da variância experimental é dada por

$$s^2 = \frac{v_1 s_1^2 + v_2 s_2^2 + \dots + v_m s_m^2}{v_1 + v_2 + \dots + v_m} \quad \text{Eq. 3}$$

onde $v_i = n_i - 1$ é o número de graus de liberdade de s_i^2 , que é a estimativa da variância do i -ésimo ensaio (De Barros Neto *et al.*, 2010).

Para este trabalho, uma vez calculados os efeitos estatisticamente significativos para a intensidade de fluorescência, o tamanho e potencial zeta do compósito, foram examinados tanto o grau de biocompatibilidade do compósito Ag/Polipirrol, quanto seu efeito contra células cancerígenas. Na próxima seção serão abordados aspectos da biocompatibilidade e da atividade antitumoral do CPs, AgNPs e materiais compósitos.

2.4 BIOCOMPATIBILIDADE E ATIVIDADE ANTI-TUMORAL DE POLÍMEROS CONDUTORES, NANOPARTÍCULAS DE PRATA E MATERIAIS COMPÓSITOS

Além das suas propriedades condutivas e mecânicas, os PCs mostram características que são bastantes adequadas para muitas aplicações biomédicas (Vaitkuviene *et al.*, 2013). Com isso, eles são frequentemente empregados em biossensores, devido ao fato de que as cargas presentes em sua interface facilitam a incorporação de moléculas ou biomoléculas (Kausaite-Minkstiniene *et al.*, 2015). Assim, por exemplo, estudos mostram ser possível a incorporação de eritrócitos na matriz de um eletrodo recoberto com PPI, o que possibilita sua aplicação na determinação de grupos sanguíneos através das alterações na resistência do polímero (medida por voltametria cíclica) causada pela ligação entre os grupos Rh dos eritrócitos e os anticorpos correspondentes, dando origem a um resultado positivo, como posteriormente confirmado por imunoenaios (Campbell *et al.*, 1999). A funcionalização da superfície de PPI também pode ser realizada com proteínas e polissacarídeos, do que resulta uma alta especificidade para uso como biossensores amperiométricos (Ramanavicius *et al.*, 2008; German *et al.*, 2011). Tanto de forma isolada como em conjunto com outros materiais, ou seja, na forma de compósitos, o PPI tem

sido usado em aplicações biomédicas como em sistemas de liberação de medicamentos, na engenharia de tecidos, ou imunossensores, dentre outras (Vaitkuviene *et al.*, 2013).

Essa larga gama de aplicações biológicas acontece devido a diferentes aspectos da biocompatibilidade do PPI, devidamente estudados de forma *in vitro* e *in vivo* (Wang *et al.*, 2004; Ateh *et al.*, 2006b). Estudos *in vitro* demonstram que o polipirrol permite a adesão e o crescimento de vários tipos de células, incluindo células neurais (Lakard *et al.*, 2004), endoteliais (Garner *et al.*, 1999), musculares (Gilmore *et al.*, 2009) e células troncos (Lundin *et al.*, 2011). Isso torna o cultivo celular uma ferramenta valiosa para testar a biocompatibilidade *in vitro* de materiais contendo PPI, antes de que possam vir a ser introduzidos no uso clínico.

Nos dias de hoje, os métodos de ensaios *in vitro* de biomateriais ganharam relevância devido à crescente preocupação com o uso de animais para testes de medicamentos. Esses ensaios vão desde estudos da citotoxicidade e citocompatibilidade até a investigação de sua ação contra células neoplásicas. Os PCs são moléculas orgânicas conjugadas que estão sendo aplicadas no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de câncer devido a sua biodegradabilidade, boa compatibilidade, excelente fotoestabilidade e alta conversão fototérmica – essas últimas características bastante importantes para a utilização dos PCs como agentes na terapia fototermal — emprego da radiação no infravermelho próximo (do inglês *near-infrared* ou NIR) para geração de calor através da conversão da energia luminosa em energia térmica, o que acaba matando as células cancerosas (Xu *et al.*, 2014).

Nesse contexto, nanopartículas de PPI foram identificadas como um novo agente terapêutico promissor na ação direcionada contra células cancerígenas (Zha *et al.*, 2013), e AgNPs foram utilizadas tanto para o diagnóstico e a para terapia de neoplasias (De Matteis *et al.*, 2018). Por sua vez, os materiais compósitos que combinam nanopartículas metálicas e polímeros condutores têm se mostrado bastante promissores para o desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas, por permitir a exploração da fotoabsorção atenuada das nanopartículas devido à ressonância dos plásmon de superfície (Jain *et al.*, 2008); Já os PCs adicionam a esses compósitos a biocompatibilidade, o que favorece o crescimento de células de mamíferos sem alterar o sistema imune (Stewart *et al.*, 2012; Vaitkuviene *et al.*, 2013) e a capacidade de absorção de radiação no NIR, favorecendo assim sua aplicação para o tratamento fototermal (Yang, K. *et al.*, 2013; Zha *et al.*, 2013).

O recobrimento de nanopartículas de ouro com PANI aumenta a entrega de elétrons do metal para o polímero, fazendo com que a PANI mude de estado de oxidação de base esmeraldina para sal esmeraldina, e isso melhora sua fotoabsorção, aumentando assim as possibilidades de sua utilização no tratamento fototermal de células neoplásicas (Ju *et al.*,

2015). Muitos trabalhos utilizam nanopartículas magnéticas (compostos de Ferro), como núcleo, revestidas por cadeias de PPI, que apresentam capacidade de serem usadas no diagnóstico como agentes de contraste para ressonância magnética; ao mesmo tempo, foi observado que seu efeito terapêutico contra o câncer era aumentado após sua exposição à radiação de um laser no infravermelho próximo, que gera hipertermia nas células cancerosas (Wang *et al.*, 2013; Han, L. *et al.*, 2017).

Assim, existe um interesse pela investigação de novos materiais que possam atuar tanto como agentes terapêuticos alternativos quanto no diagnóstico de doenças como o câncer (Xu *et al.*, 2019), dando origem a uma área de estudo chamada de Teranóstica, que visa a obtenção de plataformas terapêuticas e diagnósticas aliadas para uma medicina mais personalizada e eficaz (Jin *et al.*, 2010). O câncer é uma patologia que possui altos índices de prevalência, com a grande incidência de novos casos podendo estar atrelada a predisposições genéticas e a hábitos de vida, o que torna este tópico bastante relevante (Ferlay *et al.*, 2019). Na seção seguinte, será apresentada uma revisão sobre as estimativas do câncer em termos de incidência e prevalência.

2.5 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER

Foi estimado que em 2015 o câncer seria a primeira causa de morte antes dos 70 anos em 91 países, e que ocuparia o terceiro lugar em outros 22 países, caracterizando-se assim como um importante problema de saúde pública de ordem global (Who, 2018). Acredita-se que o câncer venha a ser também a principal causa de morte e a única barreira para o aumento na expectativa de vida em todos os países do mundo no século XXI (Bray *et al.*, 2018).

Embora a incidência e mortalidade por câncer esteja crescendo rapidamente em todo o mundo, as razões para isso são muito complexas, ao refletir tanto o envelhecimento progressivo da população quanto o crescimento, quanto possíveis mudanças na prevalência e distribuição dos principais fatores de risco (Omran, 1971; Gersten e Wilmoth, 2002). O Ministério da Saúde implementou 16 objetivos estratégicos para enfrentar o aumento da incidência de câncer no Brasil, dos quais merecem destaque as ações de ampliação de acesso ao diagnóstico e tratamento e a redução dos fatores de risco (Facina, 2014).

De fato, a ocorrência de câncer nas populações é multifatorial, o que contribui para os altos índices de incidência e prevalência. Dentre os principais fatores de risco relacionados aos mais variados tipos de câncer destacam-se o uso de tabaco e álcool (Iarc *et al.*, 2004; Iarc, 2010), uma dieta não balanceada (Armstrong e Doll, 1975; Grant, 2014; Bouvard *et al.*, 2015), radiação (Iarc, 2012), a exposição em excesso à luz solar (Hrushesky *et al.*, 2005; Fleischer,

2016), a obesidade (Lauby-Secretan *et al.*, 2016) e a ação de agentes infecciosos (Bouvard *et al.*, 2009).

O Instituto Nacional de Câncer estima que no biênio 2018-2019 venham a ocorrer mais de 764 mil novos casos da doença, como câncer de próstata, mama, colón e reto, pulmão, estômago, leucemia, esôfago, linfoma Hodgkin e não Hodgkin, tireoide, bexiga, laringe, ovário, pele, infanto-juvenil, sistema nervoso central e colo de útero. É previsto que até o final de 2019 surjam 16.370 novos casos do câncer de colo de útero, representando um risco de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres, o que faz com que esse tipo de câncer passe a ocupar a segunda posição (Tabela 5) no ranking de neoplasias malignas mais frequentes no país (Silva, 2017).

Tabela 5 – Estimativa das taxas de incidência brutas e ajustada de novos casos de câncer, no Brasil, para 100 mil habitantes.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Próstata	68.220	66,12	67,82	15.720	70,76	66,31	-	-	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	-	-	59.700	56,33	51,29	19.920	80,33	63,98
Colo do Útero	-	-	-	-	-	-	16.370	15,43	17,11	4.620	18,66	17,58
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	18,16	16,97	4.520	20,33	21,05	12.530	11,81	9,22	3.710	15,06	11,44
Cólon e Reto	17.380	16,83	20,03	5.630	25,34	25,16	18.980	17,90	18,40	6.820	27,49	20,84
Estômago	13.540	13,11	14,98	3.240	14,55	10,95	7.750	7,32	5,96	2.210	8,92	5,34
Cavidade Oral	11.200	10,86	11,22	2.770	12,38	12,03	3.500	3,28	2,86	1.010	3,89	2,80
Laringe	6.390	6,17	6,31	1.540	6,86	8,44	1.280	1,20	0,96	420	1,30	0,92
Bexiga	6.690	6,43	7,79	1.920	8,59	9,20	2.790	2,63	2,21	890	3,42	2,61
Esôfago	8.240	7,99	6,73	1.450	6,46	7,04	2.550	2,38	1,67	540	1,85	1,38
Ovário	-	-	-	-	-	-	6.150	5,79	4,80	2.140	8,46	6,54
Linfoma de Hodgkin	1.480	1,43	1,14	550	2,19	1,93	1.050	0,96	0,92	400	1,33	1,19
Linfoma não Hodgkin	5.370	5,19	5,42	1.480	6,59	6,81	4.810	4,55	4,19	1.520	6,10	5,44
Glândula Tireoide	1.570	1,49	1,50	500	1,87	1,76	8.040	7,57	5,88	2.490	10,01	7,02
Sistema Nervoso Central	5.810	5,62	5,49	1.340	6,10	6,55	5.510	5,17	5,17	1.400	5,63	4,70
Leucemias	5.940	5,75	5,51	1.480	6,69	6,58	4.860	4,56	4,29	1.190	4,72	4,59
Corpo do Útero	-	-	-	-	-	-	6.600	6,22	5,44	2.370	9,46	7,46
Pele Melanoma	2.920	2,82	2,69	800	3,34	3,31	3.340	3,16	2,15	880	3,42	2,74
Outras Localizações	41.480	40,17	35,26	9.470	42,62	43,45	36.230	34,17	29,04	8.920	36,00	28,39
Todas as Neoplasias, exceto Pele não Melanoma	214.970	208,32	217,27	52.410	235,91	226,91	202.040	190,61	191,78	61.450	247,95	199,05
Pele não Melanoma	85.170	82,53	-	17.020	76,60	-	80.410	75,84	-	17.230	69,60	-
Todas as Neoplasias Malignas	300.140	290,86	-	69.430	312,52	-	282.450	266,47	-	78.680	317,47	-
Todas as Neoplasias Malignas Corrigidas para Sub-Registro	324.580	314,55	-	-	-	-	310.300	292,74	-	-	-	-

^a População padrão mundial em 1960. / *Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: (Silva, 2017).

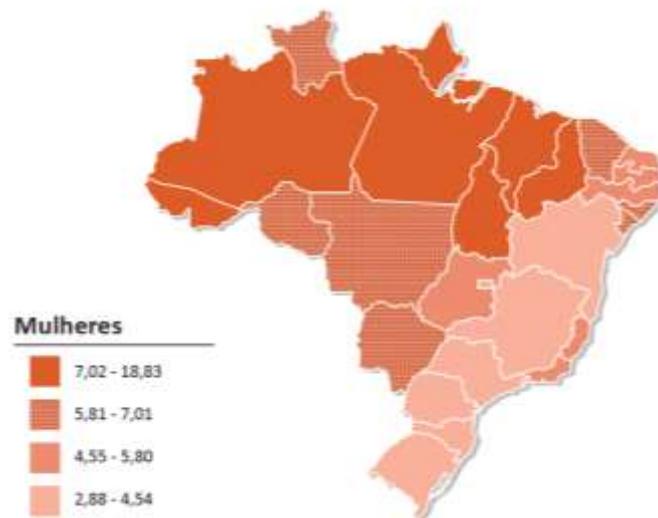
2.5.1 Câncer de colo de útero

De maneira geral, o câncer do colo do útero, ou câncer cervicouterino (CC), é uma patologia (entendida como qualquer desvio anatômico e/ou fisiológico, em relação à

normalidade, que constitua uma doença) na qual as células do corpo se multiplicam indefinidamente. O aumento da morbimortalidade relacionada ao CC nos países em desenvolvimento é atribuído à desinformação e à deficiente cobertura de saúde pública (Pinho e França-Júnior, 2003; Da Silva *et al.*, 2004). O câncer cervical é o segundo tipo de neoplasia maligna mais comum entre mulheres no mundo, com aproximadamente 500 mil novos casos por ano, sendo responsável pelo óbito de mais 230 mil mulheres a cada ano no mundo (Silva, 2017).

A incidência do CC na população brasileira tem chamado a atenção dos gestores de saúde. Sem considerar outras neoplasias malignas comuns a homens e mulheres, como o melanoma, o CC é o primeiro tipo de câncer de maior incidência na Região Norte, o segundo nas Regiões Nordeste e Centro-Oeste e o quarto nas Regiões Sul e Sudeste (Fig. 9) (Silva, 2017), com a maioria dos casos (70%) ocorrendo em áreas com menores índices de desenvolvimento humano (Ferlay *et al.*, 2015).

Figura 9 - Representação espacial de taxas ajustadas de incidência de câncer de colo de útero por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2018.



Fonte: (Silva, 2017).

O câncer do colo do útero se inicia por uma lesão pré-invasiva, passível de tratamento e cura na totalidade dos casos. Não detectada, porém, essa doença progride de forma lenta e silenciosa por até 20 anos, podendo assim atingir a forma invasiva, fase em que há diminuição das chances de cura (Pimentel *et al.*, 2011). Um dos principais fatores de risco para a ocorrência do CC, e sua conseqüente evolução para a forma invasiva, é a existência de infecção pelo Vírus

do Papiloma Humano (HPV), cuja transmissão, que ocorre principalmente pelo contato sexual, pode estar relacionada com os estágios iniciais dessa neoplasia (Lepique *et al.*, 2009).

A maioria das mulheres acometidas por CC inicia a busca por assistência multiprofissional de saúde apenas quando aparecem os primeiros sintomas da doença, como a ocorrência de um brando sangramento inicial com aumento progressivo, por exemplo, durante a relação sexual. Em alguns casos a lesão cervical resulta em hemorragia, tornando necessária uma intervenção hemoterápica, com a administração de bolsas de sangue. Somada a estes sintomas, a lesões na bexiga têm sido frequentemente associadas à lesão cervical (Pimentel *et al.*, 2011).

O diagnóstico do CC pode ser realizado através do exame clínico, da colposcopia, patologia e citologia clínica (Carvalho *et al.*, 2006). A colposcopia, que consiste na análise criteriosa do colo uterino e da vagina pelo uso de lentes de aumento, tem por objetivo a visualização de lesões que antecedem o câncer (Fig. 10), possibilitando uma intervenção antes da progressão da doença (Maia *et al.*, 2018).

Figura 10 - Lesões de colo de útero relacionadas ao CC.



Fonte: (Schiffman *et al.*, 2007).

Juntamente com o exame clínico e a colposcopia, a citologia clínica (ou citopatologia) é utilizada para o diagnóstico do CC. Este exame, popularmente conhecido como Papanicolau, consiste na coleta de células do colo do útero com o objetivo de identificar alterações na morfologia celular sugestivas de acometimento neoplásico. Após a realização da colposcopia, as pacientes são encaminhadas para a realização do exame citopatológico, quando então se faz possível o diagnóstico final. O diagnóstico precoce, seguido de um tratamento inicial, está relacionado a um aumento dos casos de cura, com a eliminação das células cancerosas (Sousa *et al.*, 2018).

O tratamento da neoplasia maligna cervical é realizado inicialmente por meio de intervenção cirúrgica, que consiste na ressecção da área cancerosa e adoção de margens de

segurança de 2 cm (Rodrigues *et al.*, 2018). Nos casos avançados, o tratamento é realizado a partir da combinação de radioterapia e quimioterapia, podendo ou não haver intervenção invasiva. Quando estas formas de tratamento não são suficientes para a reversão do quadro neoplásico, cuidados paliativos devem ser tomados visando o bem estar da paciente (Soares e Riul Da Silva, 2010).

O tratamento bem-sucedido do câncer ainda é um desafio para pesquisadores e profissionais da saúde em todo o mundo devido à complexidade da doença e a contribuição de múltiplos fatores associados para sua progressão. Terapias convencionais (cirurgia, quimioterapia e radioterapia) acabam encontrando limitações, como a ressecção incompleta do tecido canceroso, uma alta toxicidade sistêmica ou a resistência a múltiplas drogas (Peer *et al.*, 2007). Considerando as vantagens e desvantagens de diferentes estratégias terapêuticas, a ideia de combinar várias abordagens de tratamento se faz atraente para o desenvolvimento de uma nova geração de terapias anticâncer, que apresentem boa adesão por parte do paciente, baixo efeitos colaterais reduzidos e uma alta eficácia (Tian *et al.*, 2011). Neste contexto, são movidos esforços para a criação de biomateriais multifuncionais que possam ser seguros e venha a ter tanto uma função terapêutica quanto de imageamento da região atingida pelo câncer (Feng *et al.*, 2015).

A quimioterapia contra o CC consiste no uso de diferentes fármacos. Em um estudo realizado por Soares e Riul Da Silva (2010), os medicamentos utilizados por 321 pacientes diagnosticadas com neoplasia invasiva cervical foram a ciclofosfamida, a cisplastina, o epirrubicina, o etoposide, o bleomicina e o 5-fluoracil. No entanto, estes fármacos apresentam efeitos adversos associados com sua utilização, e na literatura tem sido reportada a ocorrência de forma extensiva de efeitos colaterais indesejáveis, tais como mielossupressão, alterações gastrointestinais, cardíacas e pulmonares (Fernandez *et al.*, 2018).

Por exemplo, a toxicidade de um dos medicamentos amplamente utilizados na terapia anticâncer, o 5-fluoracil (5-FLU), está relacionada com a ruptura do metabolismo dos ácidos nucleicos em células não neoplásicas, evidenciando assim uma baixa seletividade da droga frente ao alvo terapêutico. O 5-FLU é convertido nos seus intermediários 5-fluoro-2-desoxiuridina-5-monofosfato e 5-fluoridina trifosfato, que inibem a timidilato sintase, afetando assim a produção de timina e, conseqüentemente, a síntese de ácidos nucleicos. Essas reações adversas resultam em mais de 1300 mortes a cada ano associadas ao tratamento com 5-FLU (Baldeo *et al.*, 2018).

Diante desse quadro, a preparação e caracterização de materiais compósitos se configura como um passo inicial para a obtenção de novos recursos terapêuticos alternativos

para doenças como o câncer. Nesse contexto, investigar os fatores de biocompatibilidade desses compósitos reforça ainda mais seu potencial para aplicações clínicas com baixa toxicidade, ampliando assim sua atividade antitumoral seletiva comprovada, que é já bastante promissora. Assim, na próxima seção serão apresentadas as metodologias de síntese, caracterização e dos ensaios de citotoxicidade e antitumoral do compósito de Ag/PPi.

3 METODOLOGIA

Para a otimização das propriedades físico-químicas dos compósitos híbridos de Ag/Polipirrol, implementamos um planejamento fatorial em que as concentrações dos reagentes utilizados na síntese foram variadas de maneira controlada e as respostas correspondentes ao produto da reação devidamente monitoradas. O delineamento experimental propôs uma relação entre as medidas de fluorescência do compósito, e de seu potencial zeta e tamanho, para obter a melhor resposta dentro do conjunto de modificações propostas. O compósito foi caracterizado por medidas de espectroscopia de UV-Vis e infravermelho (FTIR) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Finalmente, foram realizados os ensaios de biocompatibilidade do compósito frente a diferentes tipos de células de mamíferos, testes de sua ação antitumoral em células de câncer cervical humano (HeLa) e uma análise da morfologia das células tumorais tratadas com diferentes concentrações do compósito.

3.1 PLANEJAMENTO FATORIAL 2³

Foram implementadas variações das concentrações dos reagentes 3-mercaptopropil trimetoxissilano (MPTS), pirrol e nitrato de prata (AgNO_3), onde para cada reagente foram atribuídos dois níveis, relativos à menor (-) e à maior (+) concentração escolhida, como disposto na Tabela 6. No planejamento fatorial, todas as combinações dos dois níveis com os três fatores são testadas (Tabela 7), do que resultaram 8 experimentos possíveis, que foram então realizados em duplicata. A escolha dos níveis dos fatores foi baseada no procedimento proposto por Andrade *et al.* (2011), com algumas modificações no que concerne ao tipo de monômero e agente metálico utilizados para a obtenção do compósito Ag/Polipirrol.

Os dados coletados nas medidas de cada experimento e suas respectivas replicatas, foram então submetidos a uma análise estatística pelo uso do software Statistica 10 (Statsoft, EUA), o que permitiu obter a matriz de coeficiente de contraste (Tabela 7), a estimativa dos efeitos, a estimativa do erro, e os gráficos de Pareto e sua interpretação geométrica. Uma vez coletados os dados foi possível a realização de uma análise estatística para a determinação dos efeitos das concentrações dos reagentes nos dois níveis escolhidos. Com isso, foi identificado no gráfico de Pareto correspondente quais das variáveis apresentavam influência estatística

significativa, dentro de um intervalo de confiança de 95% da distribuição t de *Student* (Wilkinson, 2006; De Barros Neto *et al.*, 2010).

Um gráfico de Pareto mostra através de uma linha vertical vermelha (para $p = 0,05$; correspondente ao valor t de *Student* tabelado) o valor mínimo dos efeitos estatisticamente significativos (isto é, apenas aqueles efeitos cujo valores estão à direita da linha vermelha são de fato significativos). Os valores dos efeitos de cada variável e das respectivas interações estão apresentados à direita de cada barra. Um efeito que apresenta valor positivo mostra que o uso da variável no nível superior (+) resulta em um ganho positivo para a variável resposta, enquanto que um efeito negativo mostra que a variável utilizada em um nível inferior (-) deverá apresentar uma melhor resposta.

Tabela 6 - Fatores e níveis adotados no planejamento para a síntese do compósito de Ag/Polipirrol.

Fatores	Níveis de concentração utilizados [mol/L]	
	-	+
MPTS	$1,6 \times 10^{-2}$	$2,7 \times 10^{-2}$
Pirrol	$1,4 \times 10^{-2}$	$3,0 \times 10^{-2}$
AgNO ₃	$3,6 \times 10^{-5}$	$8,1 \times 10^{-5}$

Tabela 7 - Matriz de coeficiente de contraste do planejamento 2³ para a síntese do compósito Ag/Polipirrol.

Experimento	MPTS	Pirrol	AgNO ₃
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

3.1.1 Síntese do compósito Ag/Polipirrol

Através de um planejamento fatorial para a síntese química de um compósito de polianilina e nanopartículas de ouro, foi verificado que a ocorrência de efeitos cooperativos entre as cadeias poliméricas condutoras e as partículas metálicas dominava o comportamento da emissão de fluorescência desse tipo de material (Santos *et al.*, 2013).

O compósito Ag/Polipirrol foi sintetizado via oxidação química *in situ* do pirrol com base em uma dispersão coloidal de nanopartículas de prata e MPTS ((3-mercaptopropil) trimetoxissilano) em etanol. Para isso, foi utilizado um balão de fundo redondo contendo 10 mL de etanol P.A (C₂H₅OH – Química Moderna, Brasil), ao qual foram adicionados o nitrato de prata AgNO₃ 99% (Sigma-Aldrich, USA), Pirrol 98% (C₄H₅N - Sigma-Aldrich, USA) e MPTS 95% (HS(CH₂)₃Si(OCH₃)₃ - Sigma-Aldrich, USA), respectivamente, nas quantidades listadas na Tabela 6. Com exceção do pirrol, que foi destilado a vácuo antes do manuseio, todos os demais reagentes foram usados como recebidos. As concentrações dos reagentes obedeceram ao prescrito no planejamento fatorial discutido anteriormente. A mistura reacional, após ser mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente e na ausência de luz por 48 horas, foi armazenada para a obtenção do compósito.

O mecanismo de formação do compósito se dar através da oxidação dos monômeros de pirrol pela prata (Oliveira e Camilo, 2019) (ver Anexo A) pode ser entendido como compreendendo 5 etapas. Primeiramente, ocorre a oxidação do pirrol por Ag⁺, levando à produção do cátion radical (1) e de prata metálica (Etapa a). Em seguida, o cátion radical pirrólico é inserido na molécula do monômero neutro (Etapa b). Na etapa seguinte, o dímero (2) é oxidado pelo cátion de Ag⁺, dando origem a um dicátion (3) (Etapa c), com a desprotonação do bipirrol (4) formado (Etapa d). Finalmente, o bipirrol é oxidado pelos íons Ag⁺, resultando em um cátion radical bipirrólico (5) (Etapa e). A partir disso, então, o processo é repetitivo para esse cátion radical (5), com a ocorrência dos passos (b), (c) e (d) por inúmeras vezes, levando à formação do polipirrol. É importante ressaltar que a oxidação do bipirrol ou sem oligômeros pela Ag⁺ se dá mais facilmente do que no pirrol, devido ao alto potencial de oxidação desse cátion (Li, 1997). Esse mecanismo de polimerização do pirrol foi proposto tendo como base o trabalho de Tan e Ghandi (2013).

3.1.2 Métodos de caracterização

3.1.2.1 Espectroscopia de absorção na região do UV-Vis

Os espectros de absorção na região do UV-Vis das soluções diluídas (5:1000 v/v) foram obtidos no intervalo de 190 nm a 800 nm, com a utilização de uma cubeta de quartzo com percurso óptico de 1,0 cm, em um espectrofotômetro UV-2600 (Shimadzu, Japão).

3.1.2.2 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas em um espectrofotômetro 4600 (Jasco Corporation, Japão), com resolução de 4 cm^{-1} , em um intervalo de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , equipado com acessório Pro One de Reflexão Atenuada (ATR), usando um cristal de ZnSe, com ângulo de incidência central de 45° e uma área de contato circular de $4,9\text{ mm}^2$.

3.1.2.3 Espectroscopia de fluorescência

As medidas de fluorescência de emissão na faixa de 300 nm – 600 nm do compósito Ag/Polipirrol foram realizadas usando um espectrofotômetro de fluorescência FluoroLog-3 (Horiba, EUA), com varreduras na faixa de comprimentos de onda de excitação 290 nm – 400 nm. As fendas de excitação e emissão tiveram abertura de 2 mm, e as varreduras foram efetuadas com passo de 5 nm. Para isso, foram utilizadas cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico, com as medidas sendo coletadas à temperatura ambiente ($T=23^\circ\text{C}$).

3.1.2.4 Determinação do tamanho de partícula e do potencial zeta

O tamanho médio e o potencial zeta (ζ) do compósito Ag/Polipirrol foram determinados no equipamento Zetasizer NANO-2590 (Malvern Instruments, Reino Unido). Para obter o tamanho médio do compósito, foram feitas medidas de espalhamento de luz dinâmico, com um laser ($\lambda = 633\text{ nm}$) sob ângulo de espalhamento de 90° e temperatura de 25°C . Os valores de potencial zeta ζ foram obtidos pela medida da mobilidade eletroforética.

3.1.2.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As micrografias de transmissão para visualização das nanoestruturas do compósito Ag/Polipirrol foram obtidas pelo uso de um microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai Spirit 120 kV (FEI, EUA). Para isso, as amostras foram antes depositadas sobre uma grade de cobre 400 mesh, revestida com carbono.

3.2 ENSAIOS DE BIOCOMPATIBILIDADE

3.2.1 Atividade hemolítica *in vitro*

O teste hemolítico foi realizado em amostras de sangue humano (A, B, O e AB), seguindo as recomendações éticas da legislação vigente (CAAE: 06959119.8.0000.5048), e de acordo com o protocolo proposto por Yang *et al.* (2005). As suspensões de hemácias de cada tipo sanguíneo foram preparadas em uma solução de NaCl 0,9 %, sendo em seguida separadas alíquotas de 500 µL dessa suspensão, que seguiram para incubação na ausência e na presença de diferentes concentrações do compósito de Ag/Polipirrol (31,2 a 500 µg/mL), por 30 minutos a 37 °C.

Utilizamos como controles positivos e negativos, respectivamente, os resultados das hemácias em suspensão de Triton X-100 (que causa 100% de hemólise através da ruptura das membranas lipídicas das hemácias) e em solução salina (NaCl 0,9% - que mantém o equilíbrio osmótico e não rompe a membrana da hemácia). O resultado foi estabelecido a partir da determinação da porcentagem de hemólise correspondente relativa a aquela do controle positivo (100%) e do controle negativo (0%), sendo todos os ensaios realizados em triplicatas. O percentual de hemólise foi calculado na forma

$$\text{Percentual de hemólise} = \frac{A_S - A_N}{A_P - A_N} \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

onde A_S , A_P e A_N são as absorbâncias da amostra, do controle positivo e do controle negativo, respectivamente.

3.2.2 Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados conforme descrito na literatura (Aranda-Souza *et al.*, 2018), mas com algumas modificações relativas ao tipo de macrófagos e às soluções usadas para a solubilização. Para a análise da citotoxicidade foram escolhidos três modelos celulares: o macrófago J774 (ATCC® TIB-67™), células Vero (ATCC® CCL-81™) e fibroblastos (ATCC® PCS-201-012™). Tais modelos celulares são amplamente utilizados para avaliar a citotoxicidade de novos materiais ou moléculas, devido à possibilidade de sua interação com compostos candidatos ao uso na terapia de doenças. Os macrófagos, células do sistema de defesa, são responsáveis pela fagocitose de antígenos que não sejam próprios do organismo, enquanto que as células VERO são células epiteliais renais e os fibroblastos são células primárias da pele. Os macrófagos são células que atuam em nível sistêmico, enquanto

a célula VERO está localizada nos rins, órgãos responsáveis pela excreção de metabólitos passíveis de toxicidade; por sua vez, os fibroblastos se relacionam ao tratamento tópico de qualquer candidato a agente terapêutico.

As células Vero e J774 foram plaqueadas (na concentração de 5×10^5 células por poço) em uma placa de 96 poços contendo 100 μL de meio de cultura RPMI – sistema tampão contendo aminoácidos e vitaminas que nutrem as células (Moore e Woods, 1977) – suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF), e foram incubadas por 3 horas a 37 °C em uma atmosfera de 5% de CO_2 , para que ocorresse a adesão no poço. Para os fibroblastos foi realizado o mesmo procedimento, mas usando DMEM – sistema composto de aminoácidos, vitaminas e glicose (Sigma-Aldrich, USA) – como meio de cultura, com a adição de 10 % de SBF.

Após o período de adesão, as células foram lavadas com o meio de cultura, sendo em seguida realizado o tratamento com diferentes concentrações do composto Ag/Polipirrol (31,2 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 horas. Após o período de incubação, foi substituído o meio de cultura por uma solução de MTT a 0,5 mg/mL com 100 μL por poço. O MTT é um teste colorimétrico, que uma vez em contato com as enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria celular, formam-se cristais purpuras de Formazan. Uma vez solubilizados, esses cristais resultantes serão então o indicativo de viabilidade celular.

A placa foi incubada por 3 horas, a 37 °C com atmosfera de 5% de CO_2 , para a formação dos cristais de Formazan. Uma vez verificada a ocorrência da reação, os cristais de Formazan foram solubilizados através de uma solução de isopropanol com 1% de HCl. O produto colorimétrico foi então submetido a uma análise espectrofotométrica no comprimento de onda de 570 nm (Bio-Rad®, Califórnia, EUA). Foram realizados dois experimentos independentes desse tipo, em quadruplicata.

3.2.3 Atividade antitumoral *in vitro*

A atividade antitumoral *in vitro* do composto Ag/Polipirrol foi avaliada através do estudo da viabilidade de células de câncer cervical humano (HeLa) em sua presença, seguindo o protocolo estabelecido na literatura, com algumas modificações (concentração de células por poço e solução de solubilização dos cristais de Formazan) (Han, L. *et al.*, 2017). As células HeLa foram cultivadas em meio de cultura DMEM com 10 % de SBF e plaqueadas em uma concentração de 5×10^5 células por poço, em uma placa de 96 poços, que foi em seguida incubada por 24 horas (37 °C, 5% de CO_2) para a adesão das células no fundo dos poços. Após

o período de adesão, foi adicionado o compósito de Ag/Polipirrol em diferentes concentrações (31,2 a 500 µg/mL), e as placas seguiram para para incubação.

Células que não receberam tratamento foram consideradas como grupo controle. Após o período de 24 horas, foi realizado o ensaio do MTT (teste colorimétrico que indica a viabilidade celular), que consistiu na substituição do meio de cultura por 100µL de solução de MTT a 0,5 mg/mL, seguida de incubação por 3 horas para formação dos cristais de Formazan. Posteriormente, foram realizadas as medidas de absorbâncias do conteúdo dos poços. Mais uma vez, foram efetuados dois experimentos independentes desse tipo, em quadruplicata.

3.2.4 Análise estatística do ensaio de biocompatibilidade e da atividade tumoral *in vitro*

Os valores das absorbâncias coletadas, tanto no ensaio de biocompatibilidade quanto no teste antitumoral *in vitro*, foram analisados pelo uso do programa SPSS 18.0 (IBM, EUA), pela avaliação da regressão linear e determinação da concentração citotóxica de 50 % (CC₅₀), aquela para a qual a viabilidade celular é reduzida em 50%. A significância foi definida a partir de valores de $p < 0,05$, no qual foram considerados o teste de ANOVA e o Pós-teste de Dunnett no GraphPadPrism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA).

3.2.5 Ensaio ultraestrutural

A análise ultraestrutural foi feita pela coleta de imagem na realização de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das células HeLa tratadas com os valores da 0,5x CC₅₀, 1x CC₅₀ e 2x CC₅₀ por 24 horas. Após o tratamento com o compósito, as células foram lavadas com tampão de fosfato a 0,1 M e pH 7,2, sendo posteriormente fixadas durante 2 h com solução de 2,5% glutaraldeído/4% paraformaldeído em 0,1 M de tampão de fosfato à pH 7,2, e deixadas para aderir em lamínulas de vidro com poli-L-lisina. A pós-fixação foi feita pelo uso de uma solução de 1% de tetróxido de ósmio/0,8% ferricianeto de potássio/5 mM CaCl₂ na solução tampão a 0,1 M de cacodilato em pH 7,2 por um período de 1 h, e posterior desidratação em concentrações crescentes de etanol. As amostras foram então secas em dióxido de carbono (CO₂), e recobertas com uma camada de ouro com 20 nm de espessura para a captura das imagens no Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL T-200, Japão).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

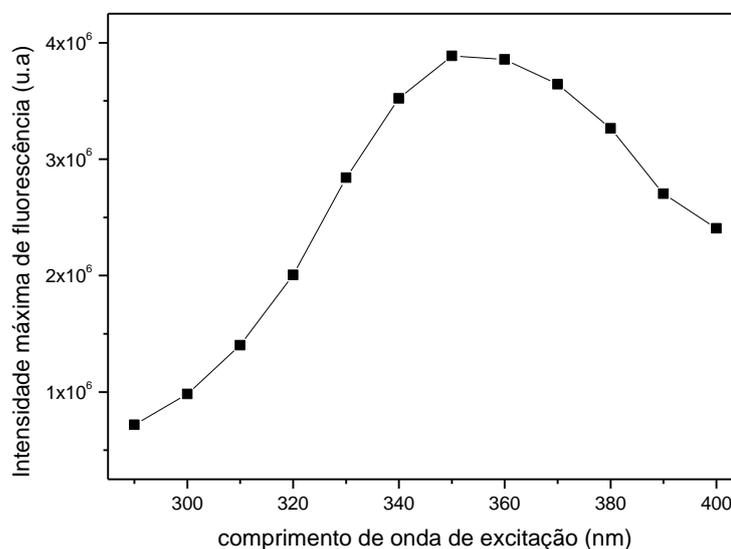
4.1 PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3

4.1.1 Medidas de espectroscopia de fluorescência

A fluorescência do compósito Ag/Polipirrol foi investigada tendo em vista resultados na literatura recente indicando que a sinergia da interação entre as cadeias de polímeros condutores (PANI) e nanopartículas de ouro resultava em uma intensificação da emissão de fluorescência do compósito (Santos *et al.*, 2013). Diante disso, a intensidade de fluorescência do compósito Ag/Polipirrol foi analisada para avaliar se esse efeito estaria presente em outros compósitos de PCs e nanopartículas metálicas, em que outros componentes (no caso, o Polipirrol e nanopartículas de prata) fossem usados.

Para isso, as medidas de fluorescência foram realizadas para todas as amostras de compósito Ag/Polipirrol obtidos através do planejamento fatorial especificado na Seção 3.3.3, que apresentaram o mesmo comportamento de emissão quando variados os comprimentos de onda de excitação (290 – 400 nm). A varredura em diferentes comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) foi feita para determinar para qual o maior comprimento de onda ocorreria a maior emissão do compósito (Fig. 11), foi possível observar que a intensidade de fluorescência do compósito apresentaram emissão dependente do comprimento de onda, com a maior intensidade de fluorescência sendo observada para o espectro de emissão resultante da excitação em 350 nm.

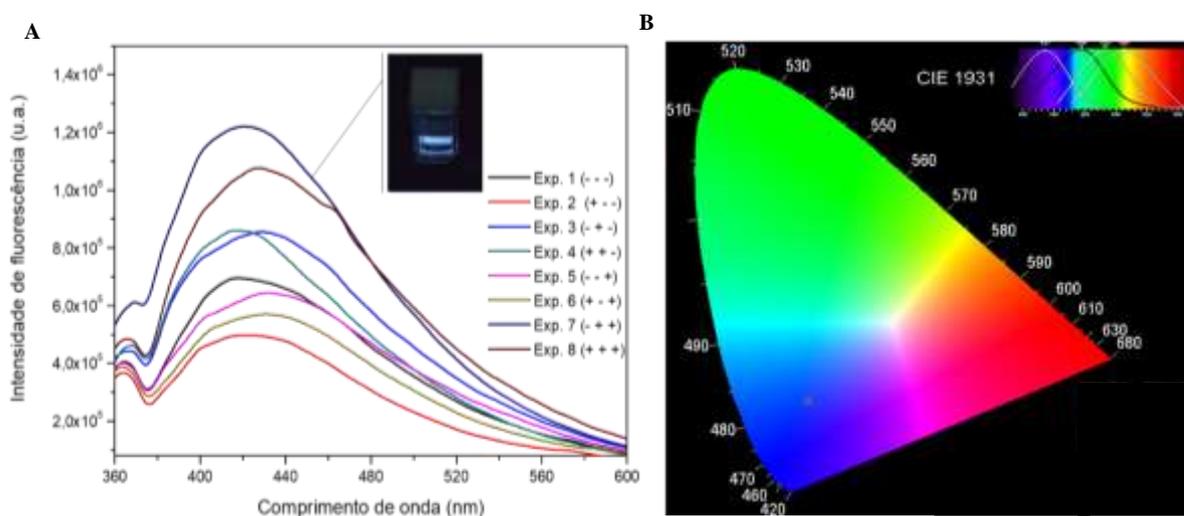
Figura 11 - Intensidade de fluorescência do compósito Ag/Polipirrol para diferentes comprimentos de onda de excitação.



Uma vez determinado o comprimento de onda de emissão ($\lambda_{exc} = 350$ nm), foram coletadas as emissões dos compósitos correspondentes aos 8 experimentos do planejamento fatorial realizados para que escolher o mais promissor mediante a sua intensidade de fluorescência, como mostrado na Figura 12-A. O experimento 7, que corresponde a utilização de $AgNO_3$ e Pirrol no nível de concentração superior (+) e o MPTS no nível inferior (-), foi aquele que levou à maior intensidade de fluorescência, com o pico máximo de emissão em torno de 435 nm (portanto, na região azul do espectro visível).

Nanoesferas de PPI apresentam a mesma variação da emissão como função dos comprimentos de ondas de excitação, com pico de emissão em 425 nm, que muda para 460 nm sob excitação de 300 a 400 nm, com a intensidade do pico de emissão aumentando primeiro e depois diminuindo com o aumento dos comprimentos de onda de excitação (Dong *et al.*, 2016), um efeito visualizado nos nossos resultados (Figs. 11 e 12). Para este trabalho, o comprimento de onda de máxima emissão foi próximo a 435 nm, o que compreende a região do azul no espectro visível, dado confirmado pelo gráfico de coordenada de cor que foi obtido pelo programa Spectra Lux (Santa-Cruz e Teles, 2003) (Fig. 12 B).

Figura 12 – A) espectro de emissão do compósito Ag/Polipirrol para $\lambda_{exc} = 350$ nm; B) gráfico de coordenada de cor no espectro RGB



Na Tabela 8 estão dispostas as intensidades máximas de fluorescência de todas as amostras do planejamento fatorial e suas replicatas, para uma excitação com $\lambda_{exc} = 350$ nm, que é aquela para a qual o compósito apresentou maior emissão de fluorescência.

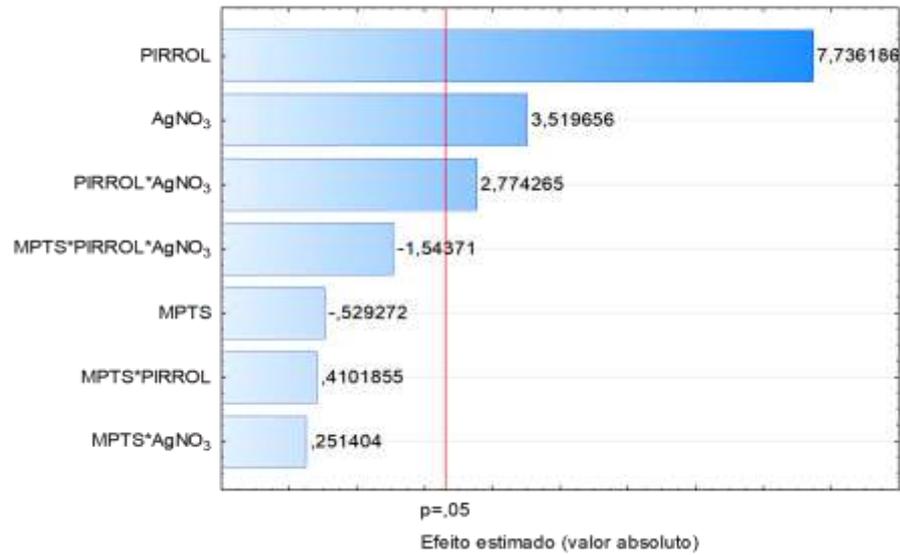
Tabela 8 - Planejamento fatorial e intensidade de fluorescência dos compósitos Ag/Polipirrol.

Intensidade de fluorescência dos compósitos de Ag/PPy ($\lambda_{exc} = 350$ nm)						
Experimento	MPTS	Pirrol	AgNO ₃	Replicatas		Média
1	-	-	-	4,62 x 10 ⁵	6,97 x 10 ⁵	5,80 x 10 ⁵
2	+	-	-	3,50 x 10 ⁵	4,99 x 10 ⁵	4,24 x 10 ⁵
3	-	+	-	6,42 x 10 ⁵	8,58 x 10 ⁵	7,50 x 10 ⁵
4	+	+	-	7,72 x 10 ⁵	8,61 x 10 ⁵	8,17 x 10 ⁵
5	-	-	+	3,92 x 10 ⁵	6,48 x 10 ⁵	5,20 x 10 ⁵
6	+	-	+	5,64 x 10 ⁵	5,73 x 10 ⁵	5,68 x 10 ⁵
7	-	+	+	1,14 x 10 ⁶	1,22 x 10 ⁶	1,18 x 10 ⁶
8	+	+	+	1,12 x 10 ⁶	1,08 x 10 ⁶	1,10 x 10 ⁶

A partir do gráfico de Pareto para a intensidade de fluorescência (Fig. 14), verificou-se que (i) a concentração de Pirrol (monômero), (ii) a concentração de AgNO₃ e (iii) a interação entre ambos são as variáveis mais importantes na síntese do compósito de Ag/Polipirrol, apresentando efeitos significativos (com 95% de confiança). Os valores dos efeitos para todas as variáveis foram positivos, evidenciando que a intensidade da fluorescência é favorecida quando o compósito é sintetizado com a maior concentração de pirrol e AgNO₃. Pelo gráfico de Pareto pode-se observar ainda que as interações entre as variáveis isoladas de MPTS, assim como suas interações com as demais, não se mostraram estatisticamente significativas.

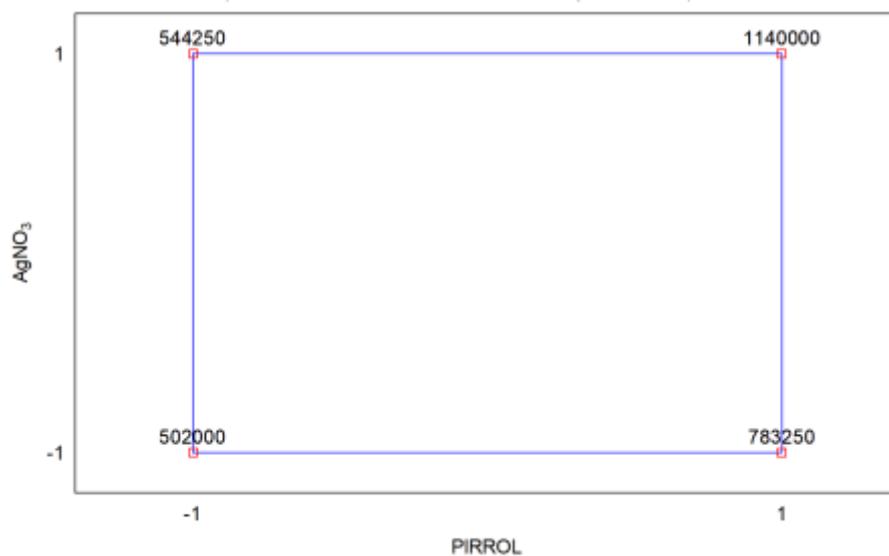
A produção do compósito de Ag/Polipirrol ocorre pela formação de ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas entre as nanopartículas de prata recobertas com grupos tiolados e as cadeias de polipirrol (Jing *et al.*, 2007). Ao sofrer dissociação, o precursor de prata (AgNO₃) gera cátions de prata (Ag⁺) e ânions nitrato (NO₃⁻); o Ag⁺ atua então como agente oxidante para a polimerização química *in situ* do monômero pirrol, resultando na formação simultânea de cadeias de polipirrol e de prata metálica (Ag⁰), como demonstrado no mecanismo da reação de entre o Ag⁺ e o monômero pirrol (ANEXO A) (Fujii *et al.*, 2007). Esse é um dado importante, pois tanto o pirrol quanto o AgNO₃ foram os fatores mais significantes (Fig. 14) para a intensidade da fluorescência, sendo assim possível associar a formação do compósito com a emissão de fluorescência do compósito aqui descrito.

Figura 13 - Gráfico de Pareto para a intensidade de fluorescência dos compósitos Ag/Polipirrol.



Uma interpretação geométrica dos dados pode ser usada para melhorar a visualização dos efeitos, e para isso o planejamento experimental foi representado em um sistema cartesiano, com um eixo para cada fator. De acordo com a Figura 13, dois fatores (pirrol e AgNO₃) apresentaram efeitos estatisticamente significativos mais pronunciados, sendo então possível definir que suas interações poderiam ser expressas espacialmente como a face de um cubo (Fig. 15). Isso permitiu confirmar que quando os dois fatores foram utilizados no nível superior (nível 1) resultariam valores de fluorescência maiores (vértice com valor de 1140000 u.a.), com o pirrol sendo o responsável pelo incremento maior nesse valor.

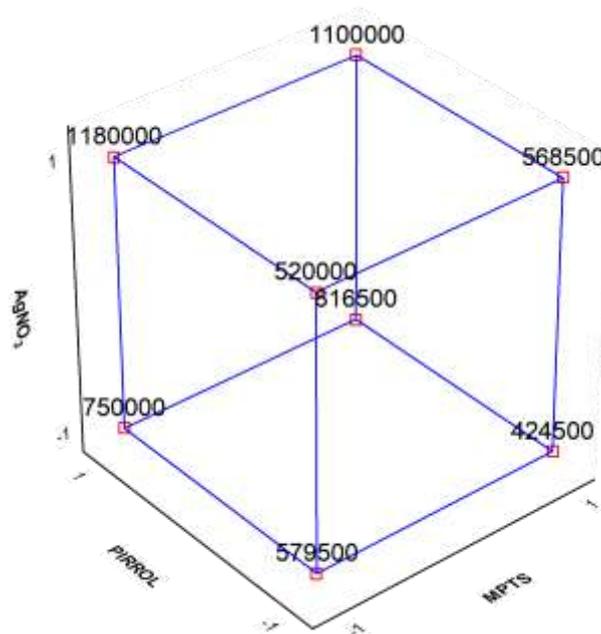
Figura 14 - Interpretação geométrica dos efeitos significativos para a intensidade de fluorescência do compósito Ag/Polipirrol.



Usando um gráfico cúbico das respostas de intensidade de fluorescência para os oitos ensaios realizados (Fig. 16), foi constatado então que os maiores valores de intensidade de fluorescência são obtidos quando o pirrol e o AgNO_3 estão no nível superior (+), e o estabilizante MPTS no nível inferior (-), o que corresponde ao vértice do cubo onde há o maior valor de intensidade de fluorescência (1180000 u.a.).

Através da investigação da influência dos parâmetros experimentais na formação de compósito de estrutura núcleo/casca de Ag/polipirrol, foi possível reconhecer a importância do pirrol como agente protetor das nanopartículas de prata, com a interação entre a cadeia polimérica e a nanopartícula sendo essencial para a estabilidade do compósito (Muñoz-Rojas *et al.*, 2011). Essa interação faz ainda com que seja aumentada a intensidade da fluorescência nos compósitos de polímeros condutores e nanopartículas metálicas (Santos *et al.*, 2013).

Figura 15 - Gráfico cúbico das respostas de intensidade de fluorescência do planejamento fatorial.



4.1.2 Medidas de potencial zeta

Ao entrarem em contato com um líquido, a maioria dos materiais particulados passa a apresentar carga elétrica em sua superfície, e isso leva a uma modificação na distribuição dos íons na sua vizinhança, resultando em uma dupla camada elétrica na interface da partícula com o líquido. O potencial elétrico existente no plano de cisalhamento hidrodinâmico de uma partícula é denominado potencial zeta, com as interações entre as partículas ocorrendo de

acordo com a magnitude desse potencial. Dessa forma, a medida de potencial zeta ajuda a prever a estabilidade de uma dispersão. Quanto maior o valor absoluto do potencial zeta (positivo ou negativo), maior será a estabilidade eletrostática da dispersão, o que se deve ao fato de que como partículas carregadas se repelem, isso impede sua coalescência e, conseqüentemente, a separação de fase.

Os compósitos correspondentes aos diferentes ensaios do planejamento fatorial foram caracterizados por meio de medidas de potencial zeta, a fim de avaliar sua estabilidade e verificar quais variáveis de síntese seriam as mais importantes para que soluções mais estáveis fossem obtidas. As respostas obtidas para as medidas de potencial zeta das amostras do planejamento fatorial, e suas replicatas, são apresentadas na Tabela 9. De acordo com esses resultados, as amostras exibiram um valor absoluto predominantemente negativo para seu potencial zeta, o que permitiu a obtenção dispersões coloidais mais estáveis. Compósitos de AgNPs e Polipirrol apresentam valor médio do potencial zeta de $(-41,53 \pm 0,70)$ mV (Da Silva Jr *et al.*, 2016), que é um valor comparável a aqueles obtidos para o compósito Ag/Polipirrol nesse estudo, como disposto na Tabela 9.

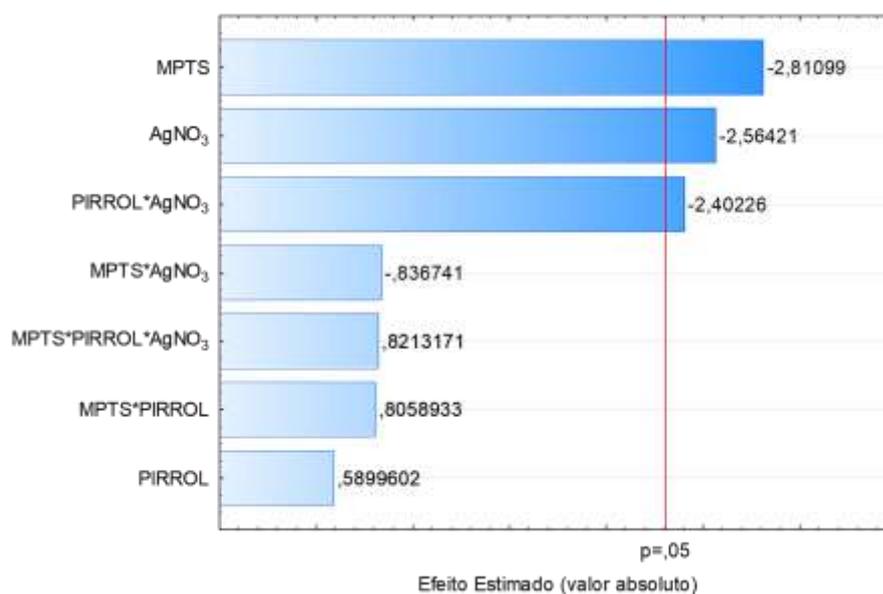
Foi possível também concluir que as nanopartículas (NPs) de prata inseridas têm uma forte interação com as cadeias de polipirrol, e que à medida em que a quantidade de polipirrol é aumentada, ocorre uma diminuição do potencial zeta (Wen *et al.*, 2017). Esse comportamento é também observado nos experimentos 3 e 7 (Tabela 9), onde pode ser notado que com a variação da concentração do AgNO₃ do nível inferior para o nível superior, o potencial zeta se torna menos negativo (passando de -38,6 para -22,5 mV).

Tabela 9 - Planejamento fatorial e medidas de potencial zeta dos compósitos Ag/Polipirrol.

Experimento	Potencial zeta (mV) dos compósitos de Ag/PPy				Replicatas	Média
	MPTS	Pirrol	AgNO ₃			
1	-	-	-	-25,7	-38,9	-32,3
2	+	-	-	-38,9	-38,4	-38,6
3	-	+	-	-19,2	-25,9	-22,5
4	+	+	-	-21,6	-36,4	-29,0
5	-	-	+	-22,3	-32,6	-27,6
6	+	-	+	-44,1	-45,0	-44,5
7	-	+	+	-33,1	-44,1	-38,6
8	+	+	+	-43,9	-46,4	-45,1

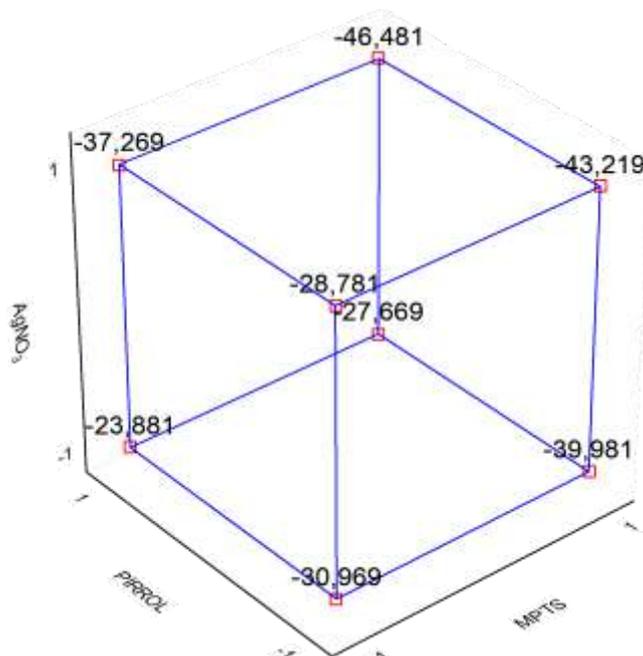
Como mostrado na Fig. 17, e de acordo com os dados da Tabela 9, no gráfico de Pareto para as respostas de potencial zeta pode ser observado o efeito de cada variável e suas possíveis interações. Conforme mostra o gráfico dessa figura, a concentração de MPTS e AgNO_3 , assim como a interação entre PIRROL e AgNO_3 , são estatisticamente significativas para a estabilidade da solução, dentro de um intervalo de confiança de 95%. Como o efeito mais significativo (do MPTS) é negativo, quando utilizamos o estabilizante em seu nível inferior (-), com o nível dos outros dois fatores sendo mantido fixo, há uma redução do valor médio do potencial zeta (experimentos 7 e 8). O MPTS é um importante constituinte da reação devido a presença de grupos tiolados (R-SH) que são agente que se adsorvem quimicamente nas superfícies de nanopartículas metálicas, criando assim um interface hidrofóbica que diminui a energia livre das superfícies das nanopartículas, evitando com isso a aglomeração (Caseri, 2000; Bourgeat-Lami, 2002). Sendo importante para síntese do compósito impossibilitando a aglomeração das NPs formadas durante o processo de oxidação do polipirrol, do que resulta uma boa dispersão das AgNPs na matriz de polipirrol.

Figura 16 - Gráfico de Pareto para a medidas de potencial zeta dos compósitos Ag/Polipirrol.



Pela análise do gráfico cúbico das respostas das medidas de potencial zeta (Fig. 18), pode ser notado que a amostra 7, aquela que exhibe maior intensidade de fluorescência, apresenta maiores valores de potencial zeta, o que indica que as condições de síntese dessa amostra também levam a soluções mais estáveis.

Figura 17 - Gráfico cúbico das respostas de potencial zeta do composto Ag/Polipirrol.



4.1.3 Diâmetro médio das partículas

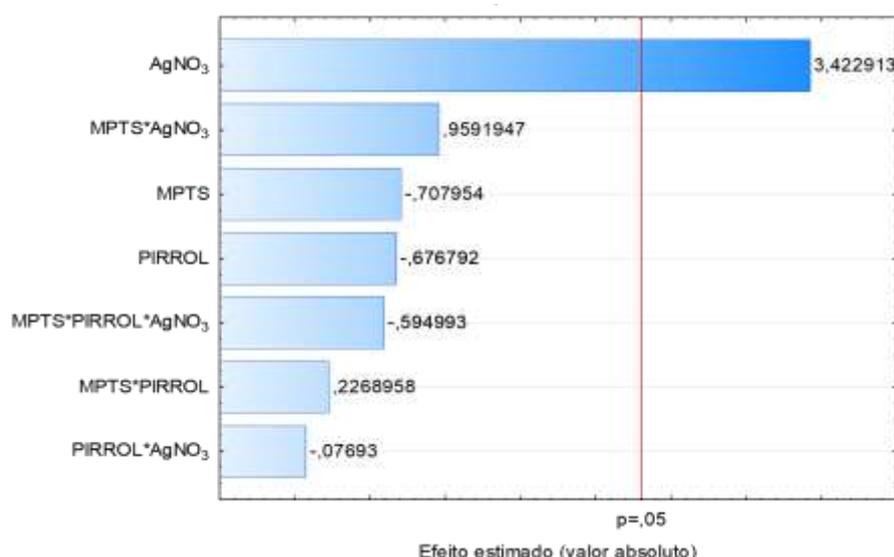
Os resultados obtidos para as medidas de diâmetro médio do composto são apresentados na Tabela 10. Deve ser ressaltado que o tamanho médio determinado pela técnica de espalhamento dinâmico de luz se refere ao diâmetro hidrodinâmico da partícula, o que neste caso inclui o conjunto estabilizante, polímero e nanopartícula de prata.

Tabela 10 - Planejamento fatorial e diâmetro médio de partículas dos compostos Ag/Pirrol.

Diâmetro médio (nm) das partículas dos compostos de Ag/PPy						
Experimento	MPTS	Pirrol	AgNO ₃	Replicadas		Média
1	-	-	-	843,20	892,60	867,9
2	+	-	-	764,10	843,90	804,0
3	-	+	-	798,70	864,10	831,4
4	+	+	-	823,70	795,70	809,7
5	-	-	+	950,00	885,70	917,8
6	+	-	+	896,20	971,30	933,7
7	-	+	+	851,30	964,60	907,9
8	+	+	+	867,20	942,70	904,9

No gráfico de Pareto correspondente (Fig. 19) estão dispostos os efeitos estatisticamente significativos para o diâmetro médio das partículas do compósito Ag/Polipirrol. Pode ser notado que a concentração de AgNO_3 foi aquela variável que apresentou uma influência estaticamente significativa ao nível de confiança de 95 %. O valor desse efeito é positivo, indicando que quando o AgNO_3 é utilizado em seu nível superior (+), teremos a dispersão de tamanho do compósito favorecida, o que corrobora aquilo que foi observado para a intensidade de fluorescência, que também é favorecida pelo uso do AgNO_3 em seu nível superior, como mostrado na Figura 19.

Figura 18 - Gráfico de Pareto para o diâmetro médio das partículas dos compósitos Ag/Polipirrol.



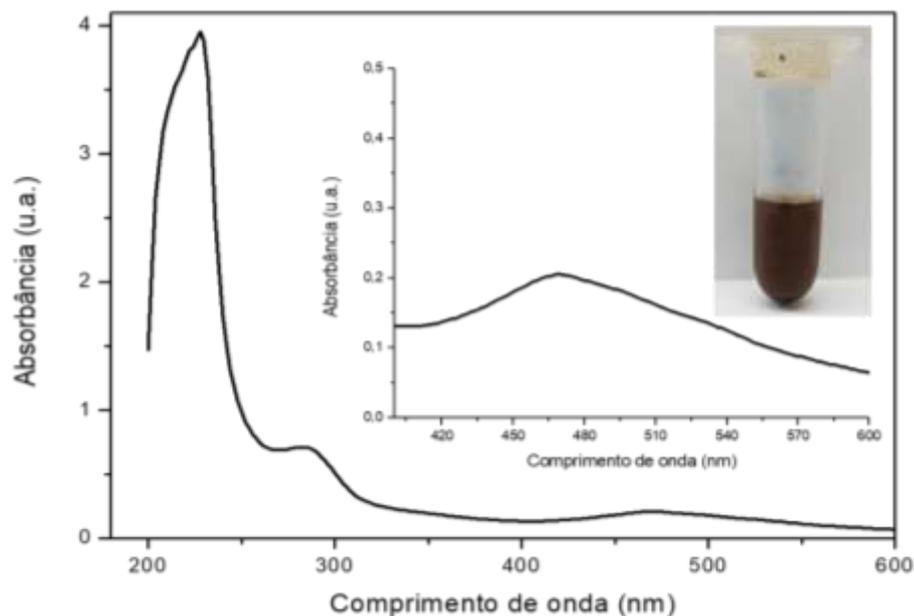
4.2 MEDIDAS DE UV-VIS

A técnica de espectroscopia de absorção no UV-Vis se constitui em uma importante ferramenta para uma confirmação preliminar da formação do compósito Ag/Polipirrol. Os picos referentes ao polipirrol, que foram observados em 230 e 280 nm (Fig. 20), correspondem às transições $\pi-\pi^*$ dos anéis benzenóides e às transições $\pi-\pi^*$ dos anéis de pirrol, respectivamente, e indicam que o PPI está em seu estado dopado (Lamprakopoulos *et al.*, 2004).

Já o pico de absorção observado em torno de 470 nm (Fig. 20) pode ser atribuído tanto a sobreposições das transições $\pi-\pi^*$ do polipirrol quanto à ressonância dos plásmons de superfície das AgNPs (Liu e Chuang, 2003). Comumente, as AgNPs exibem o pico de absorção da ressonância dos plásmons de superfície entre 410-440 nm (Sih e Wolf, 2005), devido à

oscilação coletiva dos elétrons livres do metal na banda de condução que é induzida pela radiação eletromagnética incidente.

Figura 19 - Espectro de UV-Vis do composto de Ag/Polipirrol.

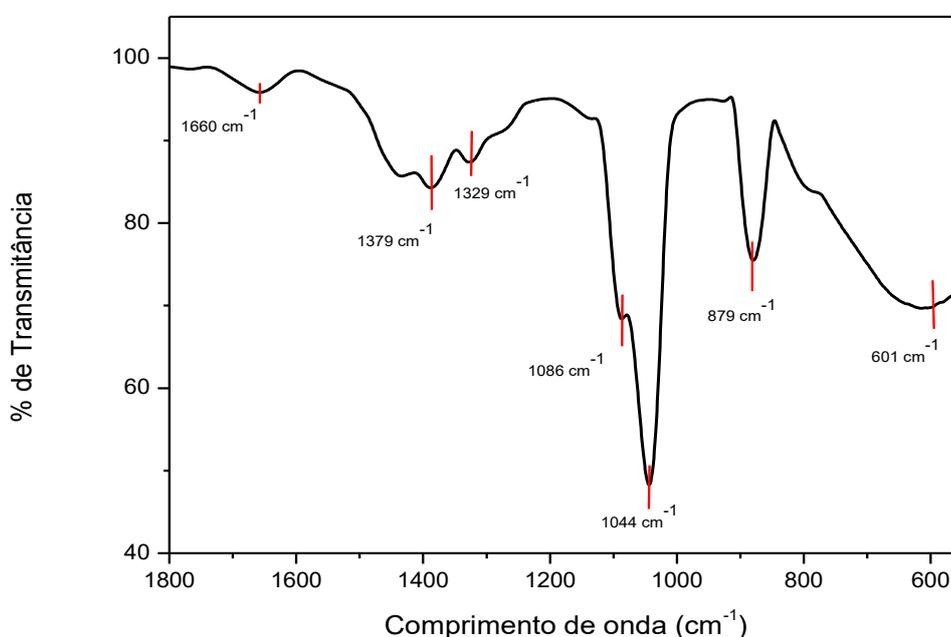


A identificação da banda do plásmon de superfície se fez difícil, em decorrência da sobreposição com a forte banda do polipirrol, como fora observado na síntese de nanotubos de polipirrol, onde a faixa de absorção π - π^* é em torno de 485 nm (Upadhyay e Kumar, 2014). Neste mesmo estudo, quando incorporadas AgNPs nos nanotubos de polipirrol havia um deslocamento da banda para 476 nm, sendo essa mudança mais acentuada à medida que aumentava a concentração de prata. Caso seja utilizada uma pequena quantidade de AgNPs, a absorção mais forte do polipirrol resulta em um pico mais pronunciado que acaba ocultando o pico referente à ressonância dos plásmons de superfície das AgNPs (Xu *et al.*, 2009). Quanto maior a quantidade de prata em massa, maior será a absorbância das AgNPs, levando a um deslocamento da banda para comprimentos de ondas inferiores (455 nm) (Upadhyay e Kumar, 2014). Uma dispersão de AgNPs apresenta banda ressonância dos plásmons de superfície em 400 nm, mas, com a polimerização de Polipirrol na superfície dessa nanopartícula, essa mesma banda se desloca para 470 nm (Chang *et al.*, 2012). Diante disso, acredita-se que a banda em 470 nm (Fig. 20) pode estar relacionada com a incorporação das AgNPs à matriz de polipirrol.

4.3 MEDIDAS DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

O uso de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) permitiu a obtenção de informações sobre a estrutura e composição do material compósito. Como pode ser observado na Fig. 21, no espectro de FTIR do compósito Ag/Polipirrol sintetizado podem ser identificados os picos característicos do polipirrol em 1329 cm^{-1} , 1044 cm^{-1} , 879 cm^{-1} e 601 cm^{-1} , que são atribuídos respectivamente ao estiramento C=C no anel, torção de C-H do anel fora do plano, estiramento de C=C e deformação de C=C-N-H do anel fora do plano (Kostić *et al.*, 1995).

Figura 20 - Espectro de FTIR do compósito Ag/Polipirrol.



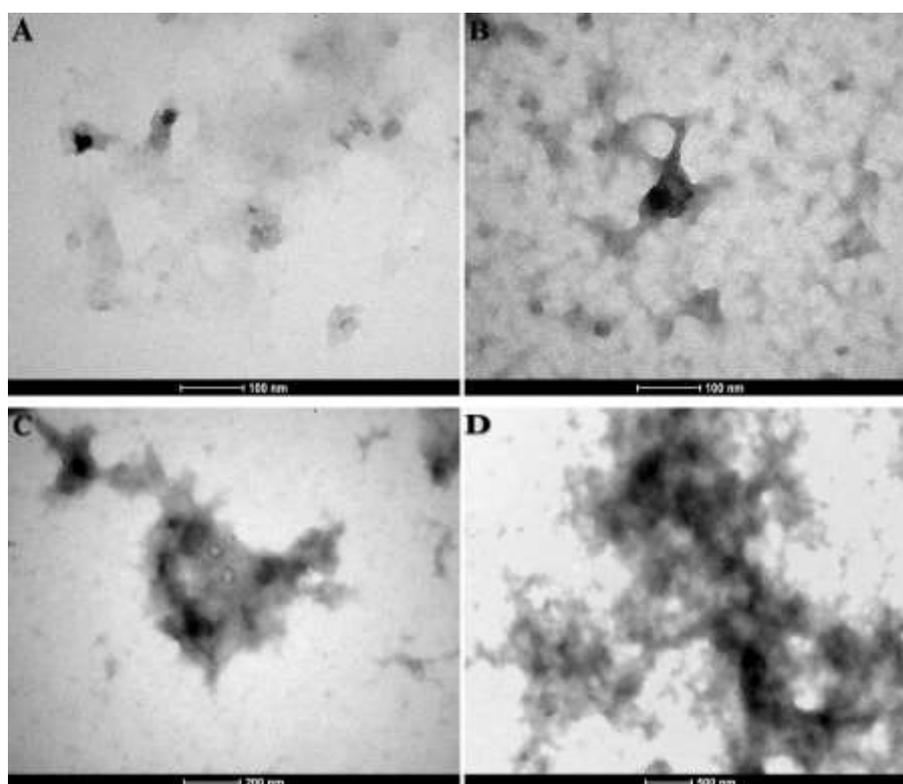
O pico perto de 1379 cm^{-1} é atribuído à oxidação do pirrol (Feng *et al.*, 2007), que se encontra dopado pelos íons NO_3^- . O deslocamento de alguns picos pode ser atribuído à interação da prata com as cadeias de polipirrol (Dias *et al.*, 2006; Dallas *et al.*, 2007; Jing *et al.*, 2007; Xing e Zhao, 2007). Já o pico em 1660 cm^{-1} , que é característico do estiramento da ligação C=C, está relacionado com o crescimento de cadeias de polipirrol sobrepostas, enquanto que o pico no entorno de 1086 cm^{-1} pode ser atribuído às vibrações do anel do pirrol (Xing e Zhao, 2007; Kate *et al.*, 2011).

4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

A morfologia do compósito de Ag/Polipirrol foi analisada através de imagens de MET em diferentes magnificações, como mostrado na Fig. 22. As nanopartículas de prata

apresentaram formato esférico e são monodispersas, formando o núcleo para o crescimento do envoltório de polipirrol, com estruturas unitárias que apresentaram tamanhos menores que 100 nm, como visto na Fig. 22 (A) e (B). A presença das nanopartículas de prata é uma consequência da ação oxidativa dos cátions de Ag^+ sobre o pirrol, enquanto que, como mencionado na Seção 4.3, os íons nitratos (NO_3^-) do AgNO_3 são adicionados à cadeia de polipirrol como dopantes, em acordo com o reportado por Dallas *et al.* (2007). Com a redução dos cátions de prata e o crescimento simultâneo da cadeia de polipirrol, sistemas isolados tipo núcleo-casca passam a se formar, mas acabam por se aglomerar, resultando em uma matriz polimérica com as nanopartículas metálicas incorporadas no seu interior (Fig. 22 (C) e (D)), e com tamanho variando entre 200-500 nm.

Figura 21 - Imagens de MET do compósito Ag/polipirrol em diferentes magnificações.



4.5 TESTE HEMOLÍTICO

Em termos genéticos, os genes são codificados por meio de sequências específicas presentes no DNA, localizadas em pontos específicos da cadeia dos cromossomos. Outras formas alternativas de gene são os alelos, que abrangem um único locus (posição gênica) em cromossomos homólogos. Para o sistema ABO, os principais alelos do gene ABO são A (Olsson *et al.*, 2001), B e O, que são responsáveis por dar origem aos quatro grupos sanguíneos: A, B, AB e O (Vengelen-Tyler, 2002).

O sistema sanguíneo ABO se caracteriza por uma heterogeneidade, devido à diferença estrutural dos genes das glicosiltransferases (enzimas responsáveis pela transferência dos resíduos específicos de açúcar), que atuam na conversão dos antígenos A ou B (Batisso e Novaretti, 2003). A ação dessas enzimas dependerá da sua estrutura conformacional, pois isso irá permitir ou não sua ligação com o substrato. A atividade nos antígenos A e B varia nos diversos subgrupos do sistema ABO, e isso está atrelado às diferenças bioquímicas dos antígenos produzidos (Barjas-Castro *et al.*, 2000).

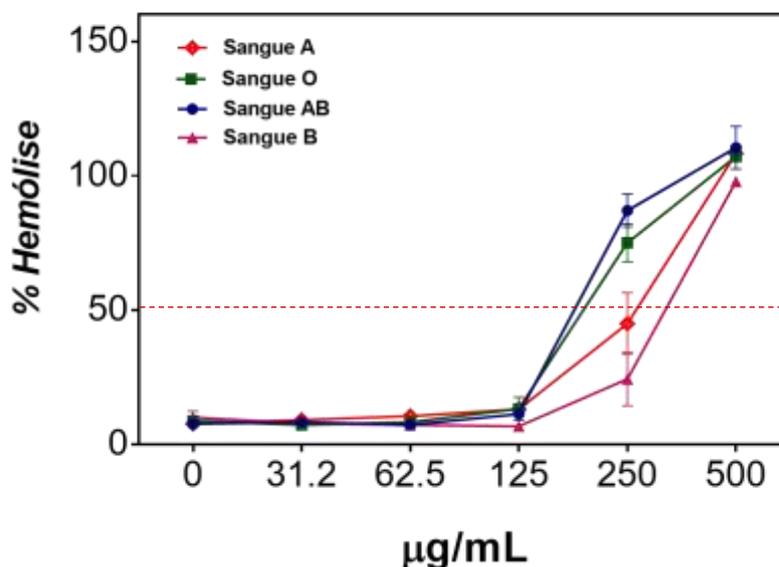
Os tipos sanguíneos são então classificados de acordo com a presença e/ou ausência dos antígenos A e/ou B na membrana eritrocitária. Dessa forma, se apenas o antígeno A está presente na membrana da hemácia, têm-se então o sangue do tipo A; se apenas estiver presente o antígeno B, têm-se o tipo sanguíneo B; e caso estejam presentes na membrana eritrocitária os antígenos A e B têm-se o tipo AB, e se esses antígenos forem ausentes na membrana, têm-se o tipo sanguíneo O (Cohen e Wood, 2002; Girello e Kühn, 2002; Jorde, 2004).

A hemólise corresponde à quebra ou destruição da membrana plasmática das hemácias, do que resulta a liberação da hemoglobina. Quando do uso de novos materiais, é importante realizar a investigação do potencial hemolítico para delimitar como eles se comportarão frente a matrizes biológicas complexas, como o tecido sanguíneo (Upadhyay *et al.*, 2015). No presente estudo, o percentual hemolítico de Ag/Polipirrol foi determinado para diferentes concentrações (31,2 a 500 $\mu\text{g/mL}$) do compósito frente a diferentes fenótipos humanos (Fig. 23). Constatamos que houve distintos perfis de interações do compósito com os diferentes eritrócitos, que começaram a se diferenciar a partir 125 $\mu\text{g/mL}$, havendo uma separação em dois grupos quando a concentração do compósito testado era de 250 $\mu\text{g/mL}$. Enquanto hemácias do tipo A e B apresentavam hemólise de 50% com valores de HT_{50} (concentração do material capaz de causar 50% de hemólise) acima de 250 $\mu\text{g/mL}$, os eritrócitos do tipo AB e O foram capazes de sofrer 50% de hemólise com valores abaixo de 250 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 11), e como mostrado na Fig. 23.

Tabela 11 - Taxa de hemólise (HT_{50}) para os tipos de hemácias testadas.

Tipo sanguíneo	Taxa de hemólise de 50% (HT_{50})
Sangue A	281,46 $\mu\text{g/mL}$
Sangue B	297,15 $\mu\text{g/mL}$
Sangue O	196,82 $\mu\text{g/mL}$
Sangue AB	179,12 $\mu\text{g/mL}$

Figura 22 - Percentual Hemolítico de Ag/Polipirrol.



Enquanto que diversos estudos têm reportado a ausência de alto potencial hemolítico de materiais compostos de polipirrol, vale a pena ressaltar que nanopartículas de prata demonstram capacidade de romper a membrana dos eritrócitos. No presente caso, entretanto, a nanopartícula de prata está envolta na matriz polimérica de polipirrol, o que deveria levar a uma marcante redução na possibilidade de hemólise. Estudos realizados por Wang *et al.* (2004) e Upadhyay *et al.* (2015), utilizando um pó de polipirrol e nanotubos de polipirrol decorado com nanopartículas de prata, respectivamente, constataram baixo percentual hemolítico sobre eritrócitos de coelho e camundongos.

Apesar dos testes mencionados anteriormente terem sido realizados em hemácias de mamíferos, é importante salientar que a composição da membrana de eritrócitos humanos é diferente (presença dos antígenos ABO), e isso pode acarretar distintas formas de interação entre o compósito e as proteínas celulares. Outro fator que deve ser levado em consideração é a possibilidade de interação do material com a carga de superfície característica das hemácias, uma vez que as proteínas da membrana atuam como coadjuvantes para a carga elétrica líquida total das superfícies celulares, podendo assim alterar o potencial zeta da célula por meio de interações intermoleculares (Tokumasu *et al.*, 2012).

4.6 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

A investigação do potencial citotóxico de compostos à base de polipirrol tem sido realizada de maneira abrangente, com o auxílio de diferentes técnicas de biologia celular. O polipirrol não apresenta citotoxicidade para com células Vero, uma vez que, ao serem cultivadas

em um substrato polipirrólico, elas apresentaram sua morfologia típica e nenhuma diferença na densidade celular (Míndroiú *et al.*, 2013). Da mesma forma, estudos conduzidos por Ramanaviciene *et al.* (2007) evidenciaram que partículas de polipirrol sintetizadas quimicamente não apresentaram nenhum efeito citotóxico sobre macrófagos peritoneais de camundongos.

Por ser uma característica muito complexa, a biocompatibilidade de um novo material deve ser investigada através da combinação de uma gama de propriedades biológicas que são testadas pela adoção de métodos alternativos *in vitro*. Pelo uso de diferentes linhagens de células na análise da citotoxicidade, é possível estabelecer a ação que o material pode desempenhar frente aos diferentes tipos de estruturas celulares, resultando em um potencial de aplicação mais direcionado e seguro (Humpolíček *et al.*, 2018). Nesse contexto, para investigação do potencial citotóxico do compósito Ag/Polipirrol, neste trabalho foram utilizadas três linhagens de células (Vero, macrófagos e fibroblastos) originadas de diferentes tecidos.

As diferentes concentrações testadas (31,2 a 500 µg/mL) do compósito Ag/Polipirrol não demonstraram efeito tóxico para as três linhagens de células investigadas. Nesses experimentos foram utilizados fibroblastos F1072, que é o tipo celular mais comumente usado para a determinação da citotoxicidade, sobretudo no caso de testes com novos compostos desenvolvidos com finalidade terapêutica, ou para o diagnóstico auxiliar onde a administração é por via tópica (pele) (Humpolíček *et al.*, 2018). Após 24 horas de incubação na presença de concentrações crescentes de Ag/Polipirrol, foi observado que não houve diminuição significativa na viabilidade dos fibroblastos (Fig. 24 A).

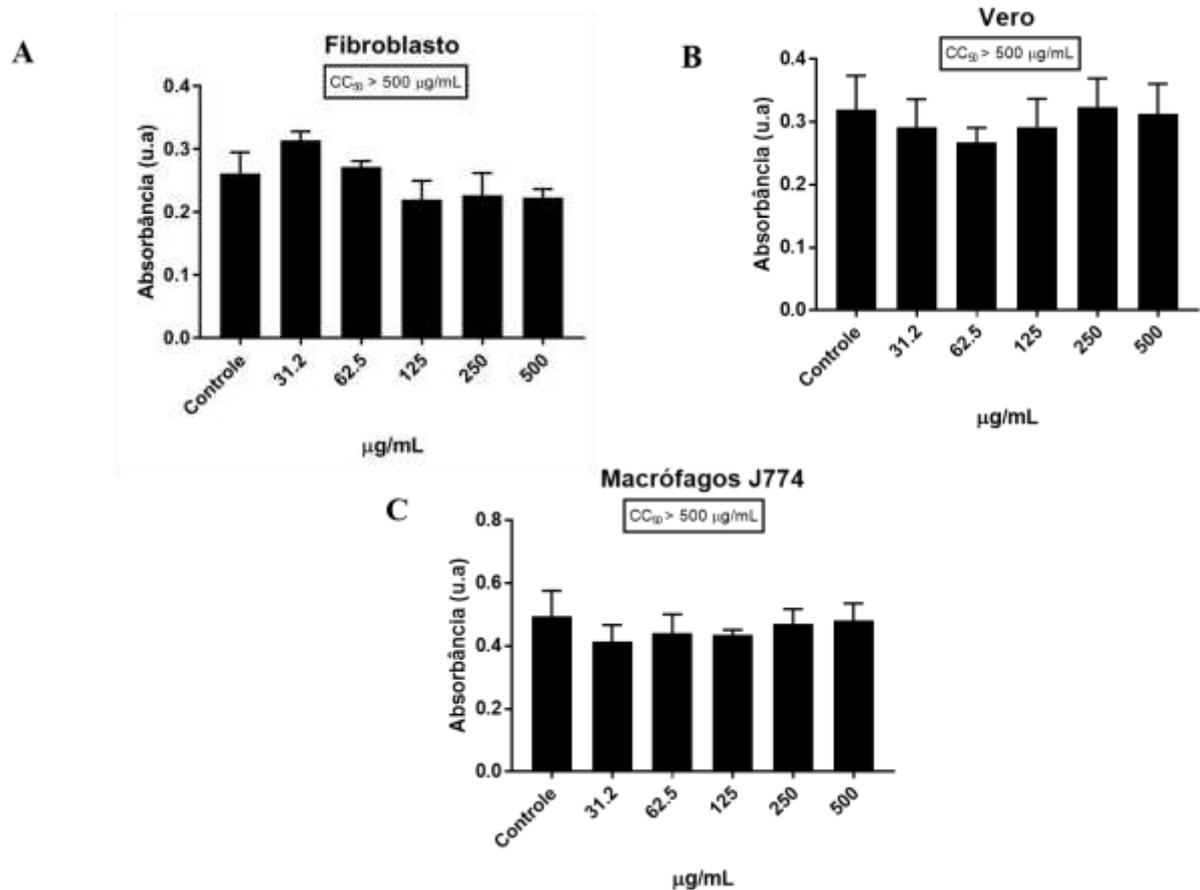
É importante observar que os resultados do presente estudo diferem daqueles descritos por Vaitkuvienė *et al.* (2013), onde, ao serem testadas sobre fibroblastos, nanopartículas de polipirrol apresentaram um efeito citotóxico que é dose-dependente, mas com uma redução significativa na viabilidade das células sendo obtida a partir de uma concentração igual a 25 µg/mL. Acredita-se que esses efeitos distintos sobre o mesmo tipo celular possam ser atribuídos às diferenças de tamanho entre as partículas do compósito Ag/Polipirrol descritas neste estudo e aqueles anteriormente usados na literatura (Flemming *et al.*, 1999).

Outros modelos celulares importantes para a avaliação da biocompatibilidade são as células Vero, oriundas do rim de macacos africanos, e macrófagos, que são células relacionadas ao sistema imunológico de mamíferos. A fim de obtermos uma melhor caracterização citotóxica, essas células foram inicialmente cultivadas na ausência do compósito e em sua presença – usando diferentes concentrações (31,2 a 500 µg/mL) das partículas de Ag/Polipirrol,

e posteriormente submetidas à análise da viabilidade celular. Assim como nos fibroblastos, para ambos tipos de células mais uma vez não foi encontrada uma diminuição significativa nas concentrações testadas durante 24 horas de incubação (Fig. 24 B e C). Este resultado reforça os aspectos de biocompatibilidade do compósito Ag/Polipirrol para com células de mamífero, sugerindo ser esse material seguro para aplicações biomédicas.

Em todas as células utilizadas no ensaio de citotoxicidade a CC_{50} foi maior que 500 $\mu\text{g/mL}$ do compósito de Ag/Polipirrol e, portanto, não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo tratado e o grupo controle (Fig. 24).

Figura 23 - Efeito do Ag/Polipirrol sobre células de mamíferos.



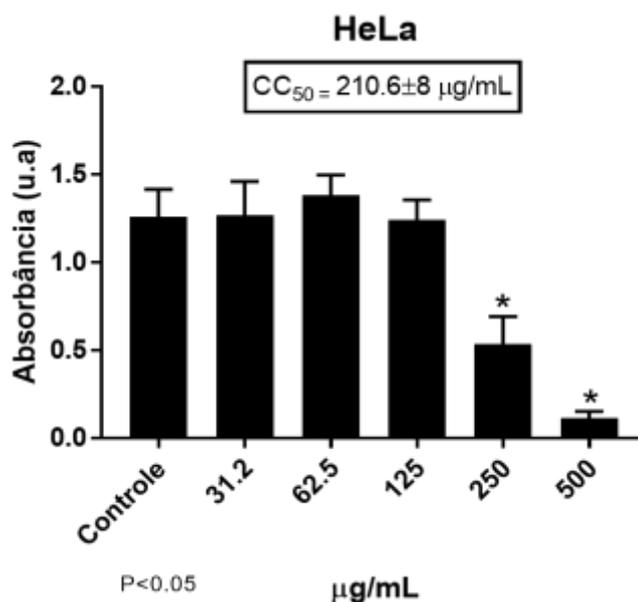
Legenda: Fibroblastos (A), células Vero (B) e macrófagos (C). CC_{50} é a concentração citotóxica que reduz em 50% a viabilidade das células.

4.7 ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO*

Continua sendo necessária a busca por novos materiais com potencial terapêutico ou para uso na terapia auxiliar de combate ao câncer, em virtude dos altos índices de mortalidade e da ocorrência de novos casos da doença a cada ano. Em nosso trabalho, o estudo da atividade antitumoral consistiu na análise do efeito de diferentes concentrações do compósito

Ag/Polipirrol (31,2 a 500 $\mu\text{g/mL}$) sobre células HeLa, que é uma linhagem de célula de adenocarcinoma do colo do útero humano. Após 24 horas de incubação, as células HeLa que estavam sob tratamento apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) de sua viabilidade (Fig. 25), com uma $CC_{50} = 210,06 \pm 8,0 \mu\text{g/mL}$.

Figura 24 - Efeito do composto Ag/Polipirrol sobre células de carcinoma cervical humano.



Como observado na Figura 25, a redução significativa dos valores de absorbância corresponde aos grupos (indicados pelo asterisco *) cujo valor de concentração mostrou um maior efeito na redução da viabilidade das células HeLas. Após a adição do MTT às culturas, o sal de tetrazólio é reduzido pelas enzimas mitocondriais a um produto de cor púrpura, denominado Formazan. Dessa forma, a quantidade de Formazan presente na cultura é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis, tendo em vista que presença de atividade enzimática (redução do MTT) só ocorre em células saudáveis. A formação de um produto colorimétrico (cristais de Formazan) possibilita a medição da intensidade de cor através de espectrofotometria, de tal modo que quanto maior a intensidade de cor, mais viável será a cultura celular. Essa alta intensidade de cor corresponde a maiores valores de absorbância, ou seja, quanto mais viável for a célula maiores os valores desta medida. A diminuição da viabilidade, com a presença de células danificadas e em estágio de morte celular, é identificada por baixos valores de absorbância, resultante da baixa presença do Formazan. Podemos observar que o grupo controle (isto é, das células HeLa em meio de cultura sem o material) apresentou altos valores de absorbância, enquanto os grupos tratados (250 e 500 $\mu\text{g/mL}$), exibiram menores índices de absorbância. Os resultados quantitativos desse teste podem ser

analisados através de uma regressão linear, o que permitirá determinar qual a concentração que levaria a uma redução de 50% da viabilidade das células.

A diminuição da viabilidade celular de células cancerígenas após o tratamento com materiais à base de nanopartículas de polipirrol é descrita na literatura (Chen *et al.*, 2018) como uma das possíveis aplicações desses compostos de natureza polimérica. Um estudo sobre o uso de tratamento fototermal (aplicação de radiação para geração de calor) com células HeLa tratadas com diferentes concentrações de nanopartículas de polipirrol demonstrou a ocorrência de uma redução de 9,4% da viabilidade celular com 12 horas de exposição a 300 µg/mL. Porém, quando as nanopartículas não eram submetidas à incidência da radiação infravermelha, não foram encontradas diferenças significativas relativas ao controle sem tratamento (Zha *et al.*, 2013). Contudo, nesse mesmo estudo foi também observado que a incidência de radiação no infravermelho próximo (808 nm) era capaz de modular a atividade antitumoral *in vitro*, reduzindo de forma significativa (80%) a viabilidade das células tumorais a partir de uma concentração de 300 µg/mL (Tabela 12) (Zha *et al.*, 2013).

Outro estudo (Feng *et al.*, 2015) examinou a eficácia de um compósito formado por nanopartículas de ouro revestidas com polipirrol e decoradas com óxido de ferro (Au/Polipirrol@Fe₃O₄) para a redução da viabilidade celular em cultura de HeLa, tanto na presença quanto na ausência de aplicação de um laser na região do infravermelho próximo (808 nm). Foi observado que uma redução significativa da viabilidade das células tumorais somente aconteceu após uma associação entre a radiação laser e a presença do nanocompósito, que possibilita a dispersão da energia sob forma de calor.

O potencial anticâncer de materiais constituídos por polipirrol se estende a outras linhagens de células cancerígenas. Em 2018, (Hathout *et al.*) comprovaram o potencial antitumoral de nanopartículas de polipirrol funcionalizadas com Alicina (um composto, presente no alho, que tem ação antimutagênica), e destacaram que quando o material era submetido à ação de radiação na região do infravermelho próximo, se tornava possível obter uma redução de até 40% da viabilidade de células neoplásicas, relativamente ao controle sem tratamento.

Esses estudos sugerem a possibilidade de um potencial antitumoral efetivo dos compósitos de Ag/Polipirrol utilizados no presente estudo quando de sua interação com células de câncer cervical humano, o que é reforçado pelo fato de ter sido encontrado que esse efeito antitumoral ocorre mesmo sem a aplicação de uma fonte externa de energia. Deve ser ressaltado que a concentração do compósito Ag/Polipirrol com ação efetiva contra células HeLa (210,6

$\mu\text{g/mL}$) foi inferior a aquelas capazes de reduzir a viabilidade em células de mamíferos ($> 500 \mu\text{g/mL}$), o que amplia assim as possibilidades de seu uso terapêutico.

Dos quatro fenótipos de sangue humano submetidos aos testes, apenas dois apresentaram $\text{HT}_{50} < \text{CC}_{50}$ para o caso da HeLa ($210,6 \mu\text{g/ml}$), sendo necessária uma investigação mais detalhada para que venham a ser minimizados os possíveis riscos às células vermelhas dos fenótipos em questão. Neste último caso, considera-se a possibilidade de uma investigação para verificar a atividade do compósito Ag/Polipirrol quando submetido a um tratamento fototermal frente a uma cultura de células HeLa, para a obtenção de um efeito significativo mesmo em doses mais baixas. Nesse sentido, de ser lembrado que, como demonstrado na literatura (Vaitkuvienė *et al.*, 2013), uma concentração menor que $30 \mu\text{g/mL}$ de nanopartículas de polipirrol submetidas à ação de radiação infravermelha foi capaz de reduzir a viabilidade de células HeLa em 50%. Existe então a possibilidade de utilização de uma dose muito mais baixa do que a CC_{50} da HeLa, de modo a reduzir os danos às hemácias humanas com fenótipos AB e O.

4.8 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

A análise ultraestrutural (Fig. 26) revelou importantes alterações na morfologia das células HeLa tratadas com diferentes concentrações do compósito Ag/Polipirrol. As células utilizadas como grupo controle, e que não receberam qualquer tratamento, apresentaram a morfologia usual, ou seja, seu aspecto permaneceu ligeiramente achatado e em processo de confluência (ocupação da superfície através da divisão em multicamadas) (Fig. 26 A). Pode-se observar ainda que as células do grupo controle apresentaram estruturas bem preservadas, como microvilosidades e filopódios (Fig. 26 B). Essas características são compatíveis com a morfologia topográfica de células HeLa, tanto no uso daquelas observadas em um sistema *in vivo* compondo um tecido invasor, quanto em sistemas *in vitro* quando depositadas sobre substratos biocompatíveis (Ciapetti *et al.*, 1993). Nas células tratadas com uma concentração do compósito correspondente à metade da CC_{50} ($105,3 \mu\text{g/mL}$), foi observada a presença de células arredondadas, com uma diminuição das microvilosidades (Fig. 26 C – setas brancas) e a ocorrência de um enrugamento da membrana plasmática em mais de uma célula (Fig. 26 C - área demarcada com contorno branco).

Figura 25 - Efeito do composto Ag/Polipirrol sobre células HeLa.

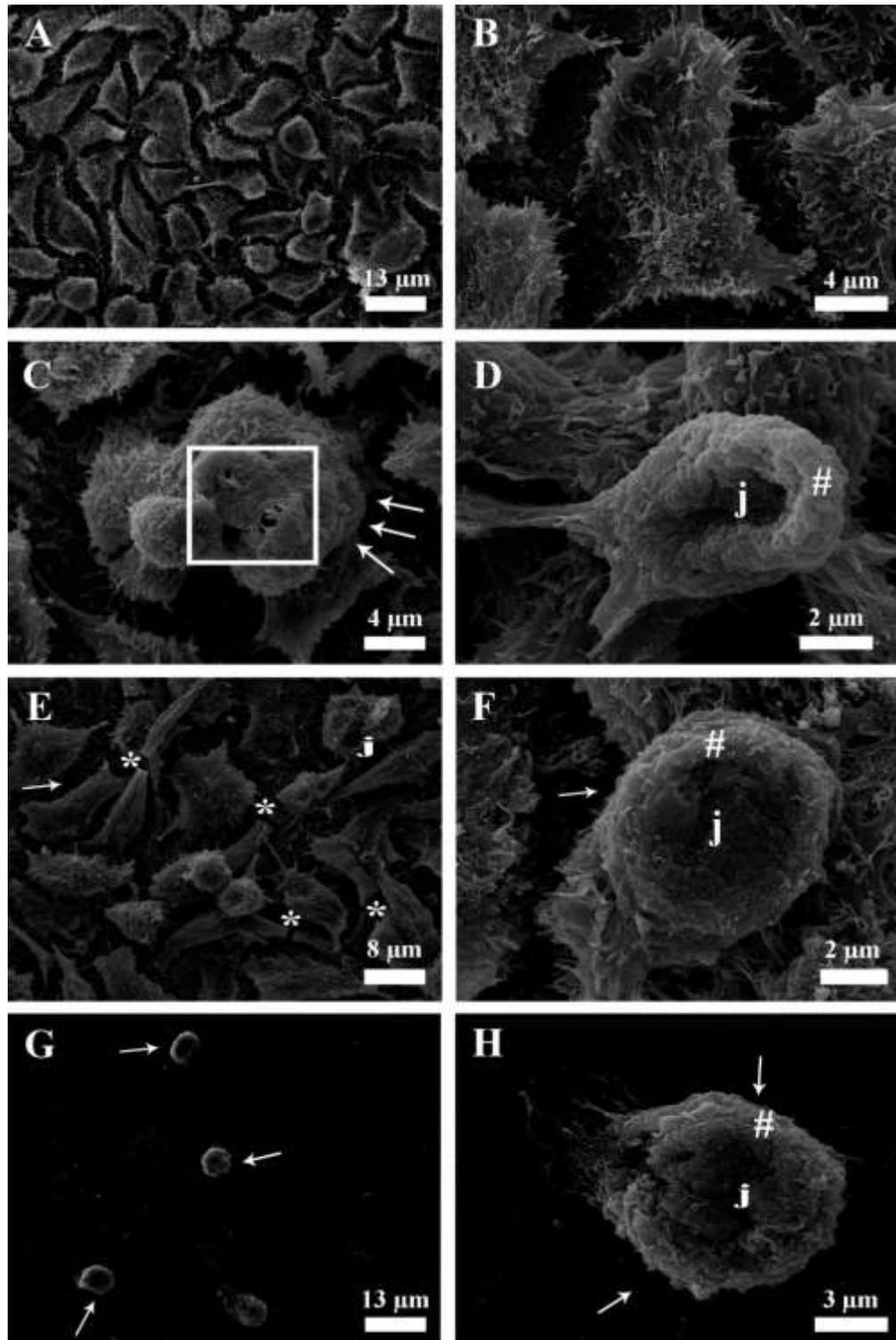


Imagem da ultraestrutura do: controle negativo (A e B). Células tratadas em concentrações de 0,5x CC₅₀ do composto Ag/Polipirrol (C e D), 1x CC₅₀ (E e F), 2x CC₅₀ (G e H). Setas brancas: redução das microvilosidades; letra j: depressão na membrana plasmática; #: enrugamento de membrana; *: ruptura de projeções de membrana.

Em um estudo realizado por Ahmed El-Said *et al.* (2010), foi observado que quando em contato com um substrato de alumina recoberto com nanofios de polipirrol, as células HeLa apresentaram morfologia arredondada. No presente estudo, pode-se notar a presença de pequenas fissuras na membrana plasmática (Fig. 26 C), que podem estar relacionadas com a diminuição da viabilidade celular. Ainda no grupo de células tratadas com uma concentração igual a 105,3 $\mu\text{g/mL}$, foi observada a ocorrência de depressões na membrana plasmática (Fig. 25 D – letra j), resultando na perda da morfologia, além do enrugamento da membrana plasmática (Fig. 26 D - #).

Por sua vez, no grupo tratado com uma concentração igual a CC_{50} (210,6 $\mu\text{g/mL}$) do composto Ag/Polipirrol foi possível identificar modificações distintas, que podem ser relacionadas com a perda da viabilidade celular (Fig. 26 E e F). Dentre as principais alterações observadas, mostram-se como mais evidentes a redução de microvilosidades (setas brancas), a ocorrência de depressão (letra j) e a ruptura das projeções da membrana plasmática (*), sugerindo que esses eventos acontecem em uma forma dose-dependente. Na Fig. 26 (F), pode ser verificado um extenso enrugamento da membrana plasmática (#).

As culturas de HeLa tratadas com uma concentração equivalente ao dobro da CC_{50} (421,2 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram uma diminuição evidente no número de células (Fig. 26 G), que exibiram um decréscimo do volume celular e microvilosidades (setas brancas). As alterações ultraestruturais descritas anteriormente foram ainda observadas, com destaque para deformações na membrana plasmática: regiões com depressão, enrugamento e ausência de microvilosidades (Fig. 26 H).

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Neste trabalho foi inicialmente discutida a síntese de um compósito Ag/Polipirrol através de uma reação redox simultânea entre o metal e o polímero condutor. As propriedades do compósito foram então investigadas pela utilização de um planejamento fatorial, onde ficou demonstrado que a variação das concentrações iniciais dos reagentes pode resultar no aparecimento de efeitos significativos sobre a intensidade de fluorescência, o potencial zeta e o tamanho do compósito. Para estabelecer a composição do compósito foram utilizadas as técnicas de UV-Vis, FTIR, e MET.

Por sua vez, a investigação dos aspectos de biocompatibilidade do compósito Ag/Polipirrol foi feita através das técnicas de citotoxicidade em células de mamíferos (Vero, macrófagos e fibroblastos) e do teste hemolítico em diferentes fenótipos humanos *in vitro*. Nesses ensaios, foi possível determinar que sob ação do compósito não há diferenças significativas na viabilidade das três células testadas, assim como verificar a ocorrência de diferentes perfis de interação frente a distintos tipos de eritrócitos humanos, que não haviam ainda sido discutidos na literatura para esse tipo de material. Esses resultados reforçam a possibilidade de uma aplicação mais ampla do compósito Ag/Polipirrol em sistemas biológicos.

O compósito Ag/Polipirrol se mostrou ainda eficaz para uma diminuição significativa da viabilidade de células de carcinoma cervical humano (células HeLa), em diferentes concentrações. As alterações ultraestruturais correspondentes revelaram alterações topográficas das células HeLa, sugerindo a existência de um efeito dose-dependente. Dessa forma, pode-se concluir que o compósito apresenta um potencial antitumoral, sendo necessária a realização de estudos mais aprofundados a fim elucidar o mecanismo correspondente de ação.

Como perspectivas futuras para a continuidade deste trabalho, a intensidade da resposta de fluorescência poderá ainda ser otimizada pela adoção da técnica de superfície de resposta, o que pode permitir a utilização deste compósito para a marcação molecular. Há ainda a alternativa promissora de utilização do compósito Ag/Polipirrol em células HeLa em conjunto com a incidência de radiação eletromagnética para possibilitar uma maior potencialização de sua ação antitumoral, em paralelo com o descrito na literatura. Outra perspectiva futura é a determinação do mecanismo de ação do compósito sobre as células HeLa, o que poderá permitir uma melhor compreensão sobre o tipo de morte celular que estaria sendo induzido.

REFERÊNCIAS

- AHMED EL-SAID, W. et al. Analysis of effect of nanoporous alumina substrate coated with polypyrrole nanowire on cell morphology based on AFM topography. **Ultramicroscopy**, v. 110, n. 6, p. 676-681, 2010/05/01/ 2010.
- ANDRADE, C. A. S. et al. Diagnosis of dengue infection using a modified gold electrode with hybrid organic–inorganic nanocomposite and Bauhinia monandra lectin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 362, n. 2, p. 517-523, 2011/10/15/ 2011.
- ANTONY, J. **Design of Experiments for Engineers and Scientists**. Elsevier Science, 2003.
- AOKI, T. et al. Secretory function of adrenal chromaffin cells cultured on polypyrrole films. **Biomaterials**, v. 17, n. 20, p. 1971-1974, 1996.
- ARANDA-SOUZA, M. Â. et al. In vitro effect of Bothrops leucurus lectin (BLL) against Leishmania amazonensis and Leishmania braziliensis infection. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 431-439, 2018/12/01/ 2018.
- ARMEL, V. et al. Designed electrodeposition of nanoparticles inside conducting polymers. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 37, p. 19767-19773, 2012.
- ARMSTRONG, B.; DOLL, R. Environmental factors and cancer incidence and mortality in different countries, with special reference to dietary practices. **International Journal of Cancer**, v. 15, n. 4, p. 617-631, 1975/04/15 1975.
- ATEH, D. D.; NAVSARIA, H. A.; VADGAMA, P. Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues. **Journal of the Royal Society, Interface**, v. 3, n. 11, p. 741-752, 2006a. 1742-5662.
- _____. Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 3, n. 11, p. 741-752, 2006/12/22 2006b.
- BABU, K. F. et al. One pot synthesis of polypyrrole silver nanocomposite on cotton fabrics for multifunctional property. **Carbohydrate polymers**, v. 90, n. 4, p. 1557-1563, 2012.
- BALDEO, C. et al. Uridine triacetate for severe 5-fluorouracil toxicity in a patient with thymidylate synthase gene variation: Potential pharmacogenomic implications. **SAGE Open Medical Case Reports**, v. 6, p. 2050313X18786405, 2018/01/01 2018.
- BALINT, R.; CASSIDY, N. J.; CARTMELL, S. H. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 6, p. 2341-2353, 2014/06/01/ 2014.

BARJAS-CASTRO, M. et al. Molecular heterogeneity of the A3 subgroup. **Clinical & Laboratory Haematology**, v. 22, n. 2, p. 73-78, 2000.

BATISSOCO, A. C.; NOVARETTI, M. C. Z. Aspectos moleculares do sistema sanguíneo ABO. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 25, n. 1, p. 47-58, 2003.

BERNI NETO, E.; RIBEIRO, C.; ZUCOLOTTI, V. Síntese de nanopartículas de prata para aplicação na sanitização de embalagens. **Embrapa Instrumentação-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2008.

BOURGEAT-LAMI, E. Organic–Inorganic Nanostructured Colloids. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 2, n. 1, p. 1-24, // 2002.

BOUVARD, V. et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. **The Lancet. Oncology**, v. 10, n. 4, p. 321, 2009. ISSN 1474-5488.

BOUVARD, V. et al. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 16, p. 1599-1600, 2015/12/01/ 2015.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building**. Wiley, 1978.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018/11/01 2018.

BREDAS, J. L.; STREET, G. B. Polarons, bipolarons, and solitons in conducting polymers. **Accounts of Chemical Research**, v. 18, n. 10, p. 309-315, 1985/10/01 1985.

BROWN, T. L. **Chemistry: the central science**. Pearson Education, 2009.

CAMPBELL, T.; HODGSON, A.; WALLACE, G. Incorporation of erythrocytes into polypyrrole to form the basis of a biosensor to screen for Rhesus (D) blood groups and rhesus (D) antibodies. **Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis**, v. 11, n. 4, p. 215-222, 1999.

CARBÓ-ARGIBAY, E. et al. Chemical Sharpening of Gold Nanorods: The Rod-to-Octahedron Transition. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 47, p. 8983-8987, 2007.

CARVALHO, R. D. et al. Carcinoma de células escamosas microinvasivo: relato de caso. **Revista Paraense de Medicina**, v. 20, p. 65-69, 2006.

CASERI, W. Nanocomposites of polymers and metals or semiconductors: Historical background and optical properties. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 21, n. 11, p. 705-722, 2000.

CHANG, M. et al. Imparting Chemical Stability in Nanoparticulate Silver via a Conjugated Polymer Casing Approach. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 4, n. 8, p. 4357-4365, 2012/08/22 2012.

CHEN, Y. et al. Hollow Polypyrrole Nanospindles for Highly Effective Cancer Therapy. **ChemPlusChem**, v. 83, n. 12, p. 1127-1134, 2018/12/01 2018.

CHIANG, C. K. et al. Electrical Conductivity in Doped Polyacetylene. **Physical Review Letters**, v. 39, n. 17, p. 1098-1101, 10/24/ 1977.

CIAPETTI, G. et al. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. **Biomaterials**, v. 14, n. 5, p. 359-364, 1993/04/01/ 1993.

COHEN, B. J.; WOOD, D. L. **Memmler o corpo humano na saúde e na doença**. Editora Manole Ltda, 2002.

DA SILVA, A. C. C. G. et al. Realização de Papanicolaou em profissionais de saúde. **Revista de Medicina**, v. 83, n. 1-2, p. 28-32, 2004.

DA SILVA JR, F. A. G. et al. Antibacterial behavior of polypyrrole: The influence of morphology and additives incorporation. **Materials Science and Engineering: C**, v. 62, p. 317-322, 2016/05/01/ 2016.

DALL'OLIO, A. C. Y.; Varacca, V. & Bocchi, V. **Comptes Rendus**, v. 267, p. 433, 1968.

DALLAS, P. et al. Interfacial polymerization of pyrrole and in situ synthesis of polypyrrole/silver nanocomposites. **Polymer**, v. 48, n. 7, p. 2007-2013, 2007/03/23/ 2007.

DANIEL, M.-C.; ASTRUC, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 1, p. 293-346, 2004/01/01 2004.

DE BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Aplicações na Ciência e na Indústria**. Bookman, 2010.

DE MATTEIS, V. et al. Silver nanoparticles: synthetic routes, in vitro toxicity and theranostic applications for cancer disease. **Nanomaterials**, v. 8, n. 5, p. 319, 2018.

DIAS, H. V. R.; FIANCHINI, M.; RAJAPAKSE, R. M. G. Greener method for high-quality polypyrrole. **Polymer**, v. 47, n. 21, p. 7349-7354, 2006/10/04/ 2006.

DIAZ, A.; BARGON, J. Electrochemical synthesis of conducting polymers. **Handbook of conducting polymers**, v. 1, p. 81, 1986.

DIAZ, A. F. et al. Electrochemistry of conducting polypyrrole films. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 129, n. 1, p. 115-132, 1981/11/10/ 1981.

DOMINGUINHOS. **Quem me levará sou eu. Quem me levará sou eu.** Brasil: RCA Victor 1980.

DONG, B. et al. Synthesis and photoluminescence modulating of polypyrrole fluorescent nanospheres/dots. **RSC Advances**, v. 6, n. 28, p. 23737-23745, 2016.

EIRAS, S. P. et al. **Métodos de Otimização em Química.** Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química 2000.

FACINA, T. Estimativa 2014–incidência de câncer no brasil. **Rev Bras Cancerol**, v. 60, n. 1, p. 63-64, 2014.

FAEZ, R. et al. Polímeros condutores. **Química nova na escola**, v. 11, n. 1, p. 13-18, 2000.

FENG, W. et al. Au/Polypyrrole@Fe₃O₄ Nanocomposites for MR/CT Dual-Modal Imaging Guided-Photothermal Therapy: An in Vitro Study. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 7, p. 4354-4367, 2015/02/25 2015.

FENG, X. et al. Ag/Polypyrrole Core–Shell Nanostructures: Interface Polymerization, Characterization, and Modification by Gold Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 24, p. 8463-8468, 2007/06/01 2007.

FERLAY, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International journal of cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941-1953, 2019.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-E386, 2015/03/01 2015.

FERNANDEZ, L. et al. Pulmonary Toxicity Due to 5-Fluorouracil (5-FU) Manifested as Diffuse Alveolar Hemorrhage: Case Report. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 197, p. A6577, 2018.

FERRAZ, N. et al. In vitro and in vivo toxicity of rinsed and aged nanocellulose–polypyrrole composites. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 100A, n. 8, p. 2128-2138, 2012.

FLEISCHER, S. E. Solar radiation and the incidence and mortality of leading invasive cancers in the United States AU - Fleischer, Alan B. **Dermato-Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. e1162366, 2016/01/01 2016.

FLEMMING, R. G. et al. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. **Biomaterials**, v. 20, n. 6, p. 573-588, 1999/03/01/ 1999.

FUJII, S. et al. One-step synthesis of polypyrrole-coated silver nanocomposite particles and their application as a coloured particulate emulsifier. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17, n. 36, p. 3777-3779, 2007.

GAO, Y. et al. Silver/polyaniline composite nanotubes: one-step synthesis and electrocatalytic activity for neurotransmitter dopamine. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 34, p. 15175-15181, 2009.

GARDINI, G. The oxidation of monocyclic pyrroles. In: (Ed.). **Advances in Heterocyclic Chemistry**: Elsevier, v.15, 1973. p.67-98.

GARNER, B. et al. Human endothelial cell a. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 10, n. 1, p. 19-27, 1999/01/01 1999.

GERARD, M.; CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, n. 5, p. 345-359, 2002/05/01/ 2002.

GERMAN, N. et al. The effect of colloidal solutions of gold nanoparticles on the performance of a glucose oxidase modified carbon electrode. **Microchimica Acta**, v. 172, n. 1, p. 185-191, 2011/02/01 2011.

GERSTEN, O.; WILMOTH, J. R. The Cancer Transition in Japan since 1951. **Demographic Research**, v. 7, n. 5, p. 271-306, 2002.

GHOSH CHAUDHURI, R.; PARIA, S. Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 4, p. 2373-2433, 2012/04/11 2012.

GILMORE, K. J. et al. Skeletal muscle cell proliferation and differentiation on polypyrrole substrates doped with extracellular matrix components. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5292-5304, 2009.

GIRELLO, A. L.; KÜHN, T. I. B. Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária. In: (Ed.). **Fundamentos da imuno-hematologia eritrocitária**, 2002.

GRANT, B. W. A Multicountry Ecological Study of Cancer Incidence Rates in 2008 with Respect to Various Risk-Modifying Factors. **Nutrients**, v. 6, n. 1, 2014.

GUGGENBICHLER, J.-P. et al. A new technology of microdispersed silver in polyurethane induces antimicrobial activity in central venous catheters. **Infection**, v. 27, n. 1, p. S16-S23, 1999.

HAN, J. et al. Conducting polymer-noble metal nanoparticle hybrids: Synthesis mechanism application. **Progress in Polymer Science**, v. 70, p. 52-91, 2017/07/01/ 2017.

HAN, L. et al. A magnetic polypyrrole/iron oxide core/gold shell nanocomposite for multimodal imaging and photothermal cancer therapy. **Talanta**, v. 171, p. 32-38, 2017/08/15/ 2017.

HATHOUT, R. M. et al. Dual stimuli-responsive polypyrrole nanoparticles for anticancer therapy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 47, p. 176-180, 2018/10/01/ 2018.

HIBBERT, D. B. **Vocabulary of concepts and terms in chemometrics (IUPAC Recommendations 2016)**. Pure and Applied Chemistry. 88: 407 p. 2016.

HRUSHESKY, W. J. M. et al. Season, Sun, Sex, and Cervical Cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 14, n. 8, p. 1940, 2005.

HUANG, K.-J. et al. A sensitive electrochemical DNA biosensor based on silver nanoparticles-polydopamine@graphene composite. **Electrochimica Acta**, v. 118, p. 130-137, 2014/02/01/ 2014.

HÜMMELGEN, I. A.; ROMAN, L. S.; LIMA, J. R. D. Polímeros conjugados como camada ativa de diodos emissores de luz e fotodetectores. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 8, n. 3, p. 55-63, 1998.

HUMPOLÍČEK, P. et al. The biocompatibility of polyaniline and polypyrrole: A comparative study of their cytotoxicity, embryotoxicity and impurity profile. **Materials Science and Engineering: C**, v. 91, p. 303-310, 2018/10/01/ 2018.

IARC, W. G. O. T. E. O. C. R. T. H. Alcohol consumption and ethyl carbamate. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, v. 96, p. 3, 2010.

_____. Radiation. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**, v. 100, n. PT D, p. 7, 2012.

IARC, W. G. O. T. E. O. C. R. T. H.; ORGANIZATION, W. H.; CANCER, I. A. F. R. O. **Tobacco smoke and involuntary smoking**. Iarc, 2004.

JAIN, P. K. et al. Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 12, p. 1578-1586, 2008/12/16 2008.

JANG, J. **Conducting Polymer Nanomaterials and Their Applications**. Berlin, Heidelberg: Springer, 2016.

JIN, Y. et al. Multifunctional nanoparticles as coupled contrast agents. **Nature Communications**, v. 1, n. 1, p. 41, 2010/07/27 2010.

JING, S. et al. Synthesis and characterization of Ag/polypyrrole nanocomposites based on silver nanoparticles colloid. **Materials Letters**, v. 61, n. 23, p. 4528-4530, 2007/09/01/ 2007.

JORDE, L. B. **Genética médica**. Elsevier Brasil, 2004.

JOY, N. et al. Conducting Polymers: Biomedical Applications. **Bio-based Plastics–Materials and Applications**, 2017.

JU, E. et al. Tumor Microenvironment Activated Photothermal Strategy for Precisely Controlled Ablation of Solid Tumors upon NIR Irradiation. **Advanced Functional Materials**, v. 25, n. 10, p. 1574-1580, 2015.

KATE, K. H. et al. Nano-Silver Mediated Polymerization of Pyrrole: Synthesis and Gas Sensing Properties of Polypyrrole (PPy)/Ag Nano-Composite. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, n. 9, p. 7863-7869, // 2011.

KAUSAITE-MINKSTIMIENE, A. et al. Evaluation of chemical synthesis of polypyrrole particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 483, p. 224-231, 2015/10/20/ 2015.

KOSTIĆ, R. et al. Vibrational spectroscopy of polypyrrole, theoretical study. **The Journal of Chemical Physics**, v. 102, n. 8, p. 3104-3109, 1995/02/22 1995.

KUMAR, D.; SHARMA, R. C. Advances in conductive polymers. **European Polymer Journal**, v. 34, n. 8, p. 1053-1060, 1998/08/01/ 1998.

LAKARD, S. et al. Adhesion and proliferation of cells on new polymers modified biomaterials. **Bioelectrochemistry**, v. 62, n. 1, p. 19-27, 2004.

LAMPRAKOPOULOS, S. et al. An FTIR study of the role of H₂O and D₂O in the aging mechanism of conductive polypyrroles. **Synthetic Metals**, v. 144, n. 3, p. 229-234, 2004/08/13/ 2004.

LAUBY-SECRETAN, B. et al. Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 8, p. 794-798, 2016/08/25 2016.

LEE, J.-W. et al. Carboxylic Acid-Functionalized Conductive Polypyrrole as a Bioactive Platform for Cell Adhesion. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 6, p. 1692-1695, 2006/06/01 2006.

LEPIQUE, A. P.; RABACHINI, T.; VILLA, L. L. HPV vaccination: the beginning of the end of cervical cancer?-A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 1-10, 2009.

LI, X.; HUANG, M.; XIE, Y. Synthesis, Properties and Application of Conducting PPY Nanoparticles. In: SHI, D. (Ed.). **NanoScience in Biomedicine**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. p.568-587.

LI, Y. Effect of anion concentration on the kinetics of electrochemical polymerization of pyrrole. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 433, n. 1, p. 181-186, 1997/08/15/ 1997.

LIAO, H.; NEHL, C. L.; HAFNER, J. H. Biomedical applications of plasmon resonant metal nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 1, n. 2, p. 201-208, 2006/08/01 2006.

LINFORD, R. G. **Electrochemical science and technology of polymers**. Springer, 1990.

LIU, Y.-C.; CHUANG, T. C. Synthesis and Characterization of Gold/Polypyrrole Core-Shell Nanocomposites and Elemental Gold Nanoparticles Based on the Gold-Containing Nanocomplexes Prepared by Electrochemical Methods in Aqueous Solutions. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 45, p. 12383-12386, 2003/11/01 2003.

LÖFFLER, S. et al. Conjugated Oligo- and Polymers for Bacterial Sensing. **Frontiers in chemistry**, v. 7, p. 265-265, 2019.

LUNDIN, V. et al. Control of Neural Stem Cell Survival by Electroactive Polymer Substrates. **PLOS ONE**, v. 6, n. 4, p. e18624, 2011.

LUNDSTEDT, T. et al. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 42, n. 1, p. 3-40, 1998/08/24/ 1998.

MACDIARMID, A. G. "Synthetic Metals": A Novel Role for Organic Polymers (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 40, n. 14, p. 2581-2590, 2001.

MAHMOUDI, M. et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 1, p. 24-46, 2011/01/01/ 2011. >.

MAIA, D. J. et al. Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras. **Química Nova**, 2000.

MAIA, R. C. B.; SILVEIRA, B. L.; DE CARVALHO, M. F. A. Câncer do colo do útero: papel do enfermeiro na estratégia e saúde da família. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 9, n. 1, p. 348-372, 2018.

MAJUMDAR, G. et al. Au Nanoparticles and Polyaniline Coated Resin Beads for Simultaneous Catalytic Oxidation of Glucose and Colorimetric Detection of the Product. **Langmuir**, v. 21, n. 5, p. 1663-1667, 2005/03/01 2005.

MANDI, U. et al. Ag@ polypyrrole: A highly efficient nanocatalyst for the N-alkylation of amines using alcohols. **Journal of colloid and interface science**, v. 467, p. 291-299, 2016.

MARÁKOVÁ, N. et al. Antimicrobial activity and cytotoxicity of cotton fabric coated with conducting polymers, polyaniline or polypyrrole, and with deposited silver nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 396, p. 169-176, 2017.

MASUDA, T.; HIGASHIMURA, T. Synthesis of high polymers from substituted acetylenes: exploitation of molybdenum- and tungsten-based catalysts. **Accounts of Chemical Research**, v. 17, n. 2, p. 51-56, 1984/02/01 1984.

MATTOSO, L. H. C. Polianilinas: síntese, estrutura e propriedades. **Química nova**, v. 19, n. 4, p. 388-399, 1996.

MEDEIROS, E. S. et al. Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 1: Introdução aos polímeros condutores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 7, n. 2, p. 62-77, 2012.

MELO, C. P. **Polímeros Condutores**. Revista Ciência Hoje. Brasil: Revista de Divulgação Científica da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. 6: 39-47 p. 1987.

MELO JR, M. A. et al. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, 2012.

MILLER, J.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. Pearson Education Limited, 2011.

MÎNDROIU, M. et al. The effect of deposition electrolyte on polypyrrole surface interaction with biological environment. **Applied Surface Science**, v. 276, p. 401-410, 2013/07/01/ 2013.

MOORE, G. E.; WOODS, L. K. Culture media for human cells—RPMI 1603, RPMI 1634, RPMI 1640 and GEM 1717. **TCA manual / Tissue Culture Association**, v. 3, n. 1, p. 503-509, March 01 1977.

MUÑOZ-ROJAS, D. et al. Shaping hybrid nanostructures with polymer matrices: the formation mechanism of silver–polypyrrole core/shell nanostructures. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 7, p. 2078-2086, 2011.

NALWA, H. S. **Handbook of organic conductive molecules and polymers**. Wiley, 1997.

NATTA, G.; CORRADINI, P.; BASSI, I. W. CRYSTAL STRUCTURE OF THE COMPLEX (C₅H₅)₂TiCl₂Al (C₂H₅)₂. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 3, p. 755-756, 1958.

NEZAKATI, T. et al. Conductive polymers: opportunities and challenges in biomedical applications. **Chemical reviews**, v. 118, n. 14, p. 6766-6843, 2018.

O'MULLANE, A. P. et al. Fabrication and electrocatalytic properties of polyaniline/Pt nanoparticle composites. **Chemical Communications**, n. 14, p. 1606-1607, 2004.

OLIVEIRA, L. V. F.; CAMILO, F. F. Facile synthesis of silver-polypyrrole nanocomposites: Use of ionic liquid as solvent and template. **Synthetic Metals**, v. 247, p. 219-227, 2019/01/01/ 2019.

OLSSON, M. L. et al. Genomic analysis of clinical samples with serologic ABO blood grouping discrepancies: identification of 15 novel A and B subgroup alleles. **Blood**, v. 98, n. 5, p. 1585-1593, 2001.

OMRAN, A. R. The Epidemiologic Transition: A Theory of the Epidemiology of Population Change. **The Milbank Memorial Fund Quarterly**, v. 49, n. 4, p. 509-538, 1971.

PADILLA, R. M. A. **Estudo de transporte de carga de polímeros de polianilina**. 2011. PUC-Rio

PEDRO, G. C. et al. A novel nucleic acid fluorescent sensing platform based on nanostructured films of intrinsically conducting polymers. **Analytica Chimica Acta**, v. 1047, p. 214-224, 2019/01/24/ 2019.

PEER, D. et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, v. 2, p. 751, 12/01/online 2007.

PIMENTEL, A. V. et al. Percepção da vulnerabilidade entre mulheres com diagnóstico avançado do câncer do colo do útero. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 20, n. 2, p. 255-262, 2011.

PINHO, A. D. A.; FRANÇA-JÚNIOR, I. Prevenção do câncer do colo de útero: um modelo teórico para analisar acesso e a utilização do teste de Papanicolaou. 2003.

RAMANAVICIENE, A. et al. Biocompatibility of polypyrrole particles: an in-vivo study in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 2, p. 311-315, 2007/02/01 2007.

RAMANAVICIUS, A. et al. Electrochemical impedance spectroscopy of polypyrrole based electrochemical immunosensor. **Bioelectrochemistry**, v. 79, n. 1, p. 11-16, 2010.

RAMANAVICIUS, A.; KAUSAITE, A.; RAMANAVICIENE, A. Self-encapsulation of oxidases as a basic approach to tune the upper detection limit of amperometric biosensors. **Analyst**, v. 133, n. 8, p. 1083-1089, 2008.

RODRIGUES, B. Y. M. et al. CÂNCER DE COLO DE ÚTERO COM EVOLUÇÃO PARA CÂNCER VULVAR: UM RELATO DE CASO. **CIPEEX**, p. 835-841, 2018.

SALABAT, A. et al. A novel methodology for fabrication of Ag-polypyrrole core-shell nanosphere using microemulsion system and evaluation of its antibacterial application. **New Journal of Chemistry**, v. 41, n. 21, p. 12892-12900, 2017.

SANTA-CRUZ, P.; TELES, F. Spectra Lux Software. Versão 2.0, RENAMI. 2003.

SANTOS, R. F. et al. Visible luminescence in polyaniline/(gold nanoparticle) composites. **Journal of nanoparticle research**, v. 15, n. 1, p. 1408, 2013..

SCHIFFMAN, M. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 370, n. 9590, p. 890-907, 2007/09/08/ 2007.

SHIRAKAWA, H.; IKEDA, S. Cyclotrimerization of acetylene by the tris (acetylacetonato) titanium (III)-diethylaluminum chloride system. **Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition**, v. 12, n. 5, p. 929-937, 1974.

SHIRAKAWA, H. et al. Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH). **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 16, p. 578-580, 1977.

SIH, B. C.; WOLF, M. O. Metal nanoparticle—conjugated polymer nanocomposites. **Chemical Communications**, n. 27, p. 3375-3384, 2005.

SILVA, I. N. D. C. J. A. G. D. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. **Coordenação de Prevenção e Vigilância**, 2017.

SOARES, E. M.; RIUL DA SILVA, S. Perfil de pacientes com câncer ginecológico em tratamento quimioterápico. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 63, n. 4, 2010.

SOARES, J. C. **Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da urease em filmes de polipirrol**. 2011. Universidade de São Paulo

SOUSA, A. C. D. O. et al. CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CITOPATOLÓGICAS E FATORES DE RISCOS ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE COLO UTERO. **REVISTA UNINGÁ REVIEW**, v. 30, n. 1, 2018.

STEJSKAL, J. **Conducting polymer-silver composites**. *Chemical Papers*. 67: 814 p. 2013.

STEWART, E. M. et al. Inhibition of smooth muscle cell adhesion and proliferation on heparin-doped polypyrrole. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 1, p. 194-200, 2012/01/01/ 2012.

SU, W.-P.; SCHRIEFFER, J.; HEEGER, A. Soliton excitations in polyacetylene. **Physical Review B**, v. 22, n. 4, p. 2099, 1980.

SU, W. P.; SCHRIEFFER, J.; HEEGER, A. J. Solitons in polyacetylene. **Physical review letters**, v. 42, n. 25, p. 1698, 1979.

SURYAWANSHI, A. J. et al. Template free method for the synthesis of Ag-PPy core-shell nanospheres with inherent colloidal stability. **Synthetic Metals**, v. 197, p. 134-143, 2014/11/01/ 2014.

TAN, Y.; GHANDI, K. Kinetics and mechanism of pyrrole chemical polymerization. **Synthetic Metals**, v. 175, p. 183-191, 2013/07/01/ 2013.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, p. 338-350, 2006.

TIAN, B. et al. Photothermally Enhanced Photodynamic Therapy Delivered by Nano-Graphene Oxide. **ACS Nano**, v. 5, n. 9, p. 7000-7009, 2011/09/27 2011.

TOKUMASU, F. et al. Modifications in erythrocyte membrane zeta potential by Plasmodium falciparum infection. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 2, p. 245-251, 2012/06/01/ 2012.

UPADHYAY, J.; KUMAR, A. Investigation of structural, thermal and dielectric properties of polypyrrole nanotubes tailoring with silver nanoparticles. **Composites Science and Technology**, v. 97, p. 55-62, 2014/06/16/ 2014.

UPADHYAY, J. et al. Antibacterial and hemolysis activity of polypyrrole nanotubes decorated with silver nanoparticles by an in-situ reduction process. **Materials Science and Engineering: C**, v. 54, p. 8-13, 2015/09/01/ 2015.

VAITKUVIENE, A. et al. Evaluation of cytotoxicity of polypyrrole nanoparticles synthesized by oxidative polymerization. **Journal of Hazardous Materials**, v. 250-251, p. 167-174, 2013/04/15/ 2013.

VENGELEN-TYLER, V. AABB technical manual. **Thirteen edition American Association of Blood Banks, Bethesda**, p. p697-700, 2002.

VERA CANDIOTI, L. et al. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123-138, 2014/06/15/ 2014.

WALTMAN, R.; BARGON, J. Electrically conducting polymers: a review of the electropolymerization reaction, of the effects of chemical structure on polymer film properties, and of applications towards technology. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 76-95, 1986.

WANG, C. et al. Iron Oxide @ Polypyrrole Nanoparticles as a Multifunctional Drug Carrier for Remotely Controlled Cancer Therapy with Synergistic Antitumor Effect. **ACS Nano**, v. 7, n. 8, p. 6782-6795, 2013/08/27 2013.

WANG, X. et al. Evaluation of biocompatibility of polypyrrole in vitro and in vivo. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 68A, n. 3, p. 411-422, 2004/03/01 2004.

WEN, J. et al. Synthesis of polypyrrole nanoparticles and their applications in electrically conductive adhesives for improving conductivity. **RSC Advances**, v. 7, n. 84, p. 53219-53225, 2017.

WHO, W. H. O. **Global Health Observatory**. Geneva 2018.

WILKINSON, L. Revising the Pareto Chart. **The American Statistician**, v. 60, n. 4, p. 332-334, 2006/11/01 2006.

WYSOCKA-ŻOŁOPA, M.; WINKLER, K. Electrochemical synthesis and properties of conical polypyrrole structures. **Electrochimica Acta**, v. 258, p. 1421-1434, 2017/12/20/ 2017.

XING, S.; ZHAO, G. One-step synthesis of polypyrrole–Ag nanofiber composites in dilute mixed CTAB/SDS aqueous solution. **Materials Letters**, v. 61, n. 10, p. 2040-2044, 2007/04/01/ 2007.

XU, J. et al. Decorating Polypyrrole Nanotubes with Au Nanoparticles by an In Situ Reduction Process. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 30, n. 11, p. 936-940, 2009.

XU, L. et al. Conjugated polymers for photothermal therapy of cancer. **Polymer Chemistry**, v. 5, n. 5, p. 1573-1580, 2014.

XU, L. et al. Construction of polypyrrole-based multifunctional nanocomposite for dual-modal imaging and enhanced synergistic phototherapy against cancer cells. **Langmuir**, 2019.

YANG, K. et al. Correction: In Vitro and In Vivo Near-Infrared Photothermal Therapy of Cancer Using Polypyrrole Organic Nanoparticles. **Advanced Materials**, v. 25, n. 7, p. 945-945, 2013.

YANG, Y. et al. Polypyrrole-Decorated Ag-TiO₂ Nanofibers Exhibiting Enhanced Photocatalytic Activity under Visible-Light Illumination. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 5, n. 13, p. 6201-6207, 2013/07/10 2013.

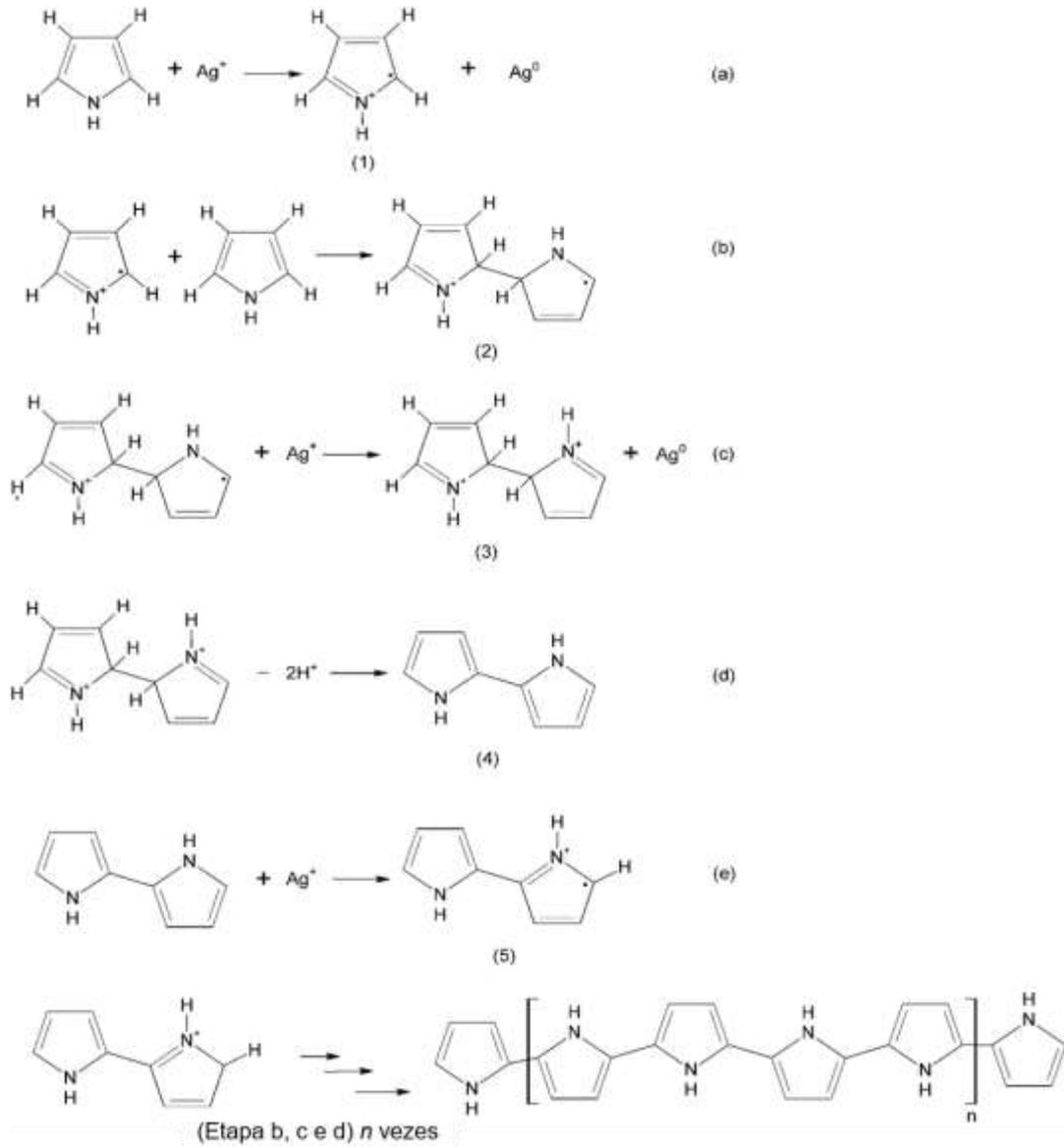
YANG, Z.-G.; SUN, H.-X.; FANG, W.-H. Haemolytic activities and adjuvant effect of Astragalus membranaceus saponins (AMS) on the immune responses to ovalbumin in mice. **Vaccine**, v. 23, n. 44, p. 5196-5203, 2005/10/25/ 2005.

YE, S. et al. pH-responsive luminescent properties of Ag@ PPy nanoparticles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 10, p. 4668-4673, 2011.

ZHA, Z. et al. Uniform Polypyrrole Nanoparticles with High Photothermal Conversion Efficiency for Photothermal Ablation of Cancer Cells. **Advanced Materials**, v. 25, n. 5, p. 777-782, 2013/02/06 2013.

ZOPPI, R. A.; DE PAOLI, M. A. Aplicações tecnológicas de polímeros intrinsecamente condutores: perspectivas atuais. **Química nova**, v. 16, n. 6, p. 560-569, 1993.

ANEXO A – MECANISMO PROPOSTO PARA A POLIMERIZAÇÃO DO PIRROL
POR Ag^+



Fonte: (Oliveira e Camilo, 2019)

APÊNDICE A – COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DE PROJETO AO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS

CENTRO UNIVERSITÁRIO DR.
LEÃO SAMPAIO - UNILEÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE COMPÓSITO AG/PPY SOBRE CÉLULAS HUMANAS

Pesquisador: VANDERLAN NOGUEIRA HOLANDA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 06959119.8.0000.5048

Instituição Proponente: INSTITUTO LEAO SAMPAIO DE ENSINO UNIVERSITARIO LTDA

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.187.826

Apresentação do Projeto:

O projeto consiste na avaliação do efeito de um compósito sintetizado a base de polipirrol e nanopartícula de prata sobre células do sangue humano, dos fenótipos A, B, AB e O. A pesquisa será realizada através da coleta de 5 mL de sangue humano e, posteriormente, teste in vitro, do potencial hemolítico do material sobre as hemácias. Serão utilizados controles de hemólise (Triton X-100) e ausência de hemólise (solução de cloreto de sódio a 0,9%).

Objetivo da Pesquisa:

O projeto tem por objetivo primário determinar o percentual de hemólise de compósito Ag/Polipirrol em amostras de sangue humano do tipo A, B, AB e O.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Durante a realização da pesquisa, os participantes poderão sofrer alguns danos como ocorrência de hematoma, lesão de terminações nervosas próximo do local da coleta, ocorrência de dor, ocorrência de irritação no local da punção. Os benefícios da participação da pesquisa será a elucidação do potencial hemolítico do poli pirrol e nanopartícula de prata e identificar/informar o fator Rh aos participantes que desejarem.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa é consistente e relevante para a área de Ciências Biológicas, Biomédicas e da Saúde. A proposta é de grande importância na pesquisa de novos compostos com potencial

Endereço: Av. Maria Leticia Leite Pereira, s/n
Bairro: Planalto **CEP:** 63.010-970
UF: CE **Município:** JUAZEIRO DO NORTE
Telefone: (88)2101-1033 **Fax:** (88)2101-1033 **E-mail:** cep.leaosampalo@leaosampalo.edu.br

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DR.
LEÃO SAMPAIO - UNILEÃO**



Continuação do Parecer: 3.187.826

terapêutico ou de auxiliar diagnóstico. Os objetivos e justificativa estão bem fundamentados, assim como o método adotado pelos pesquisadores. As medidas visam a segurança dos participantes em todas as etapas e seguem os princípios éticos estabelecidos por lei.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória estão disponíveis, junto do projeto. As informações estão adequadas. Quanto documentos, são eles:

1. Informações básicas sobre o projeto;
2. Projeto detalhado;
3. TCLE
4. Folha de rosto.

Recomendações:

Não apresento recomendações para o presente projeto de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente projeto de pesquisa está adequado, com objetivos e métodos consistentes de acordo com as normas éticas da legislação brasileira.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1286841.pdf	03/02/2019 22:17:46		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado.pdf	03/02/2019 22:16:37	VANDERLAN NOGUEIRA HOLANDA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Texto_teste.pdf	03/02/2019 20:59:11	ELTON MARLON DE ARAUJO LIMA	Aceito
Folha de Rosto	Vanderlan.pdf	29/01/2019 17:38:47	VANDERLAN NOGUEIRA HOLANDA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Maria Leticia Leite Pereira, s/n
 Bairro: Planalto CEP: 63.010-970
 UF: CE Município: JUAZEIRO DO NORTE
 Telefone: (88)2101-1033 Fax: (88)2101-1033 E-mail: cep.leosampaio@leosampaio.edu.br

CENTRO UNIVERSITÁRIO DR.
LEÃO SAMPAIO - UNILEÃO



Continuação do Parecer: 3.187.826

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JUAZEIRO DO NORTE, 09 de Março de 2019

Assinado por:

MARCIA DE SOUSA FIGUEREDO TEOTONIO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Maria Leticia Leite Pereira, s/n
Bairro: Planalto CEP: 63.010-970
UF: CE Município: JUAZEIRO DO NORTE
Telefone: (88)2101-1033 Fax: (88)2101-1033 E-mail: cep.leafosampalo@leafosampalo.edu.br