

**Universidade Federal de Itajubá**  
**Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Química**

CARLA JÚNIA SANTOS

Estudo da atividade anti-angiogênica de tungstato de  
zinco sintetizado por rota química

Itajubá  
2018

**Universidade Federal de Itajubá**

CARLA JÚNIA SANTOS

Estudo da atividade anti-angiogênica de tungstato de zinco sintetizado por rota química

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação Multicêntrico em Química como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Química.

Área de concentração: Ciência dos Materiais

Orientador: Prof. Dr. Francisco Moura Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Cristian Ferreira Soares

Itajubá

2018

*Dedico este trabalho à minha maior mestre,  
minha querida avó, Zorita Martins dos Santos (in memoriam).*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus e a Nossa Senhora, por me permitirem chegar até aqui.

Agradeço às instituições Rede Mineira de Química, UNIFEI, UFMG e à FAPEMIG pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

Aos meus orientadores, Professores Dr. Francisco Moura e Dr. Daniel Cristian pela oportunidade, pela confiança e pelo apoio.

Aos Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior (UFMG), Prof. Dr. André Luis Branco de Barros (UFMG) e Prof. Dr. Elson Longo (LIEC/UFSCar) pela disponibilidade, cooperação e por cederem gentilmente a infraestrutura dos seus laboratórios.

À Lilian Leal (UNIFEI), ao Dr. Diogo Coelho de Pádua Oliveira, ao Pablo Santana (LIEC/UFSCar), ao Vinicius Viana (UFMG) e à Marcela Ribeiro (UFMG) pelo apoio durante as etapas da padronização de algumas técnicas utilizadas nesse trabalho.

Aos colegas do LIMAV e do Laboratório de Bioengenharia por todo o apoio durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos técnicos e anistiados da UNIFEI, Jordânio, Geane, Fábio, Nilson, Sr. Jesue e Sr. Nilo pelo apoio e disponibilidade em diversos momentos durante a realização desse trabalho.

Aos amigos que a Unifei me proporcionou Franciyelen Guimarães, Fernanda Magalhães, Lilian Leal, Wivyan Castro, Yanka Reis, Dielly Araújo, Nádia Leão e Everson Júnio agradeço pela amizade, pelo companheirismo em todos os momentos e por tornarem a rotina (tão pesada) mais leve.

Agradeço às minhas filhas Carolina Alves e Gabriela Almeida agradeço pelo amor sublime e incondicional e por fazerem renascer diariamente em mim o amor e a esperança.

Agradeço à minha família pelo amor, liberdade e educação, pelo exemplo de simplicidade e honestidade, sem os quais eu não teria chegado até aqui.

*“É muito simples: só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos.”*

Disse a Raposa ao Pequeno Príncipe, em “O Pequeno Príncipe”.

Antoine de Saint-Exupéry

## RESUMO

Estudos recentes revelaram a melhora das propriedades de tungstato de zinco nanoestruturado em virtude de efeitos causados pela redução do tamanho. Embora as suas propriedades sejam exploradas desde a década de 1940, sua síntese ainda é realizada em temperaturas superiores a 150°C. Visando aperfeiçoar a sua obtenção e compreender a influência do tamanho nas propriedades físico-químicas e biológicas, nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub> foram sintetizadas através do método hidrotermal assistido por micro-ondas em temperaturas menores que 150°C, caracterizadas físico-química e morfológicamente e avaliadas em relação às suas propriedades biológicas, *in vitro* e *in vivo*. Análises espectroscópicas evidenciaram a obtenção de nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub> com estrutura monoclinica tipo wolframita, a temperaturas menores que 150°C. Foi demonstrada pela primeira vez a emissão fotoluminescente de nanopartículas desordenadas de ZnWO<sub>4</sub> na região amarelo-vermelho do espectro visível. Os ensaios de viabilidade celular com células normais de rim embrionário humano revelaram que as nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub>, nas concentrações testadas, não promoveram alterações na morfologia celular e não ocasionaram redução da viabilidade celular. Enquanto, o ensaio de apoptose demonstrou que nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub> não estimularam processos de morte celular por apoptose ou necrose. Complexos <sup>99m</sup>Tc-ZnWO<sub>4</sub> estáveis em meio biológico e em solução de NaCl 0,9% p/V foram produzidos e utilizados para estudos de biodistribuição em animais sadios e com tumor de Ehrlich. Os estudos evidenciaram o mesmo perfil de distribuição para animais sadios ou com tumor, marcado pela intensa captação do complexo por órgãos responsáveis pela eliminação de substâncias exógenas (baço, fígado e pulmão) e também revelaram intensa participação do sistema renal na depuração das nanopartículas. Em animais com tumor de Ehrlich houve captação expressiva de <sup>99m</sup>Tc-ZnWO<sub>4</sub> pelo tumor. Adicionalmente, foram avaliadas as propriedades anti-angiogênicas das nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub>, as quais apresentaram efeito anti-angiogênico, em baixas doses, no modelo de membrana corioalantoica de embrião de galinha. Juntos, os resultados do presente estudo demonstraram a eficiência da síntese hidrotermal assistida por micro-ondas na produção de nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub> e realçam a influência do tamanho e do estado de ordem-desordem estrutural nas propriedades físicas e biológicas do material. Adicionalmente, os estudos conduzidos *in vitro* e *in vivo*, sugerem que essas nanopartículas originam radiofármacos estáveis com <sup>99m</sup>Tc e apresentam características adequadas para a condução de estudos em modelos animais de tumores sólidos. **Palavras chaves:** tungstato de zinco, síntese hidrotermal assistida por micro-ondas, citotoxicidade, biodistribuição, angiogênese.

## ABSTRACT

Recent studies have revealed the improvement of the properties of nanostructured zinc tungstate due to the effects caused by the size reduction. Although their properties have been exploited since the 1940s, their synthesis is still carried out at temperatures above 150°C. In order to improve its obtaining and to understand the influence of size on the physico-chemical and biological properties, ZnWO<sub>4</sub> nanoparticles were synthesized by the microwave-assisted hydrothermal method at temperatures lower than 150°C, characterized physicochemically and morphologically and evaluated in relation to their biological properties, *in vitro* and *in vivo*. Spectroscopic analyzes evidenced the obtaining of ZnWO<sub>4</sub> nanoparticles with wolframite monoclinic structure, at temperatures lower than 150°C. It was demonstrated for the first time the photoluminescent emission of disordered nanoparticles of ZnWO<sub>4</sub> in the yellow-red region of the visible spectrum. Cell viability assays with normal human embryonic kidney cells revealed that ZnWO<sub>4</sub> nanoparticles at the concentrations tested did not promote changes in cell morphology and did not result in reduced cell viability, while the apoptosis assay demonstrated that ZnWO<sub>4</sub> nanoparticles did not stimulate cell death processes by apoptosis or necrosis. Stable <sup>99m</sup>Tc-ZnWO<sub>4</sub> complexes in biological medium and NaCl solution (0,9%) were produced and used for biodistribution studies in healthy and Ehrlich tumor animals. The studies evidenced the same distribution profile for healthy or tumor animals, marked by the intense uptake of the complex by organs responsible for the elimination of exogenous substances (spleen, liver and lung) and also revealed intense participation of the renal system in the purification of the nanoparticles. In animals with Ehrlich's tumor there was significant uptake of the <sup>99m</sup>Tc-ZnWO<sub>4</sub> by the tumor. Additionally, the anti-angiogenic properties of the ZnWO<sub>4</sub> nanoparticles were evaluated, which showed anti-angiogenic effect, in low doses, on the chicken embryo chorioallantoic membrane model. Together, the results of the present study demonstrated the efficiency of microwave-assisted hydrothermal synthesis in the production of ZnWO<sub>4</sub> nanoparticles and highlight the influence of size and structural order-disorder on the physical and biological properties of this material. In addition, studies conducted *in vitro* and *in vivo* suggest that these nanoparticles originate stable radiopharmaceuticals with <sup>99m</sup>Tc and have characteristics suitable for conducting studies in animal models of solid tumors.

**Key word:** zinc tungstate, microwave assisted hydrothermal synthesis, cytotoxicity, biodistribution, angiogenesis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Célula unitária de ZnWO <sub>4</sub> .	<b>Pag. 25</b>
<b>Figura 2</b> – Representação do sistema hidrotermal assistido por radiação micro-ondas utilizado nesse trabalho.	<b>Pag. 32</b>
<b>Figura 3</b> – Fluxograma do processo de síntese de NPs de ZnWO <sub>4</sub> através do método HAM.	<b>Pag. 33</b>
<b>Figura 4</b> – Suspensão de ZnWO <sub>4</sub> obtida através de reação de co-precipitação.	<b>Pag. 41</b>
<b>Figura 5</b> – Etapas de crescimento de nanocristais de ZnWO <sub>4</sub> .	<b>Pag. 45</b>
<b>Figura 6</b> – Aparência física de ZnWO <sub>4</sub> obtido através do método HAM.	<b>Pag. 46</b>
<b>Figura 7</b> - Padrões de DRX de amostras de ZnWO <sub>4</sub> sintetizadas através do método HAM	<b>Pag. 49</b>
<b>Figura 8</b> – Espectros Raman de amostras de ZnWO <sub>4</sub> sintetizadas através do método HAM.	<b>Pag. 55</b>
<b>Figura 9</b> – Espectro FT-IR de amostras de ZnWO <sub>4</sub> obtidas através do método HAM, no intervalo de 100 a 6000cm <sup>-1</sup> .	<b>Pag. 60</b>
<b>Figura 10</b> – Espectro FT-IR de amostras de ZnWO <sub>4</sub> obtidas através do método HAM, no intervalo de 200 a 1100cm <sup>-1</sup> .	<b>Pag. 62</b>
<b>Figura 11</b> – Espectros de fotoluminescência de nanopartículas de ZnWO <sub>4</sub> obtidas em diferentes temperaturas de síntese através do método HAM.	<b>Pag. 64</b>
<b>Figura 12</b> – Espectros de fotoluminescência de ZnWO <sub>4</sub> obtidos a 120, 130 e 140°C através do método HAM.	<b>Pag. 66</b>
<b>Figura 13</b> – Espectro de UV-Vis de ZnWO <sub>4</sub> sintetizado através de reação de co-precipitação.	<b>Pag. 74</b>
<b>Figura 14</b> – Espectro de UV-Vis de ZnWO <sub>4</sub> sintetizado a 120°C através do método HAM.	<b>Pag. 74</b>
<b>Figura 15</b> – Espectro de UV-Vis de ZnWO <sub>4</sub> sintetizado a 130°C através do método HAM.	<b>Pag. 75</b>
<b>Figura 16</b> – Espectro de UV-Vis de ZnWO <sub>4</sub> sintetizado a 140°C através do método HAM.	<b>Pag. 75</b>
<b>Figura 17</b> – Espectro de UV-Vis de ZnWO <sub>4</sub> sintetizado a 150°C através do método HAM.	<b>Pag. 76</b>
<b>Figura 18</b> – Espectros de absorção UV-Vis de nanopartículas de ZnWO <sub>4</sub>	<b>Pag. 77</b>

amorfo e cristalino.

- Figura 19** – Representação esquemática das transições eletrônicas de nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub> semicristalino. **Pag. 79**
- Figura 20** – Micrografia eletrônica de FEG SEM de ZnWO<sub>4</sub> obtidos através do método HAM a 120°C e a 130°C. **Pag. 84**
- Figura 21** – Micrografia eletrônica de FEG SEM de ZnWO<sub>4</sub> obtido através do método HAM a 140°C e 150°C. **Pag. 85**
- Figura 22** – Micrografia eletrônica de FEG SEM de ZnWO<sub>4</sub> obtido através do método HAM a 150°C. **Pag. 86**
- Figura 23** - Micrografias eletrônicas de transmissão de nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub> obtidas através de síntese HAM. **Pag. 87**
- Figura 24** - Micrografia eletrônica de transmissão de nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub> obtidas através de síntese HAM, a 150°C. **Pag. 88**
- Figura 25** - Micrografia eletrônica de transmissão de nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub> obtidas através do método HAM, a 120°C. **Pag. 90**
- Figura 26** - Micrografia eletrônica de transmissão de nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub> obtidas através do método HAM, a 130°C. **Pag. 90**
- Figura 27** - Micrografia eletrônica de transmissão de nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub> obtidas através do método HAM, a 140°C. **Pag. 91**
- Figura 28** - Micrografia eletrônica de transmissão de nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub> obtidas através do método HAM, a 150°C. **Pag. 91**
- Figura 29** – Distribuição dos tratamentos em placa de 12 poços para ensaio de viabilidade celular de NPs de ZnWO<sub>4</sub> em células HEK. **Pag. 100**
- Figura 30** – Distribuição dos tratamentos em placa de 12 poços para ensaio de mecanismo de morte celular de NPs de ZnWO<sub>4</sub> em células HEK. **Pag. 102**
- Figura 31** - Células HEK em diferentes estágios de desenvolvimento. **Pag. 105**
- Figura 32** – Micrografias de células HEK após 48 horas de inoculação dos diferentes tratamentos. **Pag. 107**
- Figura 33** – Histogramas de viabilidade celular de células HEK, após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações de nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub>. **Pag. 110**
- Figura 34** – Efeitos de ZnWO<sub>4</sub> após 24 horas, em linhagem de células HEK 293, através do ensaio de citometria de fluxo. **Pag. 112**
- Figura 35** – Efeitos de ZnWO<sub>4</sub> após 48 horas, em linhagem de células HEK **Pag. 113**

293, através do ensaio de citometria de fluxo.

**Figura 36** – Efeitos de  $ZnWO_4$  sobre a apoptose em linhagem de células HEK **Pag. 115**

293, após 48 horas, através do ensaio de citometria de fluxo.

**Figura 37** – Etapas da angiogênese. **Pag. 124**

**Figura 38** – Ovos embrionados utilizados no ensaio de atividade anti- **Pag. 134**

angiogênica em modelo de membrana corioalantoica.

**Figura 39** – Delineamento experimental do ensaio de atividade anti- **Pag. 135**

angiogênica em membrana corioalantóica de embrião de galinha.

**Figura 40** – Estabilidade de radiomarcção do complexo  $^{99m}Tc-ZnWO_4$ , em **Pag. 139**

função do tempo.

**Figura 41** – Depuração sanguínea do complexo  $^{99m}Tc-ZnWO_4$  em animais **Pag. 140**

sadios, após administração intravenosa.

**Figura 42** – Biodistribuição do complexo  $^{99m}Tc-ZnWO_4$  em diferentes órgãos **Pag. 143**

de camundongos sadios.

**Figura 43** – Imagens cintilográficas obtidas após a administração endovenosa **Pag. 145**

de  $^{99m}Tc-ZnWO_4$  em camundongos sadios.

**Figura 44** – Biodistribuição do complexo  $^{99m}Tc-ZnWO_4$  em diferentes órgãos **Pag. 147**

de camundongos com tumor de Ehrlich.

**Figura 45** – Relação alvo/não alvo após a administração do complexo  $^{99m}Tc-$  **Pag. 149**

$ZnWO_4$ .

**Figura 46** – Imagens cintilográficas obtidas após a administração endovenosa **Pag. 151**

de  $^{99m}Tc-ZnWO_4$  em camundongos com tumor de Ehrlich.

**Figura 47** - Efeito do tratamento com nanopartículas de tungstato de zinco, **Pag. 153**

$ZnWO_4$ , (1,0 $\mu$ g/mL, 10,0 $\mu$ g/mL e 20,0 $\mu$ g/mL) sobre a angiogênese em ensaio

da membrana corioalantoica.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Resumo dos protocolos de síntese hidrotermal para a obtenção de ZnWO <sub>4</sub> .	<b>Pag. 28</b>
<b>Tabela 2</b> – Propriedades físicas e químicas dos elementos constituintes de ZnWO <sub>4</sub> .	<b>Pag. 42</b>
<b>Tabela 3</b> - Comparação entre a posição experimental e teórica dos picos de difração.	<b>Pag. 51</b>
<b>Tabela 4</b> – Tamanho médio de cristalito para nanopartículas de ZnWO <sub>4</sub> obtidas através do método HAM.	<b>Pag. 53</b>
<b>Tabela 5</b> - Comparação entre os modos vibracionais Raman teóricos e experimentais de ZnWO <sub>4</sub> obtidos em diferentes temperaturas de síntese através do método HAM.	<b>Pag. 58</b>
<b>Tabela 6</b> – Valores máximos de emissão fotoluminescente para amostras de ZnWO <sub>4</sub> obtidas através do método HAM.	<b>Pag. 65</b>
<b>Tabela 7</b> – Valores máximos de emissão fotoluminescente para amostras de sólidos cristalinos de ZnWO <sub>4</sub> obtidas através de diferentes métodos de síntese.	<b>Pag. 72</b>
<b>Tabela 8</b> - Potencial zeta para amostras de ZnWO <sub>4</sub> obtidas através do método HAM a 120°C durante 60 minutos.	<b>Pag. 80</b>
<b>Tabela 9</b> – Distribuição do tamanho médio hidrodinâmico de ZnWO <sub>4</sub> obtido através de síntese HAM a 120°C durante 60 minutos.	<b>Pag. 82</b>
<b>Tabela 10</b> – Biodistribuição do complexo <sup>99m</sup> Tc-ZnWO <sub>4</sub> em diferentes órgãos de camundongos saudáveis.	<b>Pag. 144</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

SIDA - síndrome da imunodeficiência adquirida  
HAM - síntese hidrotermal assistida por micro-ondas  
NP – nanopartículas  
DRX - difração de raios X  
JCPDS - *Joint Committee on Powder Diffraction Standards*  
FTIR - espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier  
IR - infravermelho  
ATR - reflectância total atenuada  
LIEC - Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica  
UV-VIS - ultravioleta-visível  
DLS - espalhamento dinâmico da luz  
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais  
FEG-SEM - microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo  
IUPAC - THE INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY  
NOX - número de oxidação  
SHC - síntese hidrotermal convencional  
Egap - energia de “*band gap*” óptico  
DNA - ácido desoxirribonucleico  
SMF - sistema mononuclear fagocítico  
MET - microscopia eletrônica de transmissão  
HEK - células normais humanas de rim embrionário  
PBS - tampão salina-fosfato  
DMSO – dimetilsulfóxido  
V-PE - anexina V conjugada ao fluorocromo ficoeritrina  
7-AAD - 7-aminoactinomicina  
DMEM - meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco  
CN – controle negativo  
CP – controle positivo  
SSC - *side Scattering*  
FSC - *foward scattering*  
ANOVA – análise de variância

DP – desvio padrão

NS - não há diferença significativa

EPR - aumento da permeabilidade e retenção

MCA - membrana corioalantóica

INCA - Instituto Nacional do Câncer

FCFB - fator básico de crescimento de fibroblastos

FCFA - fator ácido de crescimento de fibroblastos

FCEV - fator de crescimento do endotélio vascular

FAT - fator de angiogênese tumoral

VEGF - fator de crescimento derivado do endotélio vascular

FDA - *Food and Drug Administration*

CCD - cromatografia de camada delgada

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG

DI – dose injetada

Int. – intestino

PEG – polietilenoglicol

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
Capítulo 1 .....	23
RESUMO .....	24
<b>1.1. INTRODUÇÃO</b> .....	25
<b>1.2. OBJETIVO GERAL</b> .....	30
<b>1.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	30
<b>1.3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
<b>1.3.1. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE ZnWO<sub>4</sub></b> .....	31
<b>1.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MORFOLÓGICA DE ZnWO<sub>4</sub></b> .....	33
<b>1.4.1. DIFRATOMETRIA DE RAIOS X</b> .....	33
<b>1.4.2. ESPECTROSCOPIAS VIBRACIONAIS</b> .....	35
<b>1.4.2.1 ESPECTROSCOPIA MICRO-RAMAN</b> .....	35
<b>1.4.2.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)</b> .....	36
<b>1.4.3. ESPECTROSCOPIA DE FOTOLUMINESCÊNCIA</b> .....	36
<b>1.4.4. ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA –VISÍVEL</b> .....	37
<b>1.4.5. POTENCIAL ZETA, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E TAMANHO HIDRODINÂMICO DAS PARTÍCULAS</b> .....	38
<b>1.4.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO</b> 38	
<b>1.4.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO</b> .....	39
<b>1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>1.5.1. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE ZnWO<sub>4</sub></b> .....	40
<b>1.5.2. DIFRATOMETRIA DE RAIOS X</b> .....	48
<b>1.5.3. ESPECTROSCOPIA RAMAN</b> .....	54
<b>1.5.4. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER</b> .....	59
<b>1.5.5. FOTOLUMINESCÊNCIA</b> .....	63
<b>1.5.6. ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA –VISÍVEL</b> .....	73
<b>1.5.7. POTENCIAL ZETA, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E TAMANHO HIDRODINÂMICO</b> .....	80
<b>1.5.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO</b> .	83
<b>1.5.9. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO</b> .....	86
<b>1.6. CONCLUSÃO PARCIAL</b> .....	93

Capítulo 2.....	94
<b>RESUMO</b> .....	95
<b>2.1. INTRODUÇÃO</b> .....	96
<b>2.2. OBJETIVO GERAL</b> .....	98
<b>2.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	98
<b>2.3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	99
<b>2.3.1. CULTIVO CELULAR</b> .....	99
<b>2.3.2. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR MICROSCOPIA ÓPTICA</b> .....	99
<b>2.3.3. ESTUDO DE VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO</b> .....	100
<b>2.3.4. ESTUDO DE MECANISMOS DE MORTE CELULAR ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO</b> .....	101
<b>2.3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	103
<b>2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	104
<b>2.4.1. CULTIVO CELULAR</b> .....	104
<b>2.4.2. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR</b> .....	106
<b>2.4.3. ESTUDO DE VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO</b> .....	108
<b>2.4.4. ESTUDO DE MECANISMOS DE MORTE CELULAR ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO</b> .....	114
<b>2.5. CONCLUSÃO PARCIAL</b> .....	116
Capítulo 3.....	117
<b>RESUMO</b> .....	118
<b>3.1. INTRODUÇÃO</b> .....	119
<b>3.1.1. CÂNCER E NANOMATERIAIS</b> .....	119
<b>3.1.2. RADIOISÓTOPOS E CÂNCER</b> .....	121
<b>3.1.3. ANGIOGÊNESE</b> .....	123
<b>3.2. OBJETIVO GERAL</b> .....	127
<b>3.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	127
<b>3.3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	128
<b>3.3.1. PREPARO E MARCAÇÃO DO COMPLEXO <sup>99m</sup>Tc-ZnWO<sub>4</sub></b> .....	128
<b>3.3.2. PUREZA RADIOQUÍMICA</b> .....	129
<b>3.3.3. ESTABILIDADE DA RADIOMARCAÇÃO <i>IN VITRO</i></b> .....	130
<b>3.3.3.1. ESTABILIDADE DA RADIOMARCAÇÃO EM SOLUÇÃO NaCl 0,9% (p/V)</b> 130	
<b>3.3.3.2. ESTABILIDADE DA RADIOMARCAÇÃO EM PLASMA <i>IN VITRO</i></b> .....	130

3.3.4.	ESTUDOS EM ANIMAIS .....	130
3.3.5.	DEPURAÇÃO PLASMÁTICA.....	131
3.3.6.	ESTUDOS EX VIVO DE BIODISTRIBUIÇÃO DE <sup>99m</sup> Tc-ZnWO <sub>4</sub> EM ANIMAIS SADIOS E COM TUMOR DE EHRLICH.....	131
3.3.7.	IMAGENS CINTILOGRÁFICAS EM ANIMAIS SADIOS E COM TUMOR DE EHRLICH.....	132
3.3.8.	ESTUDOS COM ANIMAIS CONTENDO TUMOR DE EHRLICH .....	132
3.3.9.	ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-ANGIOGÊNICA EM MODELO DE MEMBRANA CORIOALANTOICA DE EMBRIÃO DE GALINHA .....	133
3.3.9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	136
3.4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	137
3.4.1.	PUREZA RADIOQUÍMICA DA RADIOMARCAÇÃO DO COMPLEXO <sup>99m</sup> Tc-ZnWO <sub>4</sub> 137	
3.4.2.	ESTABILIDADE DA RADIOMARCAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....	138
3.4.3.	DEPURAÇÃO PLASMÁTICA.....	139
3.4.4.	BIODISTRIBUIÇÃO E IMAGENS CINTILOGRÁFICAS DO COMPLEXO <sup>99m</sup> Tc-ZnWO <sub>4</sub> EM ANIMAIS SADIOS .....	142
3.4.5.	BIODISTRIBUIÇÃO E IMAGENS CINTILOGRÁFICAS DO COMPLEXO <sup>99m</sup> Tc-ZnWO <sub>4</sub> EM ANIMAIS COM TUMOR DE EHRLICH.....	146
3.4.6.	ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-ANGIOGÊNICA EM MODELO DE MEMBRANA CORIOALANTOICA DE EMBRIÃO DE GALINHA .....	152
3.5.	CONCLUSÃO PARCIAL .....	156
	CONCLUSÃO .....	157
	TRABALHOS FUTUROS.....	158
	REFERÊNCIAS .....	159
	ANEXO A.....	177

## INTRODUÇÃO

Em diferentes momentos da sua história, a humanidade participou de revoluções sociais, econômicas e científico-tecnológicas as quais embora ocorram em âmbitos distintos, caracterizam-se pela mudança de paradigmas, de verdades, de leis que regem os fenômenos envolvidos. Nas revoluções científicas, o homem, em sua incessante busca pelo conhecimento, ao propor novas leis mais avançadas do que as anteriores, deve ser capaz de explicar fenômenos ainda não completamente compreendidos e agregar conhecimento sobre fenômenos ainda inexplicados. As novas ponderações científicas, para comporem uma revolução, devem ser capazes de promover mudanças significativas sobre a economia e a sociedade como um todo. Nesse ínterim, insere-se a revolução da nanociência e da nanotecnologia, a revolução científica iniciada no século passado. Como toda revolução científica, é um processo gradual e lento, que para consolidar-se necessita de gerar conhecimento e materiais inteligentes capazes de resolver problemas enfrentados pela sociedade moderna em diferentes áreas econômicas, como energias renováveis, despoluição do ar, de rios e de efluentes, diagnóstico precoce e tratamento de doenças com elevada mortalidade associada, dentre outros.

Nesse ínterim, as revoluções devem proporcionar também o aprimoramento das propriedades de materiais já estudados, de maneira a transformá-los em produtos comercialmente importantes, com tecnologias capazes de aprimorar sistemas já disponíveis no mercado, dentre os quais dispositivos fotoluminescentes e eletrônicos miniaturizados para aplicações em telecomunicações, armazenamento de dados, sensores de gases tóxicos, fotocatalise de poluentes, agentes de terapia e diagnóstico de doenças, etc. (HE et al. 2016; HUANG et al. 2016; LONGO, E. et al. 2014; SONG et al. 2010; ZHENG et al. 2010).

Nanomateriais estão cada vez mais presentes em nossa rotina diária, seja em forma de cosméticos, sistemas de liberação de fármacos, na terapia de algumas doenças, em dispositivos eletrônicos, dentre outros (BEIK et al. 2016; CZUPRYNA; TSOURKAS, 2006; JIN; YE, 2007; MAIER-HAUFF et al. 2011; PERUGINI et al., 2002; PROW et al., 2006). Uma série de aplicações tecnológicas interessantes e de grande valor agregado é proposta para esses materiais, tais como, sensores, lasers, células solares, remoção de corantes de efluentes, e, em química medicinal, nanomateriais como lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas de óxidos de metais e não-metals, nanotubos de carbono, pontos quânticos, dentre outros são frequentemente propostas como sistemas de liberação de fármacos, como agentes citotóxicos para uso em quimioterapia, diagnóstico de imagem e como agentes de

contraste em ressonância magnética (PARK; WEBSTER, 2005; PORTNEY; OZKAN, 2006; SENGUL; THEIS; GHOSH, 2008).

Diversos materiais são explorados nessa revolução nanotecnológica, como metais, pontos quânticos, nanotubos de carbono, óxidos semicondutores, contudo, é notável o aumento do uso de óxidos semicondutores em uma gama de materiais tecnológicos. Em especial, nota-se o avanço das pesquisas abrangendo compostos denominados óxidos complexos, dentre os quais os tungstatos, compostos de fórmula geral  $A_xWO_4$  ( $X = 1$ , se NOX de  $A = 2^+$ ;  $X = 2$ , se NOX de  $A = 1^+$ ), onde A representa o cátion metálico, que atraem cada vez mais o interesse de diversos centros de pesquisa, devido às suas inúmeras propriedades físicas e químicas, que os tornam potenciais candidatos para aplicações não somente tecnológicas, mas também em química medicinal.

Nos últimos anos, atenção especial foi dada às propriedades de tungstatos nanoestruturados devido à observação de melhora de algumas propriedades em virtude dos efeitos causados pela redução do tamanho do material (DUTTA; RAVAL, 2018; GARADKAR et al. 2013; HE et al. 2016; LIU et al. 2017; PEREIRA et al. 2018).

As propriedades físicas e químicas de óxidos semicondutores, tais como tungstatos, podem ser controladas modificando-se o seu estado cristalino, o tamanho das partículas e a sua composição, essas modificações, por sua vez, são possíveis alterando-se o método, o tempo, a temperatura de síntese, e ainda adicionando-se dopantes na estrutura dos materiais. Nesse ínterim, pesquisadores buscam aprimorar técnicas de síntese de nanopartículas que possibilitem a obtenção desses materiais com baixo custo, sobretudo no que tange os custos com energia, uma vez que o fenômeno de formação da maioria dos óxidos em seu estado cristalino requer o fornecimento de energia em forma de calor, geralmente.

No passado, a síntese de óxidos semicondutores, inevitavelmente, exigia o uso de elevadas temperaturas, longos períodos de processamento e elevado consumo de energia. Todas essas exigências são consequência da lenta difusão de íons na maioria dos sólidos, a baixas temperaturas, e da necessidade de superar as elevadas forças de atração coulombianas entre os íons dos precursores. Os métodos químicos de síntese, dentre os quais a síntese hidrotérmica, surgiram como uma tentativa de minimizar esses problemas (SHRIVER et al. 2008).

A síntese hidrotermal surgiu na Europa no final do século 19 e início do século 20 e caracteriza-se por ser um método de síntese de óxidos em fase líquida, dentro de um sistema fechado (BYRAPPA; YOSHIMURA, 2001), cujos precursores moleculares ou iônicos proporcionam, durante a reação química, a nucleação e o crescimento das nanopartículas de

interesse, experimentalmente esse tipo de método favorece o controle sob a fase desejada, a morfologia e o tamanho das partículas (SENGUL; THEIS; GHOSH, 2008).

Historicamente, a síntese hidrotermal divide-se em convencional e assistida por micro-ondas. A primeira técnica explorada por pesquisadores para a obtenção de materiais micro e nanoestruturados foi a síntese hidrotermal convencional, caracterizada pelo uso de autoclaves de aço e longos tempos para a obtenção de materiais nanoestruturados devido a lenta velocidade de reação e à presença de intensos gradientes térmicos por toda a solução (SEGAL, 1989). Uma década após a descoberta das micro-ondas, em 1940, pelos pesquisadores John Turton Randall, Henry Albert Howard e James Sayers da Universidade de Birmingham na Inglaterra (BLANCHARD; GALATI; GENDEREN, 2013), esse novo tipo de radiação passou a ser empregado em síntese de óxidos cerâmicos, revelando uma série de vantagens sobre os métodos convencionais de síntese de óxidos, mas, sobretudo, a introdução das micro-ondas em síntese possibilitou a redução significativa do tempo e da temperatura de síntese.

A síntese hidrotermal de óxidos semicondutores, a partir de agora descrita como síntese hidrotermal assistida por micro-ondas (HAM), utilizando essa nova fonte de energia, ganhou destaque a partir dos trabalhos pioneiros de Komarneni e colaboradores (KOMARNENI et al., 1992; 1994; 1995). Desde então, a síntese HAM atrai a atenção de diversos pesquisadores, pois, dentre as suas principais vantagens destacam-se a possibilidade de obtenção de nanomateriais, com elevada pureza e cristalinidade, além do aumento das velocidades das reações, com conseqüente redução do tempo e da temperatura de síntese, devido à cinética rápida agregada às micro-ondas (CABRAL et al., 2014; DE SANTANA et al., 2014; PINATTI et al., 2016; ROCHA et al., 2016; SILVA et al., 2016).

A síntese de  $ZnWO_4$  através do método hidrotermal convencional já está bem documentada (DAI et al. 2014; FU et al. 2006; RAO et al. 2014; SIRIWONG et al. 2011; YOU et al. 2012), contudo há poucos estudos demonstrando a obtenção de nanopartículas desse óxido a temperaturas menores que  $150^\circ C$ , dessa forma, o primeiro objetivo desse trabalho foi verificar a hipótese de que nanopartículas de  $ZnWO_4$  podem ser obtidas através do método hidrotermal assistido por micro-ondas em temperaturas menores do que aquelas descritas na literatura ( $<150^\circ C$ ).

Além de serem candidatos potenciais para uma série de aplicações tecnológicas, alguns estudos propõem que tungstatos metálicos nanoestruturados são candidatos potenciais para aplicações em química medicinal devido às suas propriedades citotóxicas. Alguns trabalhos sugerem um perfil citotóxico seletivo de nanopartículas de tungstatos contra bactérias, fungos,

e células tumorais, indicando o potencial desses óxidos para aplicações em quimioterapia (ASSIS et al. 2018; FOGGI et al. 2017; LIN et al. 2012; LONGO, V. et al. 2014; ROCA et al. 2015). Dessa forma, outro objetivo desse estudo foi verificar a hipótese de que nanopartículas de tungstato de zinco não apresentam citotoxicidade contra células normais.

Adicionalmente, o efeito anti-angiogênico de nanopartículas (NPs) foi demonstrado, recentemente (GURUNATHAN et al., 2009; KALISHWARALAL et al., 2011). A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir da vasculatura pré-existente, que faz parte de mecanismos fisiológicos e patológicos de reparo tecidual. A angiogênese fisiológica ocorre durante a reprodução, desenvolvimento e reparo de feridas, enquanto a angiogênese patológica, ocorre durante algumas condições de inflamação e hipóxia (CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001; FOLKMAN, 2007). A importância da angiogênese no câncer e em outras doenças foi demonstrada a partir da década de 1960, após uma série de pesquisas pioneiras coordenadas pelo pesquisador Judah Folkman (1933-2008), o qual demonstrou, inicialmente, que o crescimento dos tumores sólidos depende da angiogênese (FOLKMAN; LONG; BECKER, 1963; FOLKMAN; COLE; ZIMMERMAN, 1966; FOLKMAN, 2001; HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Recentemente, as propriedades anti-angiogênicas de NPs de prata e de ouro foram demonstradas *in vivo* e *in vitro* (GURUNATHAN et al., 2009; KALISHWARALAL et al., 2011). Kalishwaralal e cols. (2009) demonstraram, *in vitro*, que NPs de prata apresentaram efeito inibitório sobre etapas cruciais da angiogênese moduladas pelo fator de crescimento derivado do endotélio vascular (VEGF), como a proliferação e a migração de células endoteliais. Em outro trabalho os mesmos pesquisadores demonstraram os efeitos anti-angiogênicos das NPs de prata em um modelo animal de angiogênese e ainda sugeriram que tais efeitos são devidos à inibição da via de sinalização PI3K/Akt induzida por VEGF, de maneira concentração dependente (GURUNATHAN et al., 2009).

Adicionalmente, foi proposta a eficiência de nanopartículas de ouro como coadjuvante em radioterapia para o tratamento de tumores sólidos, devido à sua elevada capacidade de interação com a radiação, consequência da elevada razão superfície-volume das NPs, esse tipo de interação promove emissão de fotoelétrons de curto alcance e elétrons Auger, responsáveis pelo dano a células tumorais e de componentes celulares. Essas NPs provocaram citotoxicidade no tecido tumoral devido, inicialmente, ao efeito citotóxico promovido na microvasculatura endotelial (KUNJACHAN et al 2015). Nesse ínterim, considerando-se as propriedades citotóxicas de algumas nanopartículas em vasos sanguíneos, outra hipótese desse trabalho é que as nanopartículas de tungstato de zinco apresentam atividade anti-angiogênica.

Além da angiogênese como alvo de ação de nanopartículas, outra área de química medicinal que atrai o interesse dos pesquisadores nos últimos anos é a hipertermia baseada no uso de nanomateriais capazes de interagir com a radiação eletromagnética. Essa técnica caracteriza-se pelo aquecimento do tumor sólido e consequente morte tecidual, caso as temperaturas atinjam valores maiores que 47°C, ou facilitação da ação de outras modalidades de terapia antitumoral, tais como quimioterapia e radioterapia, caso as temperaturas resultantes no tecido estejam entre 41 e 45°C. O direcionamento de NPs que absorvem a energia de diferentes fontes de radiação eletromagnética, ao tumor alvo é capaz de concentrar o fenômeno da hipertermia no tecido tumoral e além de aumentar a eficácia da técnica reduz os efeitos colaterais em tecidos adjacentes ao tumor (BEIK et al. 2016; GORDON; HINES; GORDON, 1979; NEL, 2013).

Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (SPION, sigla derivada do inglês “*superparamagnetic iron nanoparticles*”), por exemplo, apresentam algumas aplicações interessantes em química medicinal, as quais foram inicialmente descritas por Gordon e colaboradores (1979). Um campo magnético externo aplicado nos SPIONs possibilita separação celular, liberação de drogas e manipulação de biomoléculas. Podem ser usados como agente de contraste em obtenção de imagens de ressonância magnética e em técnicas de hipertermia, através da introdução das NPs em tumores sólidos (KOSSATZ et al. 2015; LEE et al. 2018; SHUBAYEV; PISANIC; JIN, 2009). Maier-Hauff e cols. relataram, em 2011, o sucesso da técnica de hipertermia magnética baseada no uso de SPIONS, em associação com doses reduzidas de radioterapia, para pacientes acometidos por glioblastoma multiforme recorrente, um tipo de carcinoma do sistema nervoso central. Eles revelaram que a combinação simultânea dessas técnicas aumenta os efeitos citotóxicos sobre o tumor (MAIER-HAUFF et al. 2011).

O efeito EPR, aumento da permeabilidade e retenção (da sigla EPR, do termo em inglês *Enhanced Permeability and Retention*), favorece a condução de estudos com nanopartículas voltadas para aplicações em terapia e diagnóstico do câncer. Uma série de alterações no microambiente tumoral, como o aumento da permeabilidade vascular e drenagem linfática ineficiente, contribuem para a ampla absorção de nanopartículas pelo tecido tumoral e dificultam a sua eliminação, respectivamente (KHAWAR; KIM; KUH, et al. 2015; MAEDA et al. 2000; MAEDA; TSUKIGAWA; FANG, 2016; PEER et al. 2007; YU; ZHENG, 2015).

O efeito EPR impulsionou o aumento do interesse de pesquisadores dedicados ao estudo do câncer, como consequência nos últimos anos observam-se trabalhos voltados para a funcionalização de nanopartículas com drogas citotóxicas ou proteínas específicas de ligação

ao tumor, visando seletivamente células tumorais, melhorar a liberação e reduzir a toxicidade sistêmica de drogas citotóxicas já utilizadas na terapia antitumoral (DING et al. 2013; FANG et al. 2010; GUO e al. 2011; MONTEIRO et al. 2018; UTHAMAN; HUH; PARK, 2018; YOO et al. 2011).

Dessa forma, alguns autores demonstraram que o direcionamento de nanopartículas de metais e de óxidos semicondutores a tumores sólidos, representa uma possibilidade de realização simultânea de diagnóstico e quimioterapia, através da funcionalização das NPs com corantes que absorvem, por exemplo, radiação na região infravermelho próximo do espectro eletromagnético (CHOI et al. 2012; KUNJACHAN et al. 2015) e da funcionalização das NPs com drogas citotóxicas como o paclitaxel e doxorubicina (GUO et al. 2011; KOSSATZ et al. 2015; MARANGONI; CANCINO-BERNARDI; ZUCOLOTTI, 2016), respectivamente.

Diante do exposto, as propriedades físicas e químicas de nanopartículas de tungstato de zinco são bastante exploradas, contudo as suas propriedades biológicas, sob uma perspectiva de química medicinal, permanecem inexploradas. Assim, outro objetivo desse trabalho é realizar estudos sobre o perfil de biodistribuição de nanopartículas de  $ZnWO_4$  em animais saudáveis e com tumor induzido e avaliar a hipótese de que essas NPs constituem uma estratégia seletiva para a terapia e o diagnóstico do câncer.

## Capítulo 1

### Síntese e caracterização de nanopartículas de $\text{ZnWO}_4$

CARLA JÚNIA SANTOS<sup>1</sup>; LILIAN LEAL SILVA<sup>1</sup>; PABLO SANTANA LEMOS<sup>2</sup>; ELSON LONGO DA SILVA<sup>2</sup>; DANIEL CRISTIAN FERREIRA SOARES<sup>1</sup>; FRANCISCO MOURA FILHO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ CAMPUS DE ITABIRA

<sup>2</sup> – UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

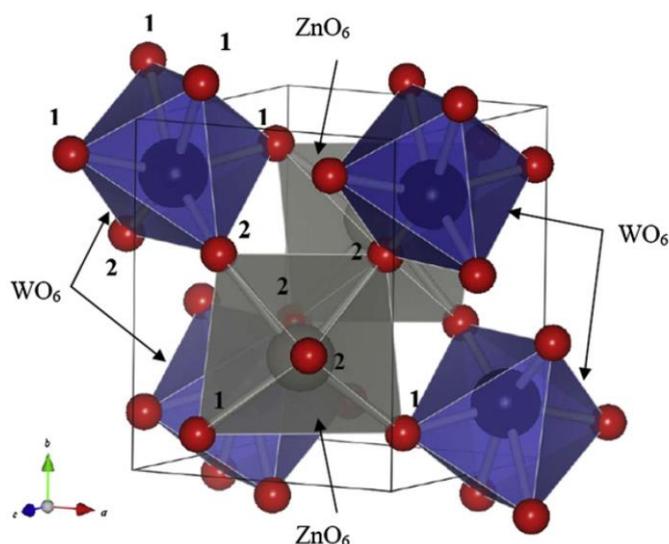
## RESUMO

Tungstatos metálicos são materiais multifuncionais, de fácil obtenção através do método hidrotermal assistido por micro-ondas, contudo a síntese de tungstato de zinco cristalino ainda é realizada a temperaturas superiores a 150°C. Visando aperfeiçoar a síntese desse material, nesse trabalho propôs-se a síntese de nanopartículas de tungstato de zinco a baixas temperaturas (120, 130, 140 e 150°C) através do método hidrotermal assistido por micro-ondas. Para a caracterização físico-química dos mesmos foram utilizadas as técnicas de difratometria de raios X, espectroscopia Raman e infravermelho com transformada de Fourier. Para o estudo das propriedades ópticas foram utilizadas as técnicas de espectroscopia eletrônica UV-Vis, através da qual os valores de “*band gap*” foram estimados e por meio da espectroscopia de fotoemissão avaliou-se as propriedades fotoluminescentes dos materiais. Para a caracterização morfológica das nanopartículas obtidas foram utilizadas as técnicas de microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (FEG-SEM) e a microscopia eletrônica de transmissão foi empregada para a avaliação do tamanho das partículas e do crescimento dos seus planos cristalográficos. As técnicas de espectroscopias utilizadas revelaram que os tungstatos de zinco sintetizados nesse trabalho apresentam ordenamento estrutural a curto alcance e a longo alcance, contudo apenas a amostra obtida a 150°C apresentou completa cristalinidade. Os resultados da espectroscopia óptica UV-Vis sugerem que as nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub> apresentam níveis de energia intermediários dentro do “*band gap*”. Após serem submetidas a excitação em 325nm, as amostras obtidas a 120, 130 e 140°C apresentaram emissão fotoluminescente com perfil de processo multifonon na região amarelo-vermelho do espectro eletromagnético. As imagens obtidas por meio da técnica de FEG-SEM revelaram a obtenção de nanopartículas, sendo que aquelas obtidas a 120, 130 e 140°C não apresentaram forma definida, enquanto as amostras de maior cristalinidade, obtidas a 150°C, apresentaram formato tipo flor. As imagens obtidas através de microscopia eletrônica de transmissão confirmaram a obtenção de nanopartículas de tungstato de zinco em todas as temperaturas de síntese utilizadas, além de permitir inferir que as nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub> obtidas em diferentes temperaturas não apresentaram um mecanismo predominante de crescimento. Juntos esses resultados demonstram que foi possível obter nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub> através do método hidrotermal assistido por micro-ondas, porém as amostras sintetizadas a 120, 130 e 140°C apresentaram-se desordenadas e somente a amostra obtida a 150°C apresentou maior ordenamento estrutural ou cristalinidade.

## 1.1.INTRODUÇÃO

Tungstos metálicos são um grupo de cerâmicas avançadas multifuncionais, que se classificam como óxidos complexos, com fórmula química geral do tipo  $AWO_4$  ou  $A_2WO_4$  onde A representa o cátion divalente ou monovalente, respectivamente. Conforme o tamanho do cátion, os tungstos divalentes ( $AWO_4$ ) apresentam estruturas cristalinas específicas, quando o raio iônico de  $A \leq 0,77\text{Å}$  ( $A = \text{Fe, Mn, Co, Ni, Mg, Zn}$ ) os tungstos cristalizam com estrutura monoclinica do tipo wolframita, com grupos espaciais  $P_2/c$  e duas unidades de fórmula em cada célula unitária, se os cátions apresentam raio iônico  $> 0,77\text{Å}$ , os tungstos cristalizam com estrutura tetragonal do tipo schelita (DATURI, et al., 1997; SCHOFIELD; REDFERN, 1992). A presença de dois átomos de oxigênio não equivalentes é responsável por três pares de ligação Zn-O e W-O, com diferentes comprimentos, originando, dessa maneira, uma configuração octaédrica distorcida, em que tanto o Zn, quanto o W possuem número de coordenação 6, conforme ilustrado na Figura 1 (BRIK; NAGIRNYI; KIRM, 2012).

**Figura 1** - Célula unitária de  $ZnWO_4$ .



O Zn e o W encontram-se nos centros dos octaedros cinza e azul, respectivamente. Fonte: Brik; Nagirnyi; Kirm, 2012.

Desde 1947, as propriedades ópticas dos tungstos metálicos atraem o interesse da comunidade científica (KRÖGER, 1947a; 1947b). No entanto, suas aplicações tecnológicas só surgiram após a década de 1980, quando o uso de tungstos foi visto como uma alternativa aos agentes cintiladores, haletos alcalinos e germanato de bismuto, em tomografia computadorizada de raios-X, devido a inúmeras vantagens, como menor toxicidade, menor

higroscopicidade e baixo custo (BORN; ROBERTSON; SMITH, 1981; OI; TAKAGI; FUKAZAWA, 1980). Desde então, os tungstatos metálicos atraíram considerável interesse científico e tecnológico devido à sua estabilidade química e propriedades físicas únicas, que garantiram suas aplicações multifuncionais em muitos campos, como catálise, fotocatálise e uso como agentes citotóxicos, luminescentes, sensores de gases e diagnósticos (DODD et al., 2009; KUMAR; ANDOU; KARUPPUCHAMY, 2016; NIKOLAENKO; HIZHNYI; NEDILKO, 2008; OI; TAKAGI; FUKAZAWA, 1980).

Além de serem candidatos potenciais para uma série de aplicações tecnológicas, alguns estudos propõem que tungstatos metálicos são candidatos potenciais para aplicações em química medicinal devido às suas propriedades citotóxicas (ASSIS et al. 2018; FOGGI et al. 2017; LIN et al. 2012; LONGO, V. et al. 2014; ROCA et al. 2015).

Recentemente, foi demonstrada a atividade citotóxica de tungstato de prata contra bactérias patogênicas Gram positivas (ASSIS et al. 2018; LONGO, V. et al 2014) e Gram negativas (ROCA et al. 2015). Longo V. e cols. (2014) demonstraram efeito citotóxico ou antimicrobiano de tungstato de prata contra cepas de *Staphylococcus aureus*, resistentes a meticilina, um dos fármacos antimicrobianos mais potentes da atualidade. Cepas dessa bactéria Gram positiva são importantes causadoras de infecções hospitalares e caracterizam-se pela dificuldade de tratamento ocasionada pelo desenvolvimento de múltipla resistência aos medicamentos disponíveis no mercado (ASSIS et al. 2018; LONGO, V. et al 2014).

Roca e cols. (2015) demonstraram o efeito citotóxico de tungstato de prata frente a outra cepa bacteriana de importância clínica, *Escherichia coli*, uma bactéria Gram negativa que também apresenta múltipla resistência aos medicamentos antimicrobianos disponíveis no mercado. Eles observaram um efeito citotóxico progressivo, ou seja, o aumento da concentração de tungstato de prata, em culturas de *E. coli*, resultou em aumento do efeito, e de maneira interessante, o efeito citotóxico máximo sobre as bactérias utilizadas no ensaio foi observado com baixa concentração de tungstato (4mg/mL) (ROCA et al. 2015).

Foggi e cols. (2017) observaram efeito citotóxico de tungstatos perante um fungo patogênico, *Candida albicans*, causador de infecções oportunistas em humanos imunossuprimidos, que apresentam baixa atividade do sistema de imune, devido a fatores como síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), transplante de órgãos, efeitos colaterais de tratamento de neoplasias ou outros distúrbios imunológicos. Em seu trabalho, eles demonstraram a eficácia de tungstato de prata em promover a morte de 100% da população de células de *Candida albicans*, uma vez que concentrações menores que 0,07mg/mL de  $Ag_2WO_4$  foram capazes de eliminar esse fungo (FOGGI et al. 2017).

De maneira surpreendente estudos revelam efeitos citotóxicos de tungstatos em linhagens de células tumorais, com ausência de citotoxicidade contra linhagens de células normais, o que sugere a interação seletiva desses óxidos com as células doentes e torna-os atraentes para aplicações em química medicinal (LIN et al. 2012; SELVAMANI et al. 2016). Em estudo realizado em 2012, Lin e cols. observaram a ausência de toxicidade de tungstato de cálcio em linhagem de células endoteliais e por outro lado o composto mostrou-se tóxico em linhagens de células tumorais de leucemia e de câncer de mama (LIN et al. 2012).

Selvamani e cols. (2016) revelaram uma diminuição, dependente da dose, na viabilidade de células de melanoma de camundongo tratadas com nanopartículas de tungstato de prata (SELVAMANI et al. 2016). Além disso, a biocompatibilidade dessas nanopartículas foi testada em linhagem celular normal da pele (queratinócitos humanos), com resultados promissores. O tungstato de prata não exibiu citotoxicidade significativa contra células de queratinócitos humanos (SELVAMANI et al. 2016).

Nos últimos anos, atenção especial foi dada às propriedades de tungstatos nanoestruturados devido à observação de melhora de algumas propriedades em virtude dos efeitos causados pela redução do tamanho do material (DUTTA; RAVAL, 2018; GARADKAR et al. 2013; HE et al. 2016; LIU et al. 2017; PEREIRA et al. 2018). Assis e cols. 2018, por exemplo, desenvolveram uma técnica de síntese que resultou em nanopartículas de tungstato de prata com atividade citotóxica contra a bactéria *Staphylococcus aureus*, resistente à metilina, 32 vezes maior comparada a outras moléculas citotóxicas existentes atualmente, usadas em embalagens de alimentos, órteses e materiais médico-hospitalares, dentre outros (ASSIS et al. 2018).

Diante do exposto, nanopartículas de tungstatos metálicos surgem como uma possível alternativa para a promoção de efeitos citotóxicos seletivos em tecidos tumorais. Entretanto, de acordo com pesquisa realizada nos principais bancos de dados de artigos científicos (SCIELO, SCOPUS, SCIENCE DIRECT, PUBMED e WEB OF SCIENCE) utilizando as palavras-chave em inglês: (i) *cytotoxicity of zinc tungstate nanoparticles*, (ii) *zinc tungstate in vivo studies*, (iii) *pharmacokinetics of zinc tungstate*, (iv) *biodistribution of zinc tungstate*, (v) *in vivo toxicology of zinc tungstate*, não foi revelado nenhum resultado até a data de 22 de outubro de 2018. Nesse contexto a hipótese inicial desse trabalho é que nanopartículas de tungstato de zinco apresentam toxicidade seletiva (BEIK et al. 2016; MAIER-HAUFF et al. 2011; SANTOS et al. 2018).

A obtenção de  $ZnWO_4$  é possível através da utilização de diversas técnicas de síntese, como por exemplo, reação do estado sólido (PHANI et al., 2000) e outras como co-

precipitação (KALINKO; KUZMIN, 2011), sol-gel (BONANNI et al., 1998), Czochralski (BRICE; WHIFFIN, 1967), *template* (LIN et al., 2009), síntese via sal fundido (YAN; LEI, 2010), síntese sonoquímica (DUTTA; RAVAL, 2018), síntese hidrotermal (FU et al. 2006; GARADKAR et al. 2013) dentre outras, contudo a literatura reporta a obtenção desse material nanoestruturado por meio de métodos químicos de síntese, e nos últimos anos a síntese hidrotermal assistida por micro-ondas destacou-se nesse quesito.

A síntese de  $ZnWO_4$  através do método hidrotermal convencional já está bem documentada conforme descrito na Tabela 1, contudo há poucos estudos onde essas NPs foram sintetizadas a temperaturas menores que  $150^\circ C$ . Dados da literatura demonstram que a síntese hidrotermal de nanopartículas de  $ZnWO_4$  é realizada em elevadas temperaturas e em longos períodos de tempo, como pode ser observado na Tabela 1, o que justifica o desenvolvimento de pesquisas com o intuito de aperfeiçoar a obtenção dessas nanopartículas.

**Tabela 1** – Resumo dos protocolos de síntese hidrotermal para a obtenção de  $ZnWO_4$ .

Sistema	Temperatura ( $^\circ C$ )	Tempo (h)	Referência
<b>Micro-ondas</b>	140	1	Pereira et al. 2018
	150	1	Kloprogge et al. 2004
	180	1	Liu et al. 2017
<b>Convencional</b>	160	24	Fu et al. 2006
	180	12	You et al. 2012
	180	16	Dai et al. 2014
	180	24	Rao et al. 2014

Todos os protocolos utilizaram água como solvente. Fonte Próprio autor.

A síntese hidrotérmica é um método químico que surgiu como uma tentativa de minimizar os problemas enfrentados durante a realização de síntese através de fase sólida, os quais requerem longos tempos e elevadas temperaturas ( $> 500^\circ C$ ) para a obtenção de óxidos semicondutores nanoestruturados (SHRIVER et al. 2008).

A partir dos trabalhos pioneiros de Komarneni e colaboradores (KOMARNENI et al., 1992, 1994, 1995), foi demonstrada a eficiência da radiação micro-ondas, em síntese hidrotermal, ao proporcionar a obtenção de partículas na escala nanométrica, com elevada pureza e cristalinidade, além do aumento das velocidades das reações, com consequente redução do tempo e da temperatura de síntese, devido à grande cinética agregada às micro-ondas, com isso, atualmente vários pesquisadores e indústrias utilizam a síntese hidrotermal

assistida por micro-ondas em processos oxidativos avançados, síntese de polímeros, nanopartículas metálicas, compostos heterocíclicos bioativos, processos bioquímicos, reações catalisadas por metais, dentre outros (CABRAL et al., 2014; DE SANTANA et al., 2014; PINATTI et al., 2016; ROCHA et al., 2016; SILVA et al., 2016).

Diante do exposto, no presente trabalho foi proposta a síntese de nanopartículas de tungstato de zinco visando verificar a hipótese de que esse material pode ser obtido através do método hidrotermal assistido por micro-ondas em temperaturas menores do que aquelas descritas na literatura (<150°C).

## 1.2. OBJETIVO GERAL

Sintetizar nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  através do método hidrotermal assistido por micro-ondas, em baixas temperaturas.

### 1.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Sintetizar nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  em temperaturas menores que  $150^\circ\text{C}$ , através do método hidrotermal assistido por micro-ondas;
- b) Avaliar, por meio de técnicas de espectroscopias de Difração de raios X, Raman, Infravermelho com transformada de Fourier, Fotoluminescência e Ultravioleta-Visível a evolução da cristalinidade de tungstatos de zinco obtidos a temperaturas menores que  $150^\circ\text{C}$  através do método hidrotermal assistido por micro-ondas;
- c) Avaliar, por meio das técnicas de espectroscopias supracitadas, a presença de defeitos estruturais em tungstatos de zinco sintetizados a temperaturas menores que  $150^\circ\text{C}$ ;
- d) Avaliar, por meio de técnicas de microscopia de alta resolução, a evolução do tamanho e da morfologia de tungstatos de zinco sintetizados.

### 1.3.MATERIAIS E MÉTODOS

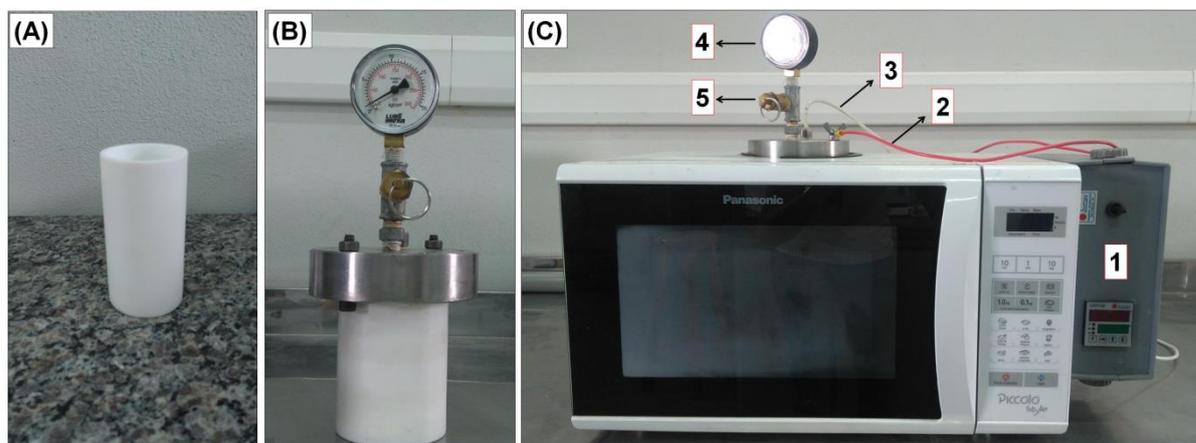
#### 1.3.1. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE ZnWO<sub>4</sub>

Para a obtenção de nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub> foram utilizados reagentes grau analítico sem purificação adicional. Realizou-se o procedimento de síntese de tungstato de zinco conforme descrito anteriormente por YU e cols. (2003), com algumas modificações. Em um béquer, 5mmol de nitrato de zinco hexaidratado, Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> PA, foram dispersos em cerca de 30mL de água ultrapura, mediante aquecimento a 80°C, durante 4 minutos, e sob agitação magnética constante. De maneira análoga, em outro béquer, 5mmol de tungstato de sódio diidratado PA foi disperso no mesmo volume de água ultrapura. Em seguida, verteu-se a solução de tungstato de sódio no béquer contendo nitrato de zinco, a mistura foi mantida a 80°C, mediante agitação magnética constante, por mais 10 minutos. O pH da suspensão resultante foi ajustado até 9,0, utilizando-se hidróxido de potássio 1M. As reações químicas envolvidas na formação de tungstato de zinco estão descritas a seguir:



Após a reação de co-precipitação, a suspensão obtida foi transferida para um recipiente cilíndrico de Teflon®, o qual foi introduzido em um reator, que por sua vez, após ser devidamente vedado, foi introduzido em um forno micro-ondas doméstico adaptado (Panasonic modelo NN-ST341WRUK - 2,45GHz, 850W) para a realização da síntese hidrotermal assistida por micro-ondas (HAM) nas temperaturas de 120, 130, 140 e 150°C durante 60 minutos, conforme ilustrado na Figura 2 e 3.

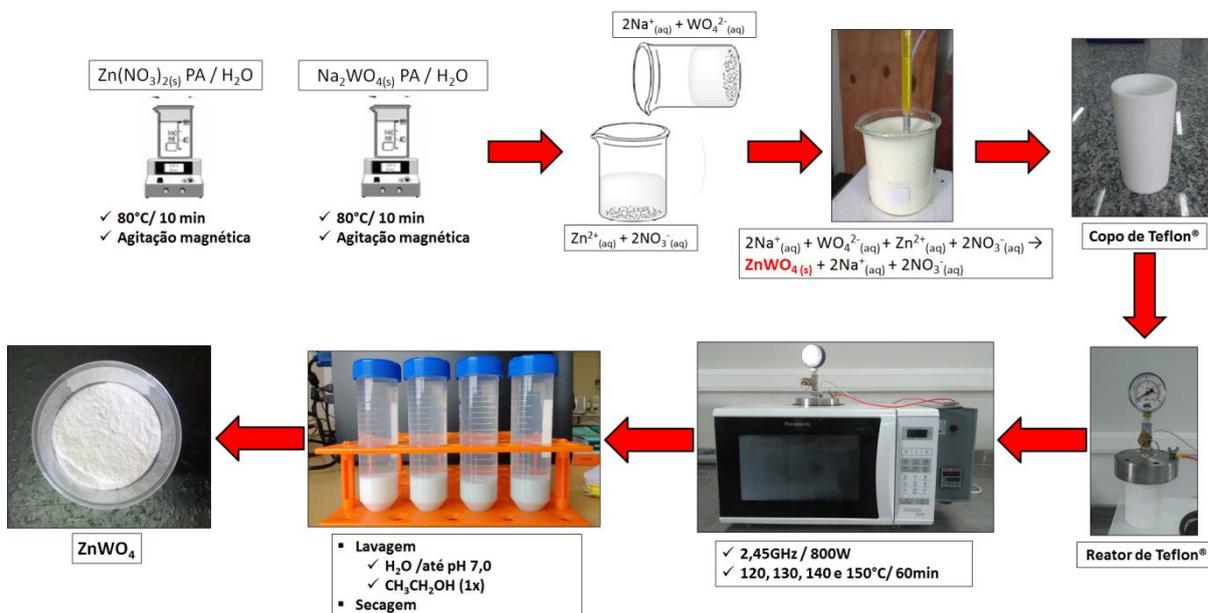
**Figura 2** – Representação do sistema hidrotermal assistido por radiação micro-ondas utilizado nesse trabalho.



A) Copo de Teflon®; B) Reator de Teflon® acoplado ao manômetro com válvula de segurança; C: Forno micro-ondas adaptado para a realização de síntese hidrotermal assistida por micro-ondas com controlador de tempo, temperatura e taxa de aquecimento (1), fio de aterramento (2), termopar (3), manômetro (4) e válvula de segurança (5). Os equipamentos pertencem ao Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados da UNIFEI Campus Itabira. Fonte: Próprio autor.

Com o objetivo de avaliar a evolução da cristalinidade do material, as partículas de  $\text{ZnWO}_4$  obtidas através de reação de co-precipitação, foram submetidas a diferentes temperaturas de síntese em forno de micro-ondas adaptado (entre 120 e 150°C) durante 1 hora, com taxa de aquecimento de 10°C/min. Ao final do procedimento de síntese hidrotermal, aguardou-se o resfriamento do sistema utilizado até atingir a temperatura ambiente. Para remover os contra-íons ( $\text{Na}^+$  e  $\text{NO}_3^-$ ) e possíveis contaminantes orgânicos e inorgânicos, as suspensões obtidas foram lavadas, por diversas vezes, com 40mL de água ultrapura e submetidas a centrifugação, até que a suspensão sobrenadante apresentasse pH entre 7 e 7,5. A última lavagem dos sólidos obtidos foi realizada com 40mL de etanol absoluto (1 x). Por fim, o precipitado resultante foi submetido a secagem à temperatura ambiente e em seguida desaglomerado em almofariz de ágata. As etapas de síntese desenvolvidas estão detalhadas na Figura 3.

**Figura 3** – Fluxograma do processo de síntese de NP de  $\text{ZnWO}_4$  através do método hidrotermal assistido por micro-ondas (HAM).



Fonte: Próprio autor.

## 1.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MORFOLÓGICA DE $\text{ZnWO}_4$

### 1.4.1. DIFRATOMETRIA DE RAIOS X

Os raios X são um tipo de radiação eletromagnética que apresentam comprimento de onda entre  $10^{-12}$  a  $10^{-8}$ m (ou 0,01 a  $100\text{\AA}$ ) e energia do fóton entre  $10^2$  e  $10^6$ eV, foram descobertos em 1895 pelo físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen (1845-1923), mas sua aplicação em espectroscopia iniciou-se em 1912, ano em que o fenômeno da difração de raios X por sólidos cristalinos foi descoberto (CALLISTER, 2010; CULLITY, 1978).

A técnica de difratometria de raios X (DRX) é útil principalmente para a avaliação das fases cristalinas presentes em materiais no estado sólido, o que se torna possível devido ao fato de a distância interplanar existente entre os átomos organizados no cristal ser da mesma ordem de grandeza que o comprimento de onda dos raios X utilizados na técnica (0,5 a  $2,5\text{\AA}$ ). Os raios X incididos sobre um material interagem com ele, originando o fenômeno de difração, regido pela lei de Bragg, a qual relaciona a direção dos raios X difratados coerentemente, ângulo  $\theta$ , com as distâncias entre os planos cristalinos,  $d$ , o comprimento de onda da radiação difratada,  $\lambda$ , e a ordem de difração,  $n$ , conforme a equação a seguir (CULLITY, 1978):

$$n\lambda = 2d.\text{sen}(\theta) \quad (2)$$

Nesse trabalho, utilizou-se o ensaio de difração de raios X (DRX) para a avaliação da composição química, identificação das fases cristalinas e avaliação do efeito da temperatura na cristalinidade e no tamanho médio de nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  sintetizadas através do método HAM. Os ensaios foram realizados em um difratômetro modelo SmartLab (RIGAKU, Tóquio), localizado no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados da Universidade Federal de Itajubá Campus Itabira. O equipamento foi operado sob as condições de 40kV e 30mA e utilizou-se cobre- $K\alpha$  ( $\lambda = 1,5406\text{\AA}$ ) como fonte de radiação para o ensaio. A taxa de varredura empregada para as rotinas rápidas foi de  $0,02^\circ/\text{s}$  e o intervalo de  $2\theta$  foi de  $10^\circ$  até  $70^\circ$ . Os difratogramas obtidos foram analisados a partir dos padrões de difração encontrados nas fichas cristalográficas *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS). Para a identificação de segundas fases utilizou-se o software Crystallographica Search Match (versão 2).

O tamanho médio de cristalito foi estimado utilizando-se a equação de Scherrer, que se baseia na largura a meia altura do pico de maior intensidade (111). Este método é útil para estimar-se o tamanho médio de partículas entre 2 e 50nm.

Equação de Scherrer:

$$D = \frac{K \lambda}{\beta \cos(\theta)} \quad (3)$$

Onde,

$\beta$ : alargamento do pico de difração medida a meia altura de sua intensidade máxima, em radianos;

K: constante de proporcionalidade, uma função da forma geométrica da particular.

## 1.4.2. ESPECTROSCOPIAS VIBRACIONAIS

Nesse trabalho foram utilizadas técnicas complementares de espectroscopias vibracionais, espectroscopia Raman e espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), úteis para a realização de estudos sobre a composição química dos materiais. São consideradas técnicas complementares, pois, embora utilizem fonons com energia semelhante, apresentam regras de seleção diferentes (NAKAMOTO, 2009).

Uma vibração será ativa em espectroscopia infravermelho se houver mudança no momento dipolo da molécula durante a interação com a radiação enquanto uma vibração será ativa em espectroscopia Raman se houver mudança na polarizabilidade da ligação (NAKAMOTO, 2009). Nesse contexto, a espectroscopia Raman é útil para identificar ligações que são invisíveis na espectroscopia IR e vice-versa (SIGMUND; MANEERATANA; HSU; 2012).

### 1.4.2.1 ESPECTROSCOPIA MICRO-RAMAN

Essa técnica baseia-se no fenômeno de espalhamento de luz inelástico por materiais ao receberem um feixe de luz monocromático (ultravioleta ou visível), como resultado deste fenômeno físico, verifica-se uma modificação entre as frequências da luz espalhada e incidente, permitindo assim, identificar as estruturas moleculares por meio de seus modos vibracionais (FARIA; SANTOS; GONÇALVES, 1997; NAKAMOTO, 2009).

A espectroscopia de espalhamento Raman é uma técnica de espectroscopia vibracional não destrutiva que possibilita a caracterização química dos compostos por meio de vibrações em comprimentos de onda específicos para os tipos de ligações existentes, além disso, proporciona informações sobre a cristalinidade, presença de defeitos e tamanho de partícula dos sólidos (CAVALCANTE et al. 2013; NAKAMOTO, 2009).

Os ensaios de espectroscopia de espalhamento Raman foram realizados no laboratório de espectroscopias da Universidade Federal de Itajubá Campus Itabira, utilizando-se um espectrofotômetro Micro Raman IHR 320 (HORIBA, Quioto) acoplado a um microscópio BX41 (OLYMPUS, Tóquio), calibrado com uma pastilha de silicone ( $520,5\text{cm}^{-1}$ ). Para a obtenção dos espectros uma pequena porção das amostras foi inserida em uma lâmina de vidro específica para microscopia, a qual foi ajustada ao microscópio óptico equipado com lentes objetivas de 10, 20 e 50 x. Após as amostras serem focadas com a objetiva de 50x,

foram excitadas por um laser do estado sólido que produz uma luz altamente polarizada com comprimento de onda de 633nm. A leitura foi realizada com uma resolução de  $2\text{cm}^{-1}$  e uma precisão de  $\pm 1\text{cm}^{-1}$  no intervalo de 100 a  $1200\text{cm}^{-1}$ .

#### **1.4.2.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)**

Em espectroscopia FTIR, a radiação ( $\lambda = 100\mu\text{m}$  a  $1000\text{nm}$ ) é capaz de excitar as ligações que apresentam momento dipolo resultante, ou seja, ligações entre átomos com diferença de eletronegatividade. Essa técnica é utilizada para identificar as unidades estruturais dos compostos, com base nas frequências vibracionais dos movimentos resultantes da interação da radiação com as moléculas. As bandas registradas são decorrentes da absorção da radiação eletromagnética e resultante dos movimentos de torção, deformação, rotação e vibração dos átomos ligados nas moléculas (NAKAMOTO, 2009).

O ensaio de espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier foi realizado para avaliar a composição química dos sólidos sintetizados e a presença de impurezas, utilizou-se um Espectrômetro Vertex 70 (Bruker Corporation, Massachusetts) em modo de reflectância total atenuada (ATR – derivada do inglês *attenuated total reflectance*), localizado no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados da Universidade Federal de Itajubá Campus Itabira. A leitura foi realizada em modo de transmitância, no intervalo de 100 a  $6000\text{cm}^{-1}$ , resolução  $2\text{cm}^{-2}$ , com tempo de varreduras da amostra de 128s.

#### **1.4.3. ESPECTROSCOPIA DE FOTOLUMINESCÊNCIA**

A espectroscopia de fotoluminescência possibilita avaliar as propriedades ópticas e obter informações sobre a estrutura de bandas eletrônicas do material (CALISTER 2010; SKOOG et al. 2005). Adicionalmente, de maneira conjunta a outras técnicas espectroscópicas permite inferir sobre o grau de ordem-desordem estrutural dos sólidos estudados (MAZZO, 2011; MOURA et al 2013).

Os ensaios de fotoluminescência foram realizados no Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC) da Universidade Federal de São Carlos, através de um monocromador Monospec 27 (Thermo Jarrel Ash, Massachusetts) acoplado a uma fotomultiplicadora R446 (Hamamatsu Photonics, Japão). Como fonte de excitação para as amostras, utilizou-se um laser de íon criptônio Coherent Inova 200 (Coherent, Califórnia), a

325nm, com potência de saída mantida a 500mW, contudo a potência que atinge as amostras é de 2,8mW, após passagem do feixe pelos componentes ópticos (1 prisma, 4 espelhos, 2 lentes, chopper 138Hz e uma íris). Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente.

Os espectros obtidos foram decompostos utilizando-se função Gaussiana, com o objetivo de verificar a contribuição de cada cor para a formação das bandas de emissão.

#### 1.4.4. ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA –VISÍVEL

A técnica de espectroscopia de absorção óptica na região ultravioleta-visível (UV-VIS) do espectro eletromagnético proporciona a compreensão sobre a estrutura de bandas eletrônicas de um sólido, uma vez que se baseia nos fenômenos de absorção e de emissão de energia envolvendo transições eletrônicas de um estado para outro, porém com conservação da energia do fóton (CALLISTER, 2010; SKOOG et al. 2005).

Os ensaios de espectroscopia UV-VIS foram realizados no Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados da Universidade Federal de Itajubá Campus Itabira, utilizando um espectrofotômetro ultravioleta-visível UV-2600 (SHIMADZU, Quioto), no intervalo de 190 a 1200nm, em modo de reflectância difusa.

O “*band gap*” óptico, valor correspondente à energia situada entre a banda de valência e a banda de condução do sólido, foi calculado a partir do método proposto por Wood e Tauc (1972), o qual se baseia na relação entre a absorbância e a energia dos fótons, aplicável a sólidos amorfos, desordenados e cristalinos, de acordo com a equação a seguir (4):

$$(\alpha h\nu) = A (h\nu - E_{gap})^n \quad (4)$$

Onde  $\alpha$  é a absorbância,  $h$  é a constante de Planck,  $\nu$  é a frequência,  $E_{gap}$  é a energia de “*band gap*” óptico e  $n$  é a constante associada aos diferentes tipos de transições eletrônicas ( $n = 1/2, 2, 3/2,$  ou  $3$  para transição permitida direta, permitida indireta, proibida direta e proibida indireta, respectivamente) (WOOD; TAUC, 1972).

#### **1.4.5. POTENCIAL ZETA, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E TAMANHO HIDRODINÂMICO DAS PARTÍCULAS**

O ensaio de determinação do potencial zeta de sólidos proporciona o conhecimento sobre como as partículas ficam carregadas em ambiente aquoso, a carga pode ser resultado de reação de dissociação de grupos funcionais ou da adsorção de íons presentes na suspensão. Além disso, proporciona o conhecimento sobre o índice de polidispersão e tamanho hidrodinâmico que o sólido adquire em meio aquoso. O diâmetro médio e a distribuição do tamanho das nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS) também chamada de espectroscopia de correlação de fótons, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Inglaterra), localizado no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Para a determinação do diâmetro médio das nanopartículas, foi utilizada uma alíquota de 20 $\mu\text{L}$  de suspensão de  $\text{ZnWO}_4$   $5,0 \times 10^{-3}$  mg/mL, preparada em água ultrapura, submetida ao banho de ultrassom durante 10 minutos, para dispersar as nanopartículas. As medidas foram efetuadas a temperatura de 25°C e a um ângulo de 90°. O potencial zeta foi determinado por espalhamento dinâmico da luz e análise da mobilidade eletroforética das nanopartículas. As medidas foram feitas em triplicata, utilizando-se as mesmas condições e equipamento descritos para definir o diâmetro médio.

#### **1.4.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO**

A microscopia eletrônica de varredura com canhão de elétrons por emissão de campo (FEG-SEM) é uma técnica de análise microestrutural comumente utilizada para materiais sólidos, que pode fornecer informações qualitativas, acerca da textura, topografia e morfologia, e quantitativas tais como tamanho aproximado. A técnica baseia-se na interação de um feixe de elétrons de alta energia com a superfície da amostra, gerando novos elétrons que de maneira semelhante a um tubo de raios catódicos, resulta em uma imagem que pode ser tratada de diferentes maneiras (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

As amostras de  $\text{ZnWO}_4$  foram dispersas em acetona com auxílio de um banho ultrassônico. Em seguida, as dispersões foram depositadas em placas de silício monocristalinos. As imagens foram obtidas por meio de um microscópio eletrônico de

emissão de campo modelo Inspect F50 (FEI Company, Hillsboro, OR), operado com feixe de elétrons incidentes de 5kV de tensão. Os ensaios foram realizados no Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC) da Universidade Federal de São Carlos.

#### **1.4.7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO**

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi utilizada com o intuito de avaliar a influência da temperatura de síntese na morfologia, no estado de ordem-desordem, no crescimento dos planos cristalinos e no tamanho médio das partículas. Os ensaios foram realizados em um microscópio eletrônico de transmissão Jem-2100 LaB6 (Jeol) operado com tensão de 200kV, no Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC) da Universidade Federal de São Carlos.

## 1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1.5.1. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE $ZnWO_4$

Qualquer substância candidata a agente terapêutico e ou diagnóstico deve ser submetida a diferentes ensaios de caracterização físico-química, estrutural, morfológica, perfil de biodistribuição e toxicidade. Dessa forma, a primeira etapa do planejamento de novos agentes com potencial aplicação biológica consiste no estudo da composição química, da pureza e das propriedades físicas desses compostos. Atualmente, sabe-se que as propriedades das substâncias não dependem somente da sua composição química, mas também do tamanho das partículas e do estado de ordem-desordem do material, esses fatores, por sua vez, dependem da técnica e das condições de síntese empregadas para a obtenção do material (RODUNER, 2014).

Sólidos ideais apresentam total ordenamento estrutural, ou seja, estrutura cristalina definida, contudo, sólidos reais contem imperfeições ou defeitos em sua estrutura cristalina ou na sua composição, o que significa que o ordenamento atômico não é tão perfeito, a esse estado dá-se o nome de estado de ordem-desordem do material, o qual, por sua vez, é diretamente influenciado pela temperatura de síntese, pela presença de impurezas e por desvios na estequiometria da reação (CALLISTER, 2010). A escolha dos precursores é uma etapa crucial da síntese, pois pode prejudicar a formação do produto almejado, ocasionando a formação de produtos secundários, diminuir o rendimento da reação, ocasionar a contaminação do produto final, seja através de impurezas, porventura não removidas nas etapas de lavagem, ou devido à reação entre essas e os íons precursores.

Em reações de co-precipitação a baixa solubilidade dos precursores pode resultar em erros na estequiometria da reação, dessa forma, é fundamental que os precursores escolhidos para participar dessas reações apresentem elevada pureza e solubilidade no solvente utilizado. Para a obtenção de nanopartículas de tungstato de zinco, utilizou-se como precursores o nitrato de zinco ( $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ), cujo valor de solubilidade é de 1317g/L, e o tungstato de sódio ( $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ ), com valor de solubilidade igual a 730g/L, ambos com elevada solubilidade em água, classificados, conforme a classificação farmacopeica de solubilidade, como muito solúvel e facilmente solúvel em água, respectivamente (BRASIL, 2010).

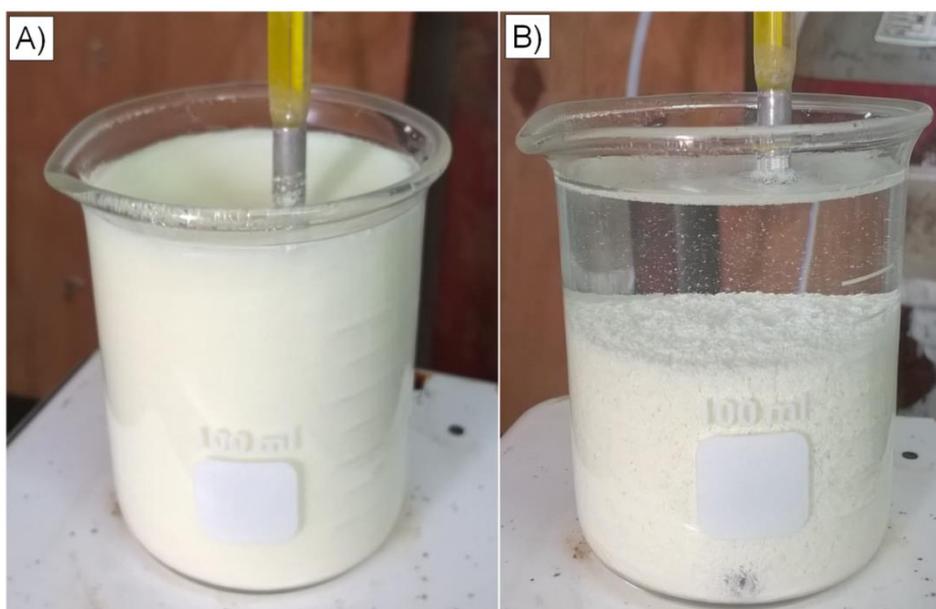
Embora os reagentes utilizados apresentem elevada pureza, conforme informações do fabricante, antes de utilizá-los, amostras dos mesmos foram submetidas ao ensaio de difração

de raios X para avaliar a presença de segundas fases, as quais não foram identificadas, confirmando a pureza declarada pelos fabricantes.

Nesse trabalho, a síntese de nanopartículas de tungstato de zinco foi realizada em duas etapas. A primeira etapa consistiu na realização de reação de co-precipitação, onde os precursores foram separadamente dissolvidos em água ultrapura. Os métodos em solução permitem um excelente controle sobre a cristalização dos materiais inorgânicos. Como os reagentes interagem em escala atômica e estão solvatados no meio líquido, a difusão é rápida e as distâncias de difusão são geralmente pequenas, logo, a síntese pode ser realizada em baixas temperaturas, o que reduz o crescimento das partículas e permite, portanto, o controle sobre o seu tamanho (SHRIVER et al. 2008).

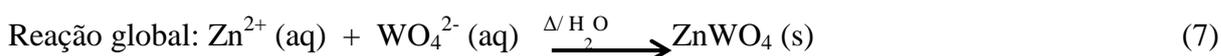
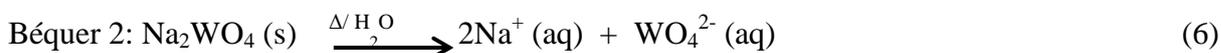
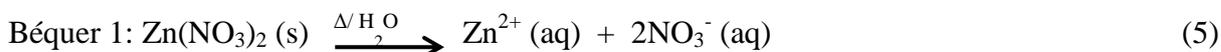
Com o objetivo de melhorar a solubilidade dos íons precursores e aumentar a cinética da reação, as soluções precursoras foram aquecidas a 80°C, durante 10 minutos. Após esse procedimento, verteu-se a solução de tungstato de sódio no béquer contendo a solução de nitrato de zinco e observou-se, imediatamente a formação de um composto branco (Figura 4-A), provavelmente o tungstato de zinco ( $ZnWO_4$ ) o qual, assim como outros óxidos, apresenta baixa solubilidade em água, a qual se torna mais nítida após a suspensão permanecer em repouso, conforme ilustrado na Figura 4-B.

**Figura 4** – Suspensão de  $ZnWO_4$  obtida através de reação de co-precipitação.



A: Suspensão de  $ZnWO_4$  submetida a aquecimento, a 80°C, e a agitação magnética constante; B: Suspensão de  $ZnWO_4$  após 10 minutos de repouso. Fonte: Próprio autor.

As reações balanceadas que descrevem a primeira etapa da formação de tungstato de zinco, encontram-se descritas a seguir:



Em reações onde os precursores são sais que apresentam cátions metálicos em sua composição, algumas medidas devem ser adotadas no intuito de garantir o crescimento do cristal desejado e eliminar a formação de produtos secundários, visto que cátions metálicos comportam-se como ácidos de Lewis e podem, portanto, formar complexos com bases de Lewis (SHRIVER et al. 2008). Neste trabalho, objetivou-se sintetizar um composto classificado como óxido complexo, denominado óxido de zinco e tungstênio ( $\text{ZnWO}_4$ ), também conhecido como tungstato de zinco, a partir de precursores iônicos em solução aquosa. Para compreender a formação do tungstato de zinco a partir de seus precursores iônicos, em uma reação de co-precipitação, é importante conhecer as propriedades dos elementos constituintes desse material, as quais estão descritas na tabela a seguir.

**Tabela 2** – Propriedades físicas e químicas dos elementos constituintes de  $\text{ZnWO}_4$

<b>Elemento/ Símbolo</b>	<b>Massa atômica (uma)</b>	<b>Raio (nm)</b>	<b>Nº de oxidação (NOX) mais comum</b>	<b>Eletronegatividade (Pauling)</b>
Oxigênio (O)	15,999	0,06000	-2	3,44
Zinco (Zn)	65,382	0,1332	+2	1,65
Tungstênio (W)	183,84	0,1371	+6, +4	2,36

uma: unidades de massa atômica; nm: nanômetros. Fonte: IUPAC Periodic table of elements, 2016; Shriver, et al. 2008.

De maneira didática, as reações envolvidas na formação de  $\text{ZnWO}_4$ , um exemplo de reação de dupla troca, sugerem que os cátions  $\text{Zn}^{2+}$  substituem o cátion  $\text{Na}^+$  e forma-se  $\text{ZnWO}_4$ , contudo, devido às propriedades físicas e químicas do  $\text{Zn}^{2+}$ , alguns ajustes são necessários para garantir a formação do óxido misto,  $\text{ZnWO}_4$ . Geralmente, os metais com

estados de oxidação elevados, como o tungstênio, que usualmente apresenta estado de oxidação +4 ou +6, ocorrem como oxoânions em solução aquosa, em contrapartida, metais com baixos estados de oxidação, como o Zn (NOX = 2), formam, com muita facilidade, complexos com a água, contudo essas reações de complexação são pH dependentes e, através de ajustes no pH, torna-se possível favorecer a formação de óxidos até mesmo a partir de metais com baixo estado de oxidação. A formação de óxidos, em detrimento da formação de complexos metal-água, é favorecida em pH elevado, uma vez que os ânions hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) tendem a oxidar esses complexos (SHRIVER et al. 2008).

Além disso, os ânions hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) atuam como agentes de mineralização. Zhong e Liu (1994) (apud LI, W-J. et al. 1999) foram os primeiros a apresentar o modelo de unidade de crescimento, o qual supõe que no processo de cristalização, cátions formam complexos com os ânions hidroxila, de maneira que o complexo cujo número de coordenação é igual àquele do cristal a ser formado, é chamado de unidade de crescimento, portanto, a formação de complexos com ( $\text{OH}^-$ ) direciona a formação de núcleos sólidos estáveis.

A suspensão resultante após a reação de co-precipitação (Figura 4-A) apresentou valor médio de pH de  $6,57 \pm 0,0470$  ( $n = 4$  amostras/ temperatura de síntese), dessa forma, com o objetivo de garantir a formação de  $\text{ZnWO}_4$ , utilizou-se solução de hidróxido de potássio 1M, como agente mineralizador, até atingir pH 9,0, ou seja, o aumento do pH foi uma estratégia para aumentar o rendimento da reação de formação de tungstato de zinco a partir de  $\text{Zn}^{2+}$  em solução. A ocorrência de aquacomplexos entre cátions de baixos números de oxidação e a água ocorre em virtude da capacidade que esses cátions possuem em atrair os elétrons do oxigênio da água (SHRIVER et al. 2008).

Outro fato a ser considerado consiste na capacidade que metais do grupo 5d e 6d, em seus estados de oxidação mais altos, possuem de formar polioxometalatos, em soluções ácidas. Nesse trabalho utilizou-se o ânion tungstato ( $\text{WO}_4^{2-}$ ) como precursor para a síntese de  $\text{ZnWO}_4$ , o tungstênio é um exemplo de metal do grupo “d” que possui estado de oxidação mais alto (NOX +4 ou +6) e forma com facilidade uma grande variedade de polioxometalatos, nesse contexto, para evitar a formação de espécies complexas do tipo polioxometalatos e favorecer a síntese de  $\text{ZnWO}_4$  com estrutura cristalina monoclinica, realizou-se o ajuste do pH até 9,0 para realizar a síntese.

Yu e cols. (2003) observaram a influência do pH na obtenção de  $\text{ZnWO}_4$  monofásico. Eles observaram que em valores de pH menor do que 4 a formação de  $\text{ZnWO}_4$  não acontece. Em pH 5 ocorre a formação de tungstato de zinco, porém com a presença de fases indesejadas, como aquacomplexos. Variando-se os valores de pH entre 6 e 9, obtiveram

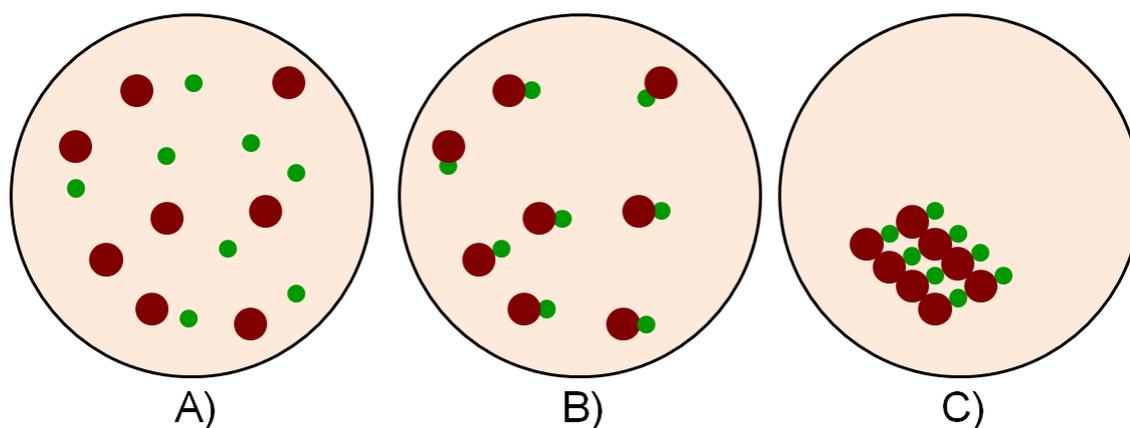
ZnWO<sub>4</sub> monofásico, contrapondo-se com os resultados para pH 13, onde se forma apenas ZnO, e, em valores de pH entre 10 e 12, observaram a formação de uma mistura contendo ZnO e ZnWO<sub>4</sub>.

A literatura não contempla a obtenção de cristais de ZnWO<sub>4</sub>, com estrutura cristalina monoclinica, após a reação de co-precipitação, muitos trabalhos revelam que a formação desse material, em seu estado cristalino, através do método hidrotermal, por exemplo, requer temperaturas maiores que 160°C (FU et al. 2006; KE et al. 2014; YOU et al 2012). Portanto, provavelmente, o composto branco formado após a reação de co-precipitação (Figura 4 – A) deve estar em seu estado amorfo, para confirmar esse hipótese foi utilizada a técnica de difração de raios X, cujos resultados serão apresentados no próximo tópico desse trabalho. Por esse motivo, nesse trabalho adotou-se o método hidrotermal assistido por radiação microondas, visando a obtenção de cristais de ZnWO<sub>4</sub>, com estrutura cristalina monoclinica.

Até o início da realização desse trabalho (setembro de 2014), 160°C era a menor temperatura descrita para a obtenção de ZnWO<sub>4</sub> utilizando-se o método hidrotermal (KE et al. 2014), dessa forma propôs-se a síntese desse óxido a temperaturas menores (120, 130, 140 e 150°C), considerando a eficiência da síntese hidrotermal - microondas em promover a rápida formação de sólidos cristalinos, com tamanho nanométrico, a baixas temperaturas, quando comparada ao método convencional (BILECKA; NIEDERBERGER, 2010).

Idealmente, uma síntese em solução deve proporcionar a formação controlada de muitos núcleos estáveis, os quais sofrem pouco crescimento adicional. De acordo com Shriver e cols. (2008) as reações em solução podem ser divididas em tres etapas. Na primeira etapa ocorre a solubilização dos cátions precursores (Fig. 5-A), que uma vez solubilizados podem interagir com outros íons de carga oposta e iniciar o processo de formação de núcleos estáveis (segunda etapa, Fig. 5-B), onde os cátions e ânions estão unidos graças às forças de atração coulombianas, na terceira etapa os núcleos sólidos e estáveis organizam-se a nível atômico originando os planos cristalográficos específicos do sólido cristalino (Fig. 5-C). Contudo, para que a reação aconteça é necessário que os reagentes (átomos, cátions e ânions) possuam energia suficiente para superar a barreira da energia de ativação, visto que, a uma dada temperatura nem todos os átomos, cátions e ânions precursores apresentam energia suficiente para superar essa barreira, portanto, nesse casos é necessário fornecer energia para que os reagentes interajam a nível atômico e originem aos sólidos cristalinos (SMITH; HASHEMI, 2009).

**Figura 5** – Etapas de crescimento de nanocristais de ZnWO<sub>4</sub>.



A) Solvatação dos reagentes iônicos, verde: Zn<sup>2+</sup>; vinho: WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>; B) Formação de núcleos sólidos e estáveis de ZnWO<sub>4</sub>; C) Crescimento das partículas sólidas originando planos cristalinos, até completo consumo dos reagentes. Fonte: Próprio autor.

Em química do estado sólido, o fenômeno de organização dos átomos, de maneira a originar os planos cristalinos, denomina-se difusão, o qual não é espontâneo para todos os materiais. A figura anterior (Fig. 5) representa um comportamento ideal para sólidos cristalinos, contudo, em sólidos reais existem defeitos ou imperfeições e o processo de difusão é lento, os núcleos sólidos não se organizam prontamente, ocorre a formação de defeitos do tipo interstícios, representados por lacunas entre átomos que se organizam em determinado plano da rede cristalina. A translocação de átomos intersticiais para preencher as lacunas e formar sólidos cristalinos, ocorre após superação da barreira da energia de ativação.

Alguns fatores relacionam-se ao sucesso do processo de difusão, dentre os quais, o tipo de difusão, se é intersticial ou substitucional, o tipo de estrutura cristalina, o tipo de imperfeição do cristal, a concentração das espécies e a temperatura. A temperatura é o fator que mais influencia as taxas de difusão, uma vez que quanto maior a temperatura, maior a probabilidade dos átomos adquirirem energia superior à energia de ativação, de acordo com a equação a seguir (CALLISTER, 2010; SMITH; HASHEMI, 2009):

$$\alpha e^{-(E^*-E)/KT} \quad (8)$$

Onde,

$\alpha$ : Probabilidade de encontrar um átomo / molécula com energia  $E^*$  maior que a energia de ativação média  $E$  de todos os átomos / moléculas;

$K$ : constante de Boltzman,  $1.38 \times 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{atom}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ;

$T$ : temperatura em Kelvin.

Dessa forma, na segunda etapa de síntese de NPs de  $\text{ZnWO}_4$ , a suspensão resultante foi submetida à síntese hidrotermal assistida por radiação microondas (Figura 2), devido à eficiência desse método em aumentar a velocidade das reações. Após a secagem, todos os sólidos obtidos em diferentes temperaturas (Figura 6) apresentaram cor branca, textura fina, são inodoros e não higroscópicos, além disso apresentaram baixa solubilidade em água e em solventes orgânicos (álcool etílico, álcool isopropílico, acetona e acetonitrila).

**Figura 6** – Aparência física de  $\text{ZnWO}_4$  obtido através do método HAM.



Fonte: Próprio autor.

A síntese HAM começou a ter o seu uso disseminado, em comparação ao método convencional, que utiliza autoclaves para o aquecimento da amostra (SEGAL, 1989), a partir do final da década de 1980, quando a sua aplicação em síntese orgânica revelou o aumento do rendimento das reações, assim como a redução do tempo necessário para o processamento da síntese (GEDYE et al., 1986; GIGUERE; BRAY; DUNCAN, 1986).

A radiação micro-ondas associada à síntese hidrotermal possibilita a redução do tempo e da temperatura de síntese de diferentes compostos, em virtude de mecanismos de aquecimento que podem ser térmicos ou específicos. Os efeitos térmicos ou aquecimento dielétrico causados pela radiação micro-ondas dependem exclusivamente das propriedades dielétricas do material, principais responsáveis pela conversão de energia proveniente dessa radiação em

energia térmica. O fator de dissipação de energia ou tangente de perda ( $\text{tg } \delta$ ) relaciona-se ao tempo que os dipolos de um material precisam para se reorientar na presença de um campo elétrico oscilante. Substâncias polares apresentam elevados valores de  $\text{tg } \delta$  e são muito eficazes na absorção das micro-ondas, ou seja, aquecem rapidamente (BILECKA; NIEDERBERGER, 2010; DUDLEY; RICHERT; STIEGMAN, 2015).

Nesse trabalho, o solvente polar utilizado foi a água ( $\text{tg } \delta = 1230 \times 10^{-4}$ ), devido ao seu elevado valor de  $\text{tg } \delta$ , que o torna eficiente na absorção de radiação micro-ondas, ocasionando um rápido aquecimento do sistema reacional. Além disso, ao absorver a energia das microondas, o solvente e os núcleos sólidos estáveis de partículas de  $\text{ZnWO}_4$  em suspensão (Fig. 6-B) podem sofrer alteração do estado de movimento dos seus átomos constituintes, os quais podem vibrar, girar sobre si mesmos e alinharem-se uns com os outros (BILECKA; NIEDERBERGER, 2010; DUDLEY; RICHERT; STIEGMAN, 2015).

Assim, os efeitos térmicos podem resultar de polarização dipolar como consequência de interações dipolo-dipolo entre moléculas polares e o campo eletromagnético das microondas. Esses efeitos originam-se na dissipação de energia em forma de calor com resultado da agitação e fricção intermolecular quando os dipolos mudam sua orientação a cada alternância do campo elétrico. Essa dissipação de energia no núcleo dos materiais permite uma distribuição muito mais regular da temperatura e, portanto, um rápido aquecimento, quando comparado com o aquecimento clássico, como consequência praticamente não há gradientes térmicos em sistemas HAM e o equilíbrio térmico é rapidamente alcançado (PERREUX; LOUPY, 2001).

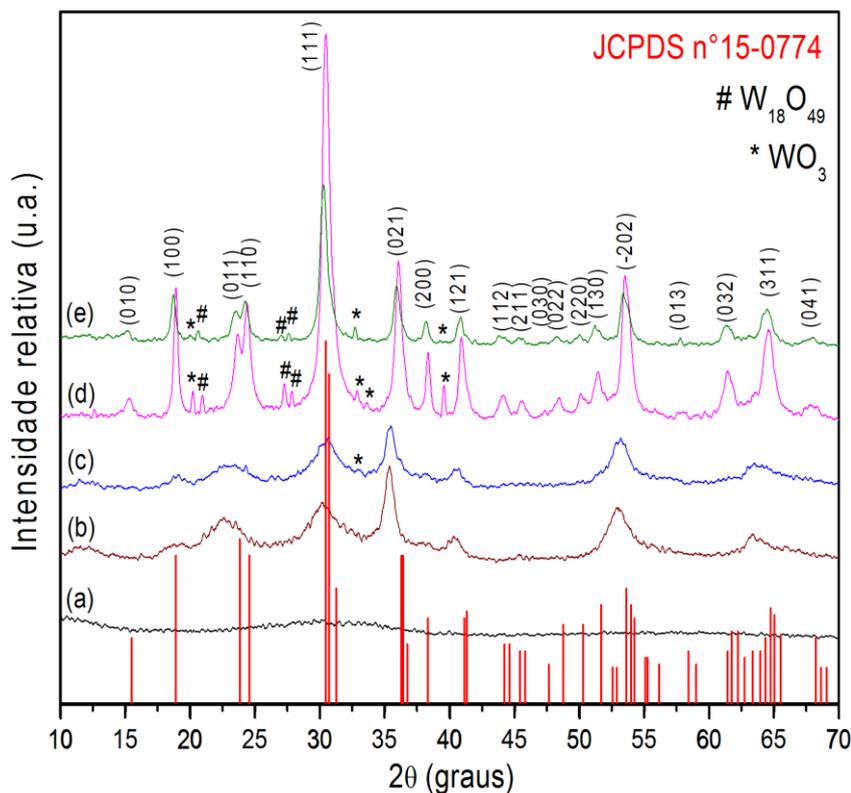
Por fim, os efeitos não-térmicos associados à eficiência das micro-ondas caracterizam-se por modificações das propriedades termodinâmicas da reação, que de certa forma são resultado dos efeitos térmicos dependentes das propriedades dielétricas das moléculas e íons em solução. Acredita-se que a interação da radiação micro-ondas com o solvente e com as partículas dispersas seja acompanhada de efeitos termodinâmicos: o efeito entálpico devido ao armazenamento de energia livre da radiação ou da energia vibracional por uma molécula ou grupo funcional presente no meio reacional; e o efeito entrópico resultante do alinhamento das moléculas. Juntos esses efeitos promovem uma redução da energia de ativação de Arrhenius necessária para o processamento da reação, tornando as reações em síntese HAM termodinamicamente favoráveis (DUDLEY; RICHERT; STIEGMAN, 2015).

### 1.5.2. DIFRATOMETRIA DE RAIOS X

A Figura 7 ilustra o padrão de difração das amostras de  $\text{ZnWO}_4$  comparado ao padrão JCPDS. Pode-se observar a influência da temperatura utilizada no método hidrotermal assistido por micro-ondas no estado de ordem-desordem dos óxidos obtidos, de forma que o aumento da temperatura de síntese resulta em aumento da cristalinidade do material. A amostra obtida após a reação de co-precipitação (Fig. 7 - a) não apresenta picos de difração o que sugere que essa amostra apresenta-se no seu estado amorfo ou desordenado, esse resultado está coerente com outros dados da literatura, os quais revelam que a obtenção de  $\text{ZnWO}_4$  cristalino requer fornecimento de calor (CHEN S-J et al. 2003; PARHI; KARTHIK; MANIVANNAN; 2008; SCHOFIELD; KNIGHT; CRESSEY, 1996). Os primeiros relatos de obtenção desse material em seu estado cristalino citam a utilização de elevadas temperaturas de calcinação dos compostos obtidos através de reação do estado sólido. Nos trabalhos pioneiros realizados pelo grupo de pesquisa do Professor Kroger (1915 – 2006), os quais contribuíram de maneira expressiva para o conhecimento atual sobre as propriedades físicas de molibdatos e tungstatos, a síntese de  $\text{ZnWO}_4$  cristalino era realizada em temperaturas entre 800 a 1100°C (BOTDEN; KRÖGER, 1949).

Pode-se observar na Figura 7 a existência de dois padrões semelhantes de difração. As amostras sintetizadas a 120 e 130°C (Fig. 7 – b e Fig. 7 – c) exibem um padrão de difração semelhante, enquanto as amostras obtidas a 140 e a 150°C (Fig. 7 – d e Fig. 7 - e) exibem outro padrão de difração. Os difratogramas referentes às amostras de 120°C e 130°C exibem picos de difração largos, de baixa intensidade e mal resolvidos, indicativo de amostras semicristalinas, que não apresentam completo ordenamento estrutural a longo alcance. Por outro lado, os difratogramas das amostras obtidas a 140 e a 150°C exibem picos de difração intensos, estreitos e bem definidos, o que sugere a elevada cristalinidade ou ordenamento estrutural a longo alcance dos sólidos obtidos, conseqüentemente os picos de difração dessas amostras estão de acordo com a ficha cristalográfica JCPDS n° 15-0774, correspondente a  $\text{ZnWO}_4$  com estrutura monoclinica tipo wolframita, com grupos espaciais P2/c.

**Figura 7** - Padrões de DRX de amostras de  $\text{ZnWO}_4$  sintetizadas através do método HAM.



Padrão de difração de raios X para  $\text{ZnWO}_4$  obtido após a reação de co-precipitação (a); padrão de difração de raios X para  $\text{ZnWO}_4$  obtido através de síntese HAM a 120°C (b); 130°C (c); 140°C (d); 150°C (e). \* picos de difração para  $\text{WO}_3$ , de acordo com a ficha cristalográfica JCPDS n° 88-550; # picos de difração para  $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$ , de acordo com a ficha cristalográfica JCPDS n° 36-101.  $n = 4/\text{grupo}$ . Fonte: Próprio autor.

Observou-se que os difratogramas das amostras obtidas a 120°C (Fig. 7-b) e a 130°C (Fig. 7-c) apresentaram picos alargados, o que pode sugerir a presença de imperfeições nesses sólidos. O alargamento dos picos de difração pode sugerir que as amostras apresentam menor tamanho de cristalito ou microdeformação da rede cristalina. Outro aspecto marcante dos difratogramas da série de  $\text{ZnWO}_4$  obtidos em diferentes temperaturas consiste no deslocamento dos picos de difração para ângulos maiores, decorrente do aumento da temperatura de síntese. Alterações nas posições dos picos de difração podem estar relacionadas a diferenças entre as dimensões da célula unitária, o sistema cristalino e os grupos espaciais teóricos e experimentais (GUINIER, 1994).

De maneira surpreendente, os difratogramas das amostras 140°C e 150°C revelam a presença de segundas fases, óxido de tungstênio,  $\text{WO}_3$ , e polióxido de tungstênio,  $\text{W}_{18}\text{O}_{49}$  (Fig. 7). Conforme discutido anteriormente, a formação de óxidos de tungstênio é pH dependente, contudo, na etapa de síntese, o ajuste do pH das suspensões até 9,0, não foi eficaz

para minimizar a formação de segundas fases. Os difratogramas de raios de X apresentados em outros trabalhos, onde a síntese hidrotermal convencional ou assistida por radiação micro-ondas foi empregada para a obtenção de  $\text{ZnWO}_4$  cristalinos, não apresentam óxido ou polióxido de tungstênio como segunda fase (CHEN S-J et al. 2003; KLOPROGGE et al. 2004; PEREIRA et al. 2018).

De acordo com a ficha cristalográfica JCPDS n° 15-0774, são esperados 44 picos de difração com intensidades diferentes para  $\text{ZnWO}_4$  em seu estado cristalino, com estrutura monoclinica, tipo wolframita. A Tabela 3 exhibe os valores de  $2\theta$  para picos de difração teóricos (ficha cristalográfica JCPDS n°15-0774) e experimentais observados para os sólidos obtidos em diferentes temperaturas através do método HAM.

**Tabela 3** - Comparação entre a posição experimental e teórica dos picos de difração.

			<b>2<math>\theta</math>(°) experimental / temperatura de síntese (°C)</b>				
<b>H</b>	<b>k</b>	<b>l</b>	<b>20(°) teórico</b>	<b>120</b>	<b>130</b>	<b>140</b>	<b>150</b>
0	1	0	15,48	-	-	15,48	15,13
1	0	0	18,91	18,77	19,04	18,96	18,72
0	1	1	23,84	22,52	22,73	23,73	23,50
1	1	0	24,57	23,62	23,49	24,49	24,26
1	1	1	30,47	30,14	30,30	30,36	30,14
0	2	1	36,31	35,36	35,36	36,02	35,91
2	0	0	38,34	-	38,26	38,41	38,19
1	2	1	41,15	39,93	40,46	40,91	40,83
-1	2	1	41,32	-	-	41,45	41,21
1	1	2	44,23	-	44,26	44,17	43,79
-1	1	2	44,62	-	-	-	44,24
2	1	1	45,45	45,31	45,46	45,57	45,29
-2	1	1	45,84	-	-	-	45,63
0	3	0	47,67	-	47,53	47,63	47,29
0	2	2	48,76	-	48,34	48,83	48,26
2	2	0	50,28	-	-	50,25	49,04
1	3	0	51,72	-	-	51,55	51,13
-2	0	2	53,63	52,98	53,29	53,44	53,37
-2	1	2	56,15	-	-	56,23	56,03
0	1	3	58,45	-	58,51	58,07	58,49
3	0	0	59,04	-	59,27	59,16	58,41
0	3	2	61,45	-	61,00	61,22	61,31
1	1	3	61,77	-	-	-	61,66
-1	1	3	62,24	-	-	-	62,24
2	3	0	62,76	-	-	62,64	62,65
-2	2	2	63,39	-	63,31	63,28	63,07
3	1	1	64,35	63,42	63,40	64,60	64,18
-3	1	1	64,78	-	64,88	64,78	64,48
0	2	3	65,51	-	-	65,78	65,66
0	4	1	68,24	-	67,74	67,69	68,03
1	2	3	68,63	-	68,84	68,18	68,70

Fonte: Próprio autor.

Nesse trabalho, treze (13) picos de difração não foram indexados para nenhuma das amostras obtidas, utilizando-se o software Crystallographica Search Match (versão 2). Alguns fatores podem estar relacionados à ausência dos picos de difração, tais como a baixa resolução do equipamento, que algumas vezes não permite diferenciar um sinal do ruído de picos de difração de baixa intensidade. Outro fator comumente observado em outros trabalhos onde

ZnWO<sub>4</sub> foi sintetizado através do método hidrotermal, consiste na convolução de picos, devido à menor cristalinidade dos sólidos (FU et al. 2006).

Esses resultados estão de acordo com aqueles descritos por Kloprogge e cols. (2004), os quais sintetizaram tungstatos metálicos com estrutura cristalina schelita (CaWO<sub>4</sub>, PbWO<sub>4</sub>) e wolframita (Fe, Mn, ZnWO<sub>4</sub>), a 150°C durante 1 hora, e demonstraram experimentalmente que a síntese de tungstatos metálicos, com ausência de segundas fases, pode ser realizada com sucesso pelo método hidrotermal assistido por micro-ondas. Nesse trabalho, eles observaram que a cristalinidade dos minerais do grupo schelita é maior do que a dos minerais do grupo wolframita (FeWO<sub>4</sub>, MnWO<sub>4</sub> e ZnWO<sub>4</sub>), utilizando as mesmas condições de síntese (KLOPROGGE et al. 2004). Chen, D. e cols. (2003) também observaram resultados semelhantes para tungstato, com diferentes estruturas cristalinas, obtidos através de síntese hidrotermal convencional, ou seja, verificaram que os difratogramas de raios X para os tungstatos que cristalizam com estrutura schelita (CaWO<sub>4</sub>, SrWO<sub>4</sub>, BaWO<sub>4</sub>) apresentam picos de difração mais intensos, nítidos e finos, características que sugerem maior cristalinidade, enquanto os difratogramas para os sólidos com estrutura wolframita (CdWO<sub>4</sub>, ZnWO<sub>4</sub>, PbWO<sub>4</sub>) apresentam picos com menor intensidade e nitidez (CHEN, D. et al. 2003).

De acordo com Kloprogge e cols. (2004), a diferença entre o grau de cristalinidade de tungstatos com estrutura schelita e wolframita, correlaciona-se com a maneira como esses minerais formam-se na natureza. Os cristais do tipo wolframita são encontrados associados ao quartzo nas veias das áreas periféricas dos corpos graníticos, sendo que a formação de quartzo, a partir do resfriamento do magma ao encontrar água que penetra no subsolo, é um processo lento, que pode durar milhões de anos (KLOPROGGE et al. 2004).

Observou-se a ocorrência de convolução com os picos representados pelos índices de Miller (hkl) -111 e 020, os quais seriam observados nos ângulos (2θ) 30,72 e 31,26, respectivamente. A convolução de picos de difração ocorre com frequência entre picos de difração com ângulos semelhantes, devido ao alargamento dos picos como consequência de tamanho de partícula reduzido ou ao estado de ordem-desordem do sólido. Recentemente, Pereira e colaboradores sintetizaram nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub> através do método HAM, a 140°C, 150°C e 160°C, durante 60 minutos, partindo de tungstato de sódio e nitrato de zinco como precursores e embora eles obtiveram todos os sólidos em seu estado cristalino, observaram a ocorrência de convolução dos picos -111 e 020, assim como foi observado nesse trabalho (PEREIRA et al. 2018).

De acordo com a Tabela 3 pode-se observar que o aumento da temperatura de síntese ocasionou o aumento do número de picos de difração ao longo da série (120, 130, 140 e

150°C), ou seja, houve o aumento do ordenamento estrutural a longo alcance para os sólidos. As amostras obtidas a 120, 130, 140 e 150°C apresentaram 9, 20, 27 e 31 picos de difração indexados, respectivamente.

Adicionalmente, observou-se que, ao longo da série, o aumento da temperatura de síntese resultou na redução do alargamento dos picos, o que sugere o aumento da cristalinidade do material assim como do tamanho médio de cristalito, essa observação está coerente com os valores médios de tamanho de cristalito obtidos através da equação de Scherrer, conforme descrito na Tabela 4. Fu e cols. (2006) também observaram que o aumento da temperatura de síntese resultou em aumento do tamanho médio de partículas de ZnWO<sub>4</sub> sintetizado através de síntese hidrotermal convencional (SHC).

**Tabela 4** – Tamanho médio de cristalito para nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub> obtidas através do método HAM.

<b>Temperatura de síntese (°C)</b>	<b>Tamanho médio de cristalito (nm)</b>
<b>120</b>	3,670
<b>130</b>	4,680
<b>140</b>	13,25
<b>150</b>	14,42

Fonte: Santos et al. 2018.

Diversos trabalhos revelam a eficiência da síntese hidrotérmica assistida por micro-ondas para a obtenção de nanopartículas de óxidos, como trabalhos anteriores realizados por Rocha e cols. (2016), Pinatti e cols. (2016), Silva e cols. (2016), De Santana e cols. (2014), Cabral e cols. (2014). Comparado ao método hidrotermal convencional, o aquecimento através das micro-ondas apresenta vantagens tais como o aumento da velocidade da reação e redução do tempo necessário para a obtenção dos produtos. Além disso, as micro-ondas proporcionam um mecanismo uniforme de aquecimento do solvente e dos reagentes, culminando com a formação de núcleos estáveis, os quais posteriormente organizar-se-ão com morfologia específica, conforme as condições de síntese (BILECKA; NIEDERBERGER, 2010; EDE et al. 2015).

A eficiência do uso da radiação micro-ondas para a obtenção de sólidos cristalinos, em temperaturas menores que 200°C, fica evidente quando se compara a temperatura necessária para a obtenção de ZnWO<sub>4</sub> em seu estado cristalino por meio de técnicas de calcinação em forno convencional, Ede e cols. (2015), por exemplo, submeteram amostras de ZnWO<sub>4</sub> a

calcinação em forno convencional a 200, 300, 400 e 500°C, durante 2h, contudo obtiveram o composto em seu estado cristalino (estrutura monoclinica com grupos espaciais P2/c) apenas após a calcinação a 500°C.

Atualmente, muitos métodos são relatados para o preparo de nanopartículas de tungstato de zinco, no entanto, a síntese assistida por micro-ondas, a baixas temperaturas, ainda é pouco explorada. Em comparação com a síntese hidrotermal convencional, a síntese hidrotermal acoplada ao uso da radiação micro-ondas favorece a obtenção de compostos com elevada cristalinidade em menores temperaturas e intervalos de tempo, fortalecendo a tese de que o uso das micro-ondas em síntese de materiais cerâmicos promove o aumento da cinética de cristalização (CHEN, S-J et al. 2003; KLOPROGGE et al. 2004; PEREIRA et al. 2018).

Antes da finalização desse trabalho, Pereira e cols. (2018) demonstraram a obtenção de nanopartículas de  $ZnWO_4$  em seu estado cristalino, a 140°C durante 60 minutos, utilizando a síntese hidrotermal assistida por micro-ondas, ou seja, em uma temperatura menor do que já havia sido explorado por Kloprogge e cols. 2004, os quais demonstraram a obtenção desse sólido cristalino após síntese conduzida a 150°C durante 60 minutos, portanto, corroborando com os resultados dessa tese, até o momento 140°C é a menor temperatura que permite a obtenção de nanopartículas de  $ZnWO_4$  através do método hidrotermal assistido por microondas, durante 1h.

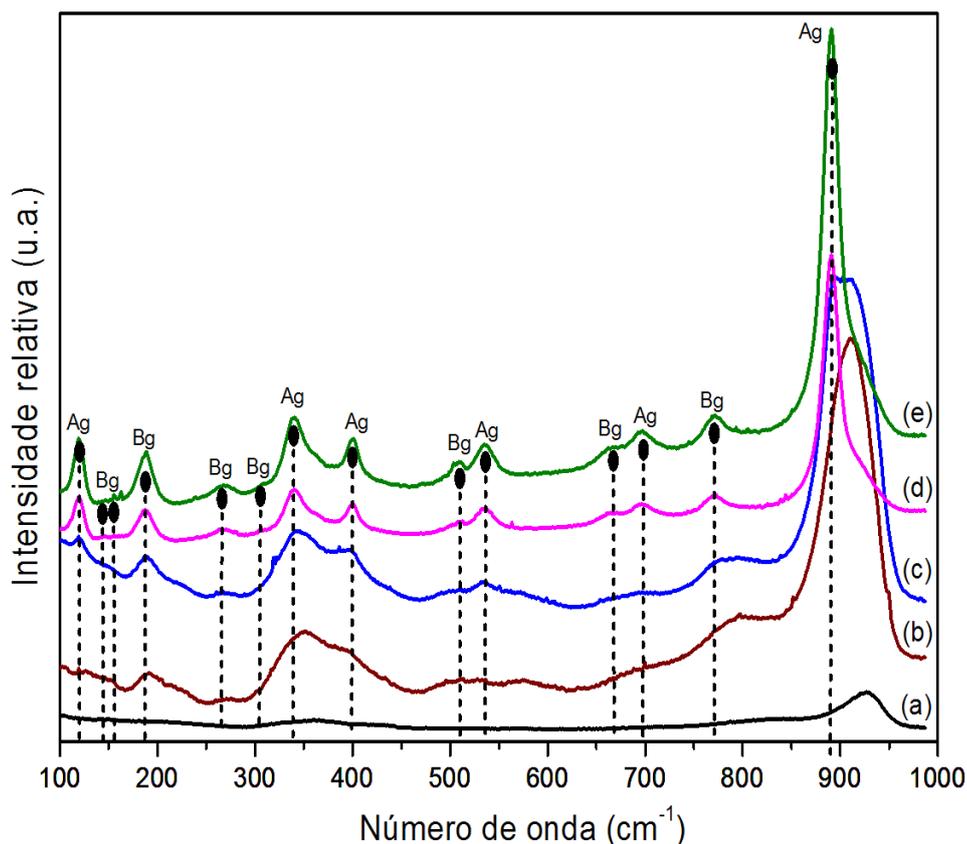
### 1.5.3. ESPECTROSCOPIA RAMAN

Os resultados para o ensaio de espectroscopia Raman, ilustrados na Figura 8, revelaram ordem estrutural a curto alcance para todas as amostras, exceto para a amostra de  $ZnWO_4$  obtida após a reação de co-precipitação, não submetida a radiação microondas, a qual apresentou apenas uma banda de absorção em  $923\text{cm}^{-1}$  (Fig. 8-a), o que revela a maior sensibilidade dessa técnica quando comparada à difração de raios X. Para as amostras obtidas entre 120 e 150°C foram indexados os principais modos vibracionais esperados para o sólido cristalino  $ZnWO_4$ , com estrutura monoclinica, grupos espaciais P2/c, grupo pontual  $C_{2h}$ , com duas unidades de fórmula por célula primitiva, não sendo identificado nenhum modo vibracional de outras moléculas, essa informação é de grande relevância, considerando a sensibilidade da técnica de espectroscopia Raman, a qual é uma excelente ferramenta para a avaliação da presença de contaminantes e impurezas provenientes da síntese, como a presença de contra-íons. Como os espectros Raman não revelaram a presença de impurezas, acredita-se

que as etapas de lavagem dos sólidos obtidos, com água ultrapura e etanol absoluto, foram eficazes na remoção de impurezas.

Conforme ilustrado na Figura 8, observou-se a influência da temperatura de síntese na cristalinidade dos sólidos, em virtude do aumento do número de bandas de absorção, como consequência do aumento do ordenamento estrutural a curto alcance, ao longo da série (120, 130, 140 e 150°C), corroborando com os resultados da difratometria de raios X (Fig. 7). A espectroscopia Raman também fornece uma ideia sobre o tamanho médio de partícula, na Figura 8 é possível observar a redução da largura da base das bandas de absorção, decorrente do aumento da temperatura de síntese, o que sugere o aumento do tamanho médio das partículas ao longo da série, assim como previsto por meio dos cálculos do tamanho médio de cristalito através da equação de Scherrer.

**Figura 8** – Espectros Raman de amostras de  $\text{ZnWO}_4$  sintetizadas através do método HAM.



Espectro Raman para  $\text{ZnWO}_4$  obtido após a reação de co-precipitação (a); Espectro Raman para  $\text{ZnWO}_4$  obtido através de síntese HAM a 120°C (b); 130°C (c); 140°C (d); 150°C (e). A e B consistem em espécies não-degeneradas, onde A representa a espécie simétrica em relação à rotação em torno do eixo principal (eixo z), enquanto B representa as espécies antissimétricas em relação à rotação em torno do eixo z.  $n = 4/\text{grupo}$ . Fonte: Próprio autor.

Os resultados para o ensaio de espectroscopia Raman, estão de acordo com aqueles descritos por Kloprogge e cols. (2004), os quais sintetizaram tungstatos metálicos com estrutura cristalina schelita ( $\text{CaWO}_4$ ), stolzita ( $\text{PbWO}_4$ ) e wolframita ( $\text{Fe, Mn, Zn WO}_4$ ), a  $150^\circ\text{C}$  durante 1 hora, eles demonstraram experimentalmente que a síntese de tungstatos metálicos, com ausência de segundas fases, pode ser realizada com sucesso pelo método hidrotermal assistido por micro-ondas.

O cálculo para obtenção do número de modos vibracionais conforme a teoria de grupos (MACZKA et al. 2011; NAKAMOTO, 2009), resulta em 36 modos ativos para o  $\text{ZnWO}_4$ , com estrutura monoclinica tipo wolframita com grupo espacial  $\text{P2}/c$ , representados pela equação a seguir:

$$\Gamma = 8A_g + 10B_g + 8A_u + 10B_u \quad (9)$$

Quinze (15) modos são ativos no infravermelho ( $7A_u + 8B_u$ ), 3 modos referem-se a vibrações acústicas ( $1A_u + 2B_u$ ) e 18 modos vibracionais são ativos na espectroscopia Raman ( $8A_g + 10B_g$ ). O espectro de Raman das amostras sintetizadas nesse trabalho não revela todos os modos vibracionais esperados, contudo as principais bandas são observadas para as amostras sintetizadas a  $140^\circ\text{C}$  (Fig. 8-d) e a  $150^\circ\text{C}$  (Fig. 8-e) o que reforça a maior cristalinidade dessas amostras quando comparadas às amostras obtidas a  $120^\circ\text{C}$  (Fig. 8-b) e a  $130^\circ\text{C}$  (Fig. 8-c). As amostras de  $\text{ZnWO}_4$  obtidas através do método hidrotermal assistido por micro-ondas a 120, 130, 140 e  $150^\circ\text{C}$  apresentaram 5, 7, 12 e 14 modos vibracionais Raman ativos, respectivamente (Tabela 5), esses resultados estão coerentes com aqueles expostos anteriormente no ensaio de DRX, visto que o aumento da temperatura ocasionou o aumento da cristalinidade dos sólidos de  $\text{ZnWO}_4$ .

Os modos de vibração internos para amostras de  $\text{ZnWO}_4$  referem-se às vibrações das ligações W-O dos octaedros  $[\text{WO}_6]$  enquanto os modos externos estão associados às vibrações dos octaedros  $[\text{WO}_6]$  em relação ao octaedro  $[\text{ZnO}_6]$ . Segundo Dai e cols. (2014), as vibrações internas dos octaedros distorcidos de  $[\text{WO}_6]$  são compostas por 6 modos, os quais são observados em frequências maiores quando comparados aos modos externos, visto que as ligações internas no octaedro  $[\text{WO}_6]$  são mais fortes que as ligações externas a esse octaedro. De acordo com esses autores os modos de estiramento internos de  $\text{ZnWO}_4$  dividem-se em três modos  $A_g$  observados nas frequências  $907$ ,  $709$  e  $545\text{cm}^{-1}$  e três modos  $B_g$  em  $785$ ,  $676$  e  $515\text{cm}^{-1}$ . Neste trabalho observou-se a presença de todos os modos internos de vibração para NPs

de  $\text{ZnWO}_4$  obtidas a 140 e a 150°C, conforme descrito na Tabela 5, contudo neste trabalho, os modos vibracionais foram observados em frequências um pouco menores, quando comparadas aos resultados de Dai e cols. (2014).

Conforme demonstrado na Tabela 5 os resultados experimentais obtidos para as amostras de  $\text{ZnWO}_4$  estão de acordo com os resultados apresentados na literatura para esse sólido em seu estado cristalino, obtido por meio de síntese hidrotermal (DAI et al. 2014; LI et al. 2016; PEREIRA et al. 2018). Contudo, observaram-se pequenas variações quanto à posição e largura das bandas de absorção, fato que em espectroscopia Raman, muitas vezes, relaciona-se ao estado de ordem-desordem do material, assim como ao tamanho das partículas (DAI et al. 2014; KALINKO; KUZMIN, 2009).

**Tabela 5** - Comparação entre os modos vibracionais Raman teóricos e experimentais de ZnWO<sub>4</sub> obtidos em diferentes temperaturas de síntese através do método HAM.

Modos	Frequência vibracional (cm <sup>-1</sup> )					SMR	Tipo de vibração
	SMO	120°C	130°C	140°C	150°C		
1	-	-	-	-	-	Bg	
2	-	-	118	120	118	Ag	
3	-	-	-	147	147	Bg	
4	-	-	-	-	163	Bg	
5	-	191	187	187	187	Bg	
6	-	-	-	-	-	Ag	Estiramento Zn-O
7	-	-	-	267	266	Bg	Deformação cátions nos clusters
8	-	-	-	-	-	Ag	Deformação dos cátions nos clusters
9	-	-	-	-	308	Bg	
10	-	-	342	340	340	Ag	
11	-	350	-	-	-	Bg	Deformação de grupos WO <sub>2</sub> terminais
12	-	389	396	399	399	Ag	Deformação de grupos WO <sub>2</sub> terminais
13*	-	-	-	506	506	Bg	Estiramento (W <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>n</sub>
14*	-	-	530	532	533	Ag	Estiramento (W <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>n</sub>
15*	-	-	-	662	663	Bg	Estiramento (W <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>n</sub>
16*	-	-	-	693	695	Ag	Estiramento (W <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ) <sub>n</sub>
17*	-	795	778	770	770	Bg	Estiramento WO <sub>2</sub> terminais
18*	923	909	902	890	891	Ag	Estiramento WO <sub>2</sub> terminais

SMO: ZnWO<sub>4</sub> obtido após a reação de co-precipitação, não submetido à radiação microondas; \* modos de vibração internos de [WO<sub>6</sub>]. SMR: simetria do modo Raman. A: vibração simétrica; B: vibração assimétrica. Tipos de vibração conforme Daturi et al. 1997 e Fomichev; Kondratov, 1994. Fonte: Próprio autor.

O modo vibracional 18\*, descrito na Tabela 5 refere-se às frequências de vibração interna de maior intensidade, correspondente a estiramento da ligação W-O, para ZnWO<sub>4</sub>. Observou-se um sutil deslocamento nos valores das frequências vibracionais, as quais diminuiram conforme se aumentou a temperatura de síntese. Kalinko e Kuzmin (2009) obtiveram resultado semelhante para os espectros Raman de amostras de ZnWO<sub>4</sub> calcinadas a

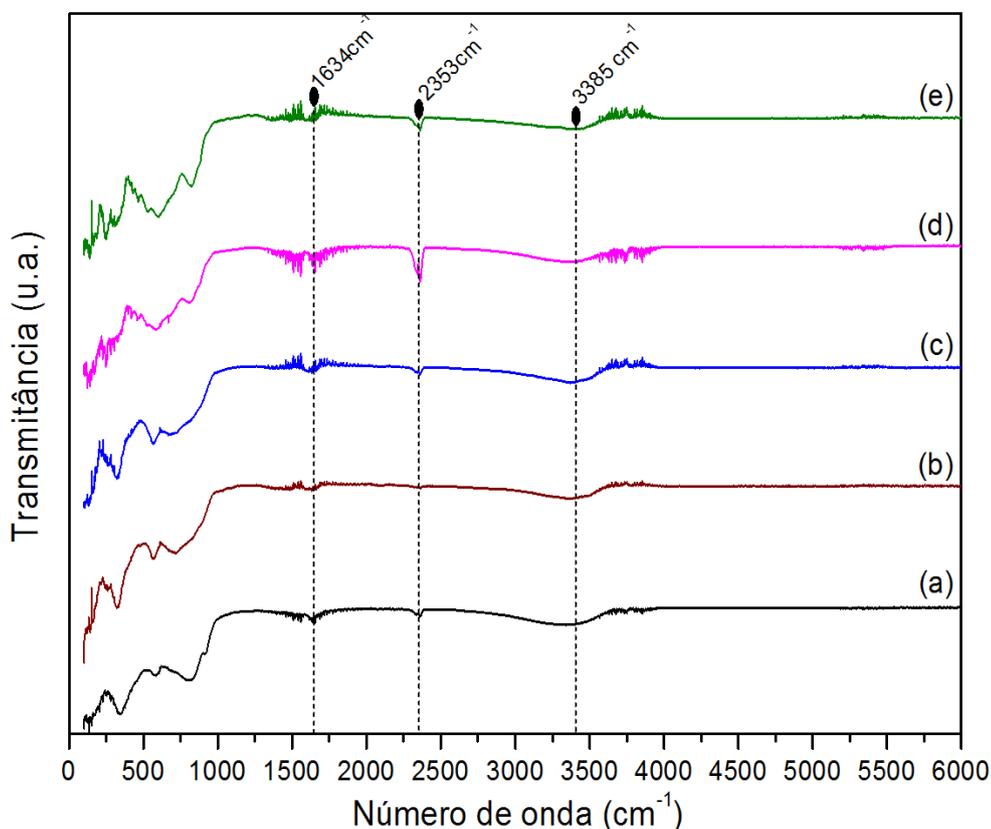
80, 300, 400, 500 e 800°C, eles observaram o deslocamento da banda de absorção de maior intensidade para frequências menores, o aumento do número de modos vibracionais e a redução da largura da base das bandas de absorção com o aumento da temperatura de síntese, assim como foi observado neste trabalho. Eles argumentaram que as bandas no espectro Raman de ZnWO<sub>4</sub> obtidos a temperaturas inferiores a 500°C são alargadas, devido à redução e dispersão do tamanho dos cristalitos (KALINKO; KUZMIN, 2009).

Neste trabalho, a redução da largura da base do modo vibracional mais intenso (Fig. 8), na medida em que se aumentou a temperatura de síntese das NPs de ZnWO<sub>4</sub>, pode estar associado ao aumento do tamanho médio de cristalito, uma vez que os resultados do ensaio de DRX revelaram um tamanho médio de cristalito crescente com o aumento da temperatura (Tabela 4). Neste trabalho as amostras sintetizadas a 120, 130, 140 e 150°C apresentaram tamanho médio de cristalito com valores de 3,670, 4,680, 13,25, 14,42nm, respectivamente (Tabela 4). Adicionalmente, a mudança na posição das bandas de absorção correlaciona-se à cristalinidade do material, coerentemente com outros dados da literatura para o tungstato de zinco (BASIEV et al. 2000; KALINKO; KUZMIN, 2009), neste trabalho, o aumento da cristalinidade do material resultou em deslocamento das bandas de absorção para frequências menores, conforme descrito na Tabela 5.

#### **1.5.4. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER**

A Figura 9 representa o espectro de absorção na região do infravermelho no intervalo de 100 a 6000cm<sup>-1</sup>, de amostras de ZnWO<sub>4</sub>. De maneira geral, os espectros apresentaram um perfil de absorção semelhante para todas as amostras de ZnWO<sub>4</sub>, sintetizadas nesse trabalho. Observam-se duas regiões com bandas de absorção evidentes, uma região de 100 a 1000cm<sup>-1</sup>, com diversas bandas de absorção referentes às vibrações das ligações metal-oxigênio (NAKAMOTO, 2009), as quais serão discutidas separadamente (Fig. 10), e outra região entre 1000 e 4000cm<sup>-1</sup> com três bandas de absorção, observadas a 3385cm<sup>-1</sup>, 2353cm<sup>-1</sup> e 1634cm<sup>-1</sup> (Fig. 9).

**Figura 9** – Espectro FT-IR de amostras de  $\text{ZnWO}_4$  obtidas através do método HAM, no intervalo de 100 a  $6000\text{cm}^{-1}$ .



$\text{ZnWO}_4$  obtido após a reação de co-precipitação (a);  $\text{ZnWO}_4$  obtido através de síntese HAM a  $120^\circ\text{C}$  (b);  $130^\circ\text{C}$  (c);  $140^\circ\text{C}$  (d);  $150^\circ\text{C}$  (e). Fonte: Próprio autor.

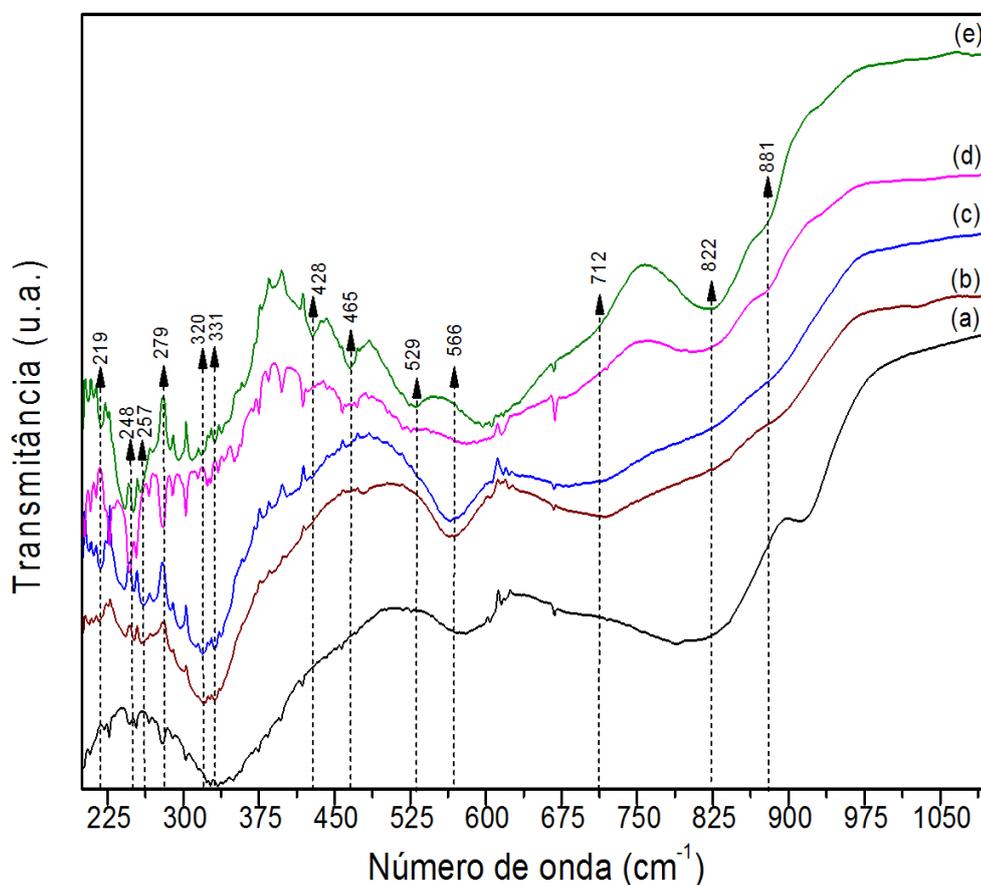
As bandas de absorção observadas em  $3385\text{cm}^{-1}$  e  $1634\text{cm}^{-1}$  referem-se a estiramento e deformação, respectivamente, das ligações O-H de moléculas de água incorporadas à superfície das amostras (MANCHEVA; IORDANOVA; DIMITRIEV, 2011; RAHIMI-NASRABADI et al., 2013; YU; YU, 2009). Pode-se observar a presença de uma banda referente a vibrações das ligações C-O de moléculas de  $\text{CO}_2$ , presentes na atmosfera de análise, na região de  $2353\text{cm}^{-1}$  (Fig. 9).

Nesse trabalho, utilizou-se nitrato de zinco como precursor para a realização da síntese de nanopartículas de tungstato de zinco, sabe-se que moléculas de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) apresentam bandas de absorção nas regiões de  $1410$  a  $1340\text{cm}^{-1}$  e de  $860$  a  $800\text{cm}^{-1}$  (NAKAMOTO, 2009). O espectro obtido para todas as amostras (Figura 9) não revelou a presença de nenhuma banda referente às vibrações de moléculas de  $\text{NO}_3^-$ , o que sugere que as lavagens do material após a etapa de síntese foram eficientes na remoção dos contra-íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{NO}_3^-$ .

Nesse trabalho, a espectroscopia FT-IR foi realizada em modo de transmitância para avaliar a presença de ligações metal-oxigênio em nanopartículas de tungstato de zinco. A Figura 10 ilustra os espectros de absorção na região infravermelho no intervalo de 200 a  $1100\text{cm}^{-1}$ , para as amostras de tungstato de zinco sintetizadas nesse trabalho. Sabe-se que tungstatos metálicos que cristalizam com estrutura monoclinica tipo wolframita apresentam 36 modos vibracionais de acordo com a teoria de grupos (equação 9), dentre os quais, quinze (15) modos são ativos no infravermelho ( $7A_u + 8B_u$ ), 3 modos referem-se a vibrações acústicas ( $1A_u + 2B_u$ ) e 18 modos vibracionais são ativos na espectroscopia Raman ( $8A_g + 10B_g$ ).

Foi possível identificar 13 modos vibracionais ativos em infravermelho, conforme ilustrado na Figura 10. Os modos vibracionais  $B_u$  em  $219$  e  $248\text{cm}^{-1}$  são atribuídos ao estiramento assimétrico das ligações entre os octaedros  $[\text{ZnO}_6]$ - $[\text{ZnO}_6]$ . Os modos  $A_u$  em  $320$  e  $331\text{cm}^{-1}$  referem-se a estiramento simétrico das ligações O-Zn entre octaedros distorcidos  $[\text{ZnO}_6]$ - $[\text{ZnO}_6]$ , enquanto o modo observado em  $428\text{cm}^{-1}$  refere-se ao deformação assimétrica dessa ligação. Os modos  $B_u$  e  $A_u$  observados em  $465$  e  $529\text{cm}^{-1}$ , correspondem a deformação simétrica da ligação O-W entre octaedros distorcidos  $[\text{WO}_6]$ - $[\text{WO}_6]$  (LIU et al . 2017; ZHAI et al. 2016).

**Figura 10** – Espectro FT-IR de amostras de  $\text{ZnWO}_4$  obtidas através do método HAM, no intervalo de 200 a  $1100\text{cm}^{-1}$ .



$\text{ZnWO}_4$  obtido após a reação de co-precipitação (a);  $\text{ZnWO}_4$  obtido através de síntese HAM a  $120^\circ\text{C}$  (b);  $130^\circ\text{C}$  (c);  $140^\circ\text{C}$  (d);  $150^\circ\text{C}$  (e). Fonte: Próprio autor.

A banda de absorção em  $566\text{cm}^{-1}$  refere-se ao modo  $B_u$  correspondente a estiramento assimétrico das ligações O-W dentro dos octaedros distorcidos  $[\text{WO}_6]$  (Fig. 10). O modo  $A_u$  observado em  $712\text{cm}^{-1}$  e os modos observados em  $822\text{cm}^{-1}$  ( $B_u$ ) e  $881\text{cm}^{-1}$  ( $A_u$ ) (Fig. 10) referem-se ao deformação e ao estiramento simétrico das ligações Zn-O-W entre octaedros distorcidos  $[\text{ZnO}_6]$ - $[\text{WO}_6]$  (CHEN et al. 2017; EDE et al. 2015; SIRIWONG et al. 2011).

Os resultados aqui apresentados estão de acordo com outros apresentados para nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  obtidas através de síntese hidrotermal (CHEN et al. 2017; PEREIRA et al. 2018; SIRIWONG et al. 2011), todavia, devido aos baixos limites de detecção do equipamento utilizado nesse ensaio, abaixo de  $200\text{cm}^{-1}$ , não foi possível observar os modos vibracionais  $B_u$  e  $A_u$  esperados em 96, 134, 176 e  $231\text{cm}^{-1}$  (PEREIRA et al. 2018).

Sabe-se que a rede cristalina de  $\text{ZnWO}_4$  é formada por sub-redes, os octaedros de  $[\text{ZnO}_6]$  e  $[\text{WO}_6]$ , os quais devido aos comprimentos de ligação diferentes Zn-O e W-O,

apresentam-se como octaedros distorcidos (SCHOFIELD; KNIGHT; CRESSEY, 1996). Nesse trabalho, através das técnicas de espectroscopias vibracionais Raman e FT-IR foi possível identificar a presença dessas sub-redes octaédricas, confirmando, portanto, a obtenção de  $\text{ZnWO}_4$  através do método hidrotermal assistido por micro-ondas.

### 1.5.5. FOTOLUMINESCÊNCIA

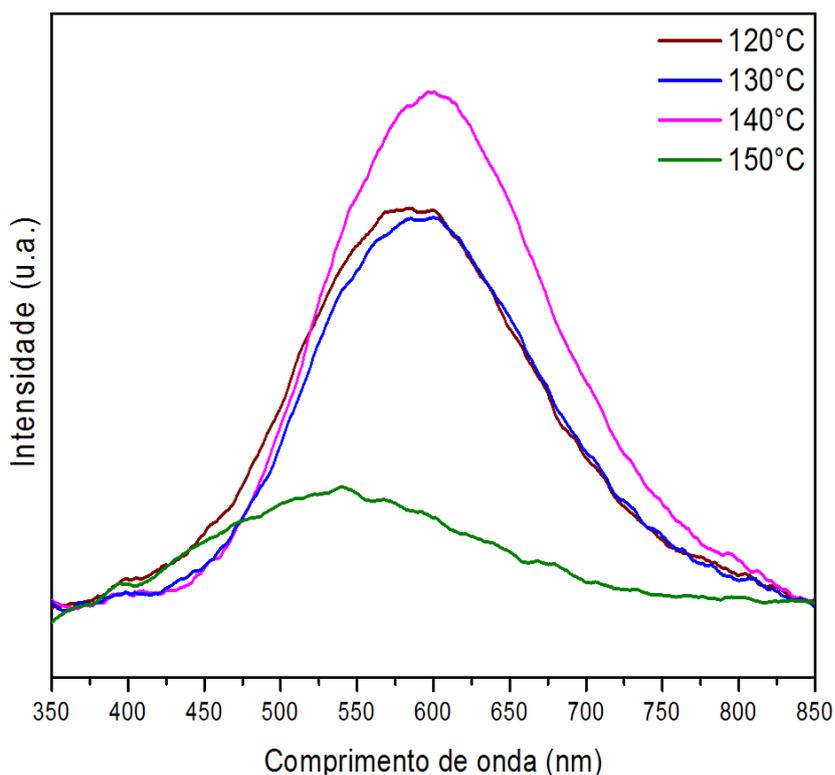
No século passado, a partir dos trabalhos pioneiros de Kröger sobre a fotoluminescência de tungstatos e molibdatos (KRÖGER, 1947a, 1947b; KRÖGER; URBACH, 1948), várias pesquisas foram desenvolvidas no intuito de explorar, compreender e aperfeiçoar as propriedades luminescentes de óxidos mistos tais como tungstatos, molibdatos, titanatos, dentre outros, devido ao interesse crescente da comunidade científica e da indústria pelo desenvolvimento de semicondutores com propriedades ópticas cada vez mais eficazes, robustos e seguros para aplicações em diagnóstico de imagem, como detectores de cintilação, por exemplo, (OI; TAKAGI; FUKAZAWA, 1980; BORN; ROBERTSON; SMITH, 1981) ou em dispositivos óptico-eletrônicos, tais como lasers e componente de fibra óptica (KRÖGER, 1956; LONGO et al. 2007; ORHAN et al. 2005a).

A espectroscopia de fotoluminescência é uma técnica que possibilita a realização de estudos qualitativos sobre a estrutura eletrônica dos materiais, além disso essa técnica permite inferir sobre o estado de ordem e desordem estrutural de sólidos, visto que o perfil de emissão dos materiais é sensível à sua cristalinidade (ORHAN et al. 2005b; SOUZA et al. 2010). Nesse ínterim, nesse trabalho objetivou-se verificar as propriedades ópticas das NPs de  $\text{ZnWO}_4$  obtidas através do método HAM a temperaturas menores ou iguais a  $150^\circ\text{C}$ .

A Figura 11 ilustra os espectros de emissão fotoluminescente obtidos entre 350 e 850nm, para as amostras de  $\text{ZnWO}_4$  sintetizadas a  $120^\circ\text{C}$ ,  $130^\circ\text{C}$ ,  $140^\circ\text{C}$  e  $150^\circ\text{C}$ , excitadas por um laser de criptônio, a 325nm. Pode-se observar que as amostras obtidas a 120, 130 e  $140^\circ\text{C}$  apresentam uma ampla faixa de emissão, cobrindo todo o espectro visível, com emissões máximas em 578nm (amarelo), 585nm (amarelo) e 593nm (laranja), respectivamente (Tabela 6). A amostra obtida a  $150^\circ\text{C}$  apresentou redução expressiva da intensidade de emissão nos comprimentos de onda estudados, comparada às amostras obtidas a 120, 130 e  $140^\circ\text{C}$  (Fig. 11). A amostra obtida a  $140^\circ\text{C}$ , que se caracteriza por não ser amorfa e por não ser a mais cristalina desse trabalho, apresentou a maior intensidade de emissão nos comprimentos de onda estudados, conforme anteriormente observado para outros óxidos mistos, tais como titanato de cálcio e cobre (MOURA et al. 2013) e tungstatos (ANICETE-

SANTOS et al. 2011; CAMPOS et al. 2007; LONGO et al. 2007; ORHAN et al. 2005a; 2005b).

**Figura 11** – Espectros de fotoluminescência de nanopartículas de  $ZnWO_4$  obtidas em diferentes temperaturas de síntese através do método HAM.



As amostras foram excitadas por um laser de criptônio, a 325nm. Fonte: Próprio autor.

Nesse trabalho as amostras sintetizadas a 120, 130 e 140°C apresentaram perfil de emissão fotoluminescente típico de um processo multifonon, caracterizado pela banda larga de emissão (Fig. 11). Dados da literatura sugerem que esse processo deve-se à participação de diversos elétrons em diferentes níveis energéticos durante os estágios de excitação e emissão de fótons (CAVALCANTE et al. 2012; LONGO, E. et al. 2014; ORHAN et al. 2005b). Nesse contexto, as amostras de  $ZnWO_4$  sintetizadas neste trabalho a 120, 130 e 140°C, não apresentaram completa cristalinidade, conforme os resultados dos ensaios de espectroscopias DRX (Fig. 7) e Raman (Fig. 8), e, conseqüentemente, a presença de defeitos ou imperfeições pode ter ocasionado o fenômeno de emissão com perfil de banda larga no espectro visível (Fig. 11).

Devido à ocorrência de emissão com perfil de processo multifonon, realizou-se a deconvolução das bandas largas de emissão das amostras obtidas a 120, 130 e 140°C e pode-

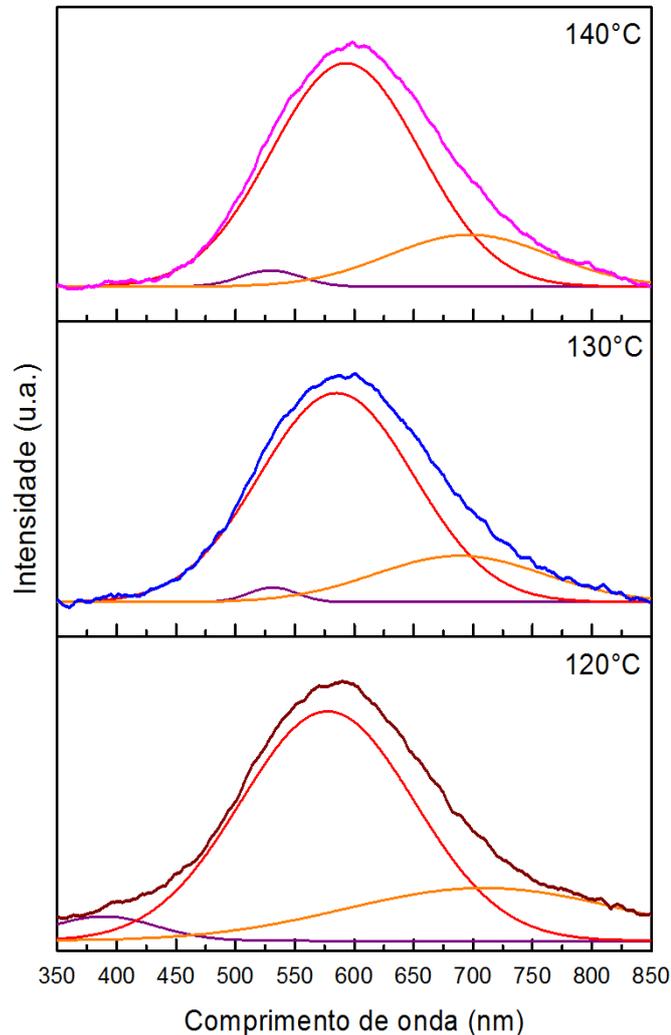
se observar que elas apresentam três componentes, conforme descrito na Figura 12 e na Tabela 6. Observou-se que a amostra obtida a 120°C, apresentou a sua primeira componente (em roxo) em 387nm (Fig. 12), região ultravioleta do espectro, porém essa componente para as outras amostras apresentou-se a 529 e 528nm (verde) para as amostras obtidas a 130 e 140C, respectivamente (Fig. 12). A segunda componente (em vermelho) da banda de emissão das amostras foi observada a 578nm (amarelo), 585nm (amarelo) e 593nm (laranja) para as amostras de ZnWO<sub>4</sub> obtidas a 120, 130 e 140°C, respectivamente (Fig. 12). E a terceira componente (em laranja) da banda larga de emissão para todas as amostras foi observada em comprimentos de onda referentes ao vermelho no espectro visível, conforme descrito na Tabela 6.

**Tabela 6** – Valores máximos de emissão fotoluminescente para amostras de ZnWO<sub>4</sub> obtidas através do método HAM.

Temperatura de síntese (°C)	Tamanho (nm)	Emissão máxima (nm)		
		C1	C2	C3
120	3,670	387 (roxo)	578 (amarelo)	720 (vermelho)
130	4,680	529 (verde)	585 (amarelo)	700 (vermelho)
140	13,25	528 (verde)	593 (amarelo)	701 (vermelho)

C1: componente 1; C2: componente 2; C3: componente 3 da emissão fotoluminescente. Fonte: Próprio autor.

**Figura 12** – Espectros de fotoluminescência de  $\text{ZnWO}_4$  obtidos a 120, 130 e 140°C através do método HAM.



Componentes da emissão fotoluminescente: C1: roxo; C2: vermelho; C3: laranja. Fonte: Próprio autor.

O estado sólido da matéria configura-se pelo máximo estágio de organização dos átomos, contudo nem todos os sólidos apresentam essa configuração de completa ordem estrutural, de maneira que os sólidos podem ser classificados de acordo com o nível de organização atômica, em sólidos cristalinos ou ordenados, que apresentam elevado estado de organização estrutural, em contrapartida, tem-se os sólidos amorfos, caracterizados pela ausência de organização estrutural a nível atômico e entre os dois estados tem-se os sólidos semicristalinos, os quais apresentam equilíbrio entre ordem e desordem estrutural (CALLISTER, 2010). Diversos trabalhos na literatura demonstram o fenômeno de fotoluminescência para sólidos amorfos (LEITE et al. 2000; LONGO et al. 2007),

semicristalinos (ANICETE-SANTOS et al. 2011; CAMPOS et al. 2007; CANHAM, 1990; ORHAN et al. 2005b) e cristalinos (PEREIRA et al. 2018; WEN et al. 2002), por mecanismos distintos.

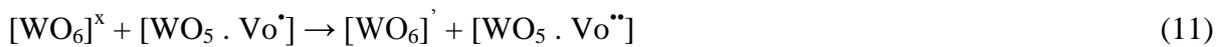
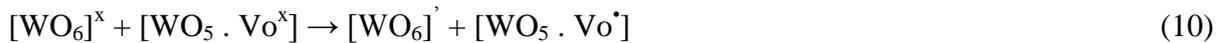
Dados da literatura revelam que  $ZnWO_4$  em seu estado cristalino, assim como outros tungstatos, quando excitado por radiação ultravioleta ( $400\text{nm} < \lambda > 200\text{nm}$ ) apresenta um perfil de emissão com banda tipicamente larga na região azul-verde, devido à emissão intrínseca do tungstato (DAI et al. 2014; EDE et al. 2015; PEREIRA et al. 2018; ZHAI et al. 2016), contudo no presente trabalho observou-se através do ensaio de espectroscopia de fotoluminescência a ocorrência de uma banda larga de emissão na região amarelo-vermelho do espectro visível (Fig. 11). A emissão na região azul-verde está relacionada a defeitos superficiais na banda proibida e a uma estrutura mais cristalina, enquanto a emissão na região amarelo-vermelho correlaciona-se a defeitos profundos e a uma estrutura mais desordenada (LONGO et al. 2008).

Sabe-se que a rede cristalina de  $ZnWO_4$  é formada por sub-redes, os octaedros de  $ZnO_6$  e  $WO_6$ , os quais, devido aos comprimentos de ligação diferentes de Zn-O comparado a W-O, apresentam-se como octaedros distorcidos (SCHOFIELD; KNIGHT; CRESSEY, 1996). Os defeitos estruturais podem ocasionar distorções na forma dessas sub-redes, como consequência dos defeitos tem-se a formação de regiões com altas e baixas densidades eletrônicas.

Vacâncias de oxigênio são defeitos comumente observados em óxidos mistos não dopados com outros metais (LEITE et al. 2000; ORHAN 2005b; PONTES et al. 2003). O tungstênio, átomo formador de rede, liga-se aos átomos de oxigênio originando as sub-redes  $WO_6$ , quando há fornecimento de energia suficiente para que haja superação da energia de ativação necessária para que se formem os núcleos dessa rede cristalina, todavia, antes da formação dos núcleos estáveis  $WO_6$  que originam a estrutura monoclinica de  $ZnWO_4$ , podem formar-se núcleos  $WO_5$ , ou seja, antes da completa cristalização de tungstato de zinco em sua estrutura monoclinica, as espécies  $WO_6$  e  $WO_5$  podem coexistir, intercalados com  $ZnO_6$ , essa formação estrutural com redução do número de oxigênios nas sub-redes contendo o tungstênio como átomo central é um tipo de imperfeição da estrutura cristalina denominada vacância de oxigênio (LEITE et al. 2000; PONTES et al. 2003).

Uma possível explicação para a emissão nas regiões correspondentes ao amarelo e ao vermelho do espectro visível observada para as amostras sintetizadas nesse trabalho, a 120, 130 e 140°C (Fig. 11), consiste na formação de defeitos profundos na zona proibida devido às distorções na rede cristalina causadas pela formação de vacâncias de oxigênio. Em

contrapartida, a amostra obtida a 150°C, que apresentou elevada cristalinidade, provavelmente não apresentou luminescência significativa, devido a existência apenas de espécies  $WO_6$  e ausência de vacâncias de oxigênio. Para o  $ZnWO_4$ , as imperfeições na rede cristalina podem estar relacionadas a coexistência de espécies  $[WO_6]$  e  $[WO_5]$ , o que configura possível aparecimento de vacâncias de oxigênio, as quais podem existir em três estágios de carga em tungstatos e são capazes de formar espécies complexas com  $[WO_5]$ , conforme as equações descritas a seguir, de acordo com a notação de Kröger e Vink (1958):



As equações acima representam os três possíveis estados de carga, devido a formação de vacâncias de oxigênio, para os tungstatos. A primeira parte da Equação 10 representa o estado neutro, com dois elétrons emparelhados  $[WO_6]^x + [WO_5 \cdot Vo^x]$ . A formação de vacâncias de oxigênio caracteriza-se pela presença de espécies complexas  $[WO_5 \cdot Vo^x]$ , onde  $Vo^x$  representa as vacâncias de oxigênio com seus dois elétrons emparelhados, essas espécies substituem as espécies octaédricas  $[WO_6]$  esperadas para  $ZnWO_4$  em sua estrutura monoclinica, com grupos espaciais P2/c, e causam distorções ou micro deformações na rede cristalina, as quais puderam ser observadas através do alargamento e deslocamento dos picos e bandas dos difratogramas de raios X (Fig. 7) e espectros Raman (Fig. 8), respectivamente, de amostras de tungstato de zinco obtidas a 120, 130 e 140°C.

As espécies complexas contendo vacâncias de oxigênio,  $[WO_5 \cdot Vo^x]$ , podem perder elétrons para os octaedros  $[WO_6]$  resultando nas espécies complexas monoionizadas  $[WO_5 \cdot Vo']$ , o segundo estado de carga para tungstato, conforme descrito na Equação 11, onde  $Vo'$  representa um elétron desemparelhado na vacância de oxigênio. Essa espécie pode perder mais um elétron para o octaedro  $[WO_6]$ , resultando em vacância de oxigênio com dois elétrons desemparelhados  $[WO_5 \cdot Vo'']$ , o terceiro estado de carga para tungstatos, duplamente ionizado (com duas cargas positivas) em relação ao retículo, conforme descrito na Equação 11.

Estas espécies complexas podem resultar na formação de estados eletrônicos rasos e profundos dentro da banda proibida e uma distribuição de cargas não homogênea, responsável

pela recombinação radiativa. Nesse ínterim, corroborando com os resultados do ensaio de DRX (Fig. 7), sugere-se que o aumento da temperatura de síntese de  $\text{ZnWO}_4$  reduz a desordem estrutural e, para os sólidos obtidos a temperaturas menores que  $150^\circ\text{C}$ , a presença de vacâncias de oxigênio favorece a captura de elétrons originando as espécies  $[\text{WO}_5 \cdot \text{Vo}^x]$  e  $[\text{WO}_5 \cdot \text{Vo}^*]$ .

Adicionalmente, sugere-se que a presença de espécies complexas de  $[\text{WO}_5 \cdot \text{Vo}^x]$ ,  $[\text{WO}_5 \cdot \text{Vo}^*]$  e  $[\text{WO}_5 \cdot \text{Vo}^{**}]$  provoca distorções na rede cristalina de  $\text{ZnWO}_4$  e possibilita a formação de novos níveis energéticos dentro do “*band gap*”. Provavelmente, as amostras desordenadas de tungstato de zinco obtidas a  $120$ ,  $130$  e  $140^\circ\text{C}$  apresentaram maior quantidade dessas espécies, quando comparados à amostra obtida a  $150^\circ\text{C}$ , o que leva à produção de buracos profundos dentro do “*band gap*”, os quais são responsáveis pelo perfil de banda larga de emissão fotoluminescente na região amarelo-vermelho (Fig. 11) observado para as amostras desordenadas obtidas nesse trabalho.

A literatura relata que há mecanismos distintos envolvidos na fotoluminescência de tungstatos, a primeira teoria proposta para sólidos semicondutores em seu estado cristalino, atribui a fotoluminescência às transições eletrônicas intrínsecas nas espécies  $[\text{WO}_6]$ , referente ao decaimento radioativo de elétrons de orbitais  $5d$  do tungstênio, localizados acima da banda de condução, para orbitais  $2p$  do oxigênio, localizados abaixo da banda de valência (CHEN S-J. et al. 2003; DAI et al. 2014; PEREIRA et al. 2018), enquanto a segunda sugere que para óxidos mistos desordenados ou semicristalinos, a fotoluminescência deve-se às transições eletrônicas que ocorrem em novos níveis de energia localizados dentro do “*band gap*”, devido a defeitos estruturais, dentre os quais, vacâncias de oxigênio (LEITE et al. 2000; LONGO et al. 2008; MAZZO, 2011; ORHAN et al. 2005a; 2005b), contudo as discussões acerca desse assunto ainda são controversas.

De maneira interessante, alguns trabalhos descrevem o aparecimento de níveis de energia rasos e profundos na zona proibida (“*band gap*”) para sólidos em seu estado semicristalino ou desordenado, níveis os quais não são observados para o mesmo sólido em seu estado cristalino. Esses novos níveis de energia são atribuídos à presença de vacâncias complexas de oxigênio (KRÖGER; VINK, 1958; LONGO et al. 2008; MAZZO, 2011; ORHAN et al. 2005a; 2005b).

Praticamente todos os tungstatos metálicos exibem o fenômeno de fotoluminescência após excitação em comprimentos de onda específicos, de forma que essa propriedade pode ser atribuída aos grupos tungstatos (KROGER, 1947a; 1947b; LONGO et al. 2007), contudo alterações da composição ou da estrutura cristalina também podem afetar essa propriedade.

Alguns trabalhos descrevem o surgimento de bandas largas de emissão na região amarela do espectro eletromagnético para tungstatos metálicos quando eles formam soluções sólidas com outras espécies (KROGER 1947a; 1947b).

Kroger (1947a) avaliou o efeito da composição de soluções sólidas com diferentes percentuais de tungstato e molibdato de magnésio e zinco. A incorporação de quantidades crescentes do ânion molibdato, formando solução sólida com tungstato de zinco, provocou mudanças nos comprimentos de onda máximos de emissão. Kroger (1947a) observou que a incorporação de percentuais menores que 10% de molibdato não eliminam a banda de emissão azul-verde característica de tungstato de zinco, enquanto a introdução de 10 a 25% de molibdato no composto resultou em surgimento de máximos de emissão em regiões do espectro laranja-vermelho, sendo que a partir de 75% de molibdato incorporado na solução observa-se a mudança da banda de emissão do tungstato para comprimentos de onda na região amarela do espectro, região onde ocorre a emissão máxima do molibdato de zinco puro. Naquele momento, os experimentos de Kroger lançaram a hipótese sobre a influência de defeitos nas propriedades ópticas de tungstatos e molibdatos, através da observação experimental da influência da composição e da estrutura cristalina nas propriedades de misturas de tungstato e molibdatos (KROGER, 1947a; 1947b; 1947c).

A partir dos primeiros estudos sobre as propriedades fotoluminescentes de sólidos desordenados (CANHAM, 1990), iniciaram-se tantas outras pesquisas visando avaliar e conhecer de maneira pormenorizada a influência da estrutura nas propriedades fotoluminescentes de sólidos. As propriedades fotoluminescentes de alguns óxidos mistos desordenados, tais como titanatos, molibdatos e tungstatos, são objeto de estudo desde o século passado (CAMPOS et al. 2007; LONGO et al. 2007; MOURA et al. 2013; ORHAN et al. 2005a; 2005b). Orhan e cols. (2005b), ao estudar as propriedades fotoluminescentes de  $\text{CaWO}_4$  desordenado, também observaram emissão em comprimentos de onda correspondentes ao amarelo para os sólidos desordenados. Eles demonstraram que a intensidade da fotoluminescência depende da estrutura cristalina do material, de maneira que em seu trabalho a maior intensidade de fotoluminescência foi observada para a amostra semicristalina, ou seja, amostra que não se apresentou completamente cristalina ou completamente amorfa (ORHAN et al. 2005b), assim como Anicete-Santos e cols. (2011) observaram para amostras de  $\text{BaWO}_4$  e Moura e cols. (2013) observaram para titanato de cobre a cálcio (ANICETE-SANTOS et al. 2011; MOURA et al. 2013).

Zhai e cols. (2016) demonstraram a influência da dopagem com os cátions  $\text{Eu}^{3+}$  e  $\text{Dy}^{3+}$  nas propriedades luminescentes de  $\text{ZnWO}_4$ . Em seu trabalho, eles observaram que todas as

amostras apresentaram ordenamento estrutural a longo alcance, por meio do ensaio de DRX, observaram também que os espectros de emissão de todas as amostras possuem o perfil de banda de emissão larga na região azul-verde do espectro visível, característico de tungstato de zinco cristalino, contudo, demonstraram que a dupla dopagem com esses cátions, ao substituírem estequiometricamente o zinco na rede cristalina, resultou, também, em bandas de emissão em comprimentos de onda correspondentes ao amarelo e ao vermelho, o que realça a influência de imperfeições nas propriedades fotoluminescentes de sólidos (ZHAI et al. 2016).

Zhai e cols. (2016) verificaram que o aumento do percentual de  $Dy^{3+}$  na estrutura de  $ZnWO_4$  ocasiona a redução da intensidade da banda larga de emissão azul-verde e aumenta a intensidade da banda de emissão na região amarela, próximo a 580nm. O aparecimento de novas bandas de emissão (amarelo e vermelho) foi atribuído a processos de transferência de energia dos ânions  $[WO_4^{2-}]$  excitados para os cátions ( $Eu^{3+}$  e  $Dy^{3+}$ ), de maneira que uma parte da energia do fóton foi transferida para os cátions  $Eu^{3+}$  e outra para os cátions  $Dy^{3+}$  (ZHAI et al. 2016).

Chen e cols. (2017) também observaram que a introdução de defeitos na estrutura cristalina de  $ZnWO_4$ , através de dopagem com  $Eu^{3+}$  proporciona o aumento da emissão fotoluminescente na região laranja-vermelho do espectro visível, os autores atribuíram a emissão à processos de transferência de energia mediados pelas vacâncias de zinco resultantes da dopagem (CHEN et al. 2017).

Recentemente, Pereira e cols. (2018) sintetizaram nanopartículas de  $ZnWO_4$  através do método HAM, em condições de síntese semelhantes às utilizadas neste trabalho. Eles obtiveram  $ZnWO_4$  em seu estado cristalino após realizarem a síntese a 140, 150 e 160°C, durante 1h. Embora os sólidos sintetizados apresentaram-se cristalinos, conforme demonstrado por meio dos ensaios de DRX, Raman e microscopia eletrônica de transmissão, eles apresentaram o perfil de emissão característico de  $ZnWO_4$ , ou seja, uma banda de emissão larga abrangendo todo o espectro visível, com máximo de emissão para todas as amostras próximo a 515nm.

De acordo com Campos e cols. (2007) a emissão luminescente em sólidos ordenados (cristalinos) e desordenados ocorre por mecanismos distintos. As emissões de sólidos desordenados podem estar relacionadas à presença de vacâncias de oxigênio, enquanto a emissão em sólidos ordenados, como observado por Pereira e cols. (2018), deve-se a distorções nos octaedros  $WO_6$  da rede cristalina.

De maneira geral, dados da literatura, disponíveis até o momento, demonstram que nanopartículas cristalinas de  $ZnWO_4$ , obtidas através de síntese hidrotermal, com várias

morfologias, apresentam perfil de emissão fotoluminescente na região azul-verde do espectro visível, com característica de um processo multifonon envolvendo transições de elétrons localizados abaixo da banda de valência. Poucos trabalhos exploraram a emissão fotoluminescente de NPs de  $\text{ZnWO}_4$  obtidas através do método hidrotermal assistido por micro-ondas, conforme descrito na Tabela 7.

**Tabela 7** – Valores máximos de emissão fotoluminescente para amostras de sólidos cristalinos de  $\text{ZnWO}_4$  obtidas através de diferentes métodos de síntese.

<b>Método de síntese</b>	<b>Emissão máxima (nm)/cor</b>	<b>Morfologia</b>	<b>Referência</b>
SHC	470 (azul)	Poliedros (cubo e prisma hexagonal)	WEN et al. (2002)
SHC	460 (azul)	Nanobastões	CHEN, S-J. et al. (2003)
SHC	465 (azul), 510 (verde)	Nanofolhas	HE et al. (2016)
	465 (azul), 520 (verde)	Nanobastões	
HAM	515 (verde)	Indefinida e nanobastões	PEREIRA et al. (2018)

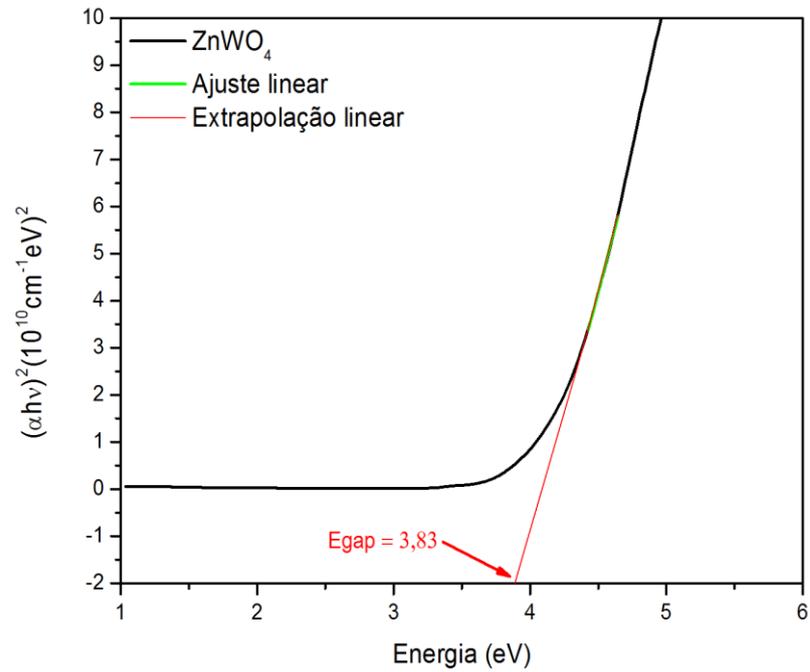
SHC: síntese hidrotermal convencional; HAM: síntese hidrotermal assistida por micro-ondas. Fonte: Próprio autor.

Com os resultados obtidos nesse trabalho pode-se inferir que a fotoluminescência de  $\text{ZnWO}_4$ , está intimamente relacionada com a sua estrutura cristalina, visto que as amostras obtidas a 120, 130 e 140°C, cujas análises espectroscópicas através dos ensaios de DRX (Fig. 7) e Raman (Fig. 8) revelaram seu estado de ordem-desordem estrutural, apresentaram um perfil diferente de emissão fotoluminescente daqueles anteriormente relatados na literatura (Tabela 7), ou seja, demonstrou-se pela primeira vez a emissão fotoluminescente de NPs de  $\text{ZnWO}_4$  desordenado na região amarela-vermelha do espectro visível (Fig. 11). Por outro lado, de maneira interessante, a amostra obtida a 150°C, que se apresentou mais cristalina do que as outras obtidas nesse trabalho, não apresentou emissão fotoluminescente (Fig. 11), assim como observado por outros autores.

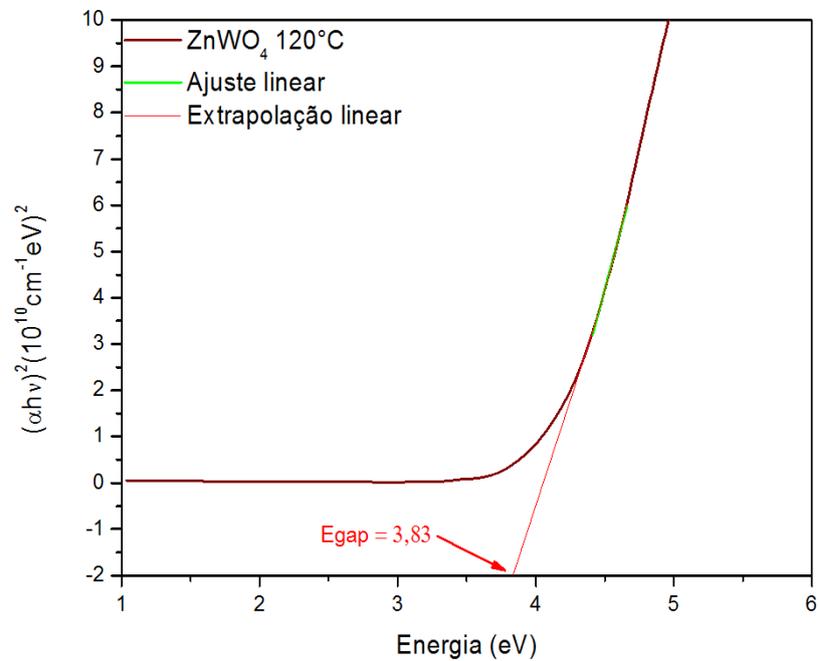
### 1.5.6. ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA –VISÍVEL

A emissão fotoluminescente de sólidos desordenados correlaciona-se com a presença de estados energéticos localizados dentro da banda proibida de energia (“band gap”), que pode ser definida como a região localizada entre a banda de valência e a banda de condução das substâncias. Esses estados energéticos localizados exibem um perfil de absorção regido por uma lei exponencial, de maneira que o aumento da desordem estrutural do sólido estudado configura uma curva exponencial com menor inclinação ( $< 90^\circ$ ), esse padrão de absorção óptica, por sua vez, pode ser mensurado através da técnica de espectroscopia óptica, conforme proposto por Wood e Tauc (1972). Nesse contexto, nesse trabalho a técnica de espectroscopia de absorção óptica na região ultravioleta-visível do espectro eletromagnético foi utilizada com o objetivo de estimar-se a estrutura eletrônica dos sólidos sintetizados e comparar os seus valores de “*band gap*”.

As Figuras 13-17 representam a absorção óptica de nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  obtidas em diferentes temperaturas através do método hidrotermal assistido por micro-ondas. Pode-se observar que todas as amostras apresentaram curvas de absorção exponencial muito semelhantes, características de materiais semicondutores (WOOD; TAUC, 1972). Os valores de “*band gap*” óptico também foram muito semelhantes para todas as amostras, contudo a amostra com maior cristalinidade, obtida a  $150^\circ\text{C}$  (Fig. 17), apresentou o maior valor (3,86eV) comparado àqueles das outras amostras.

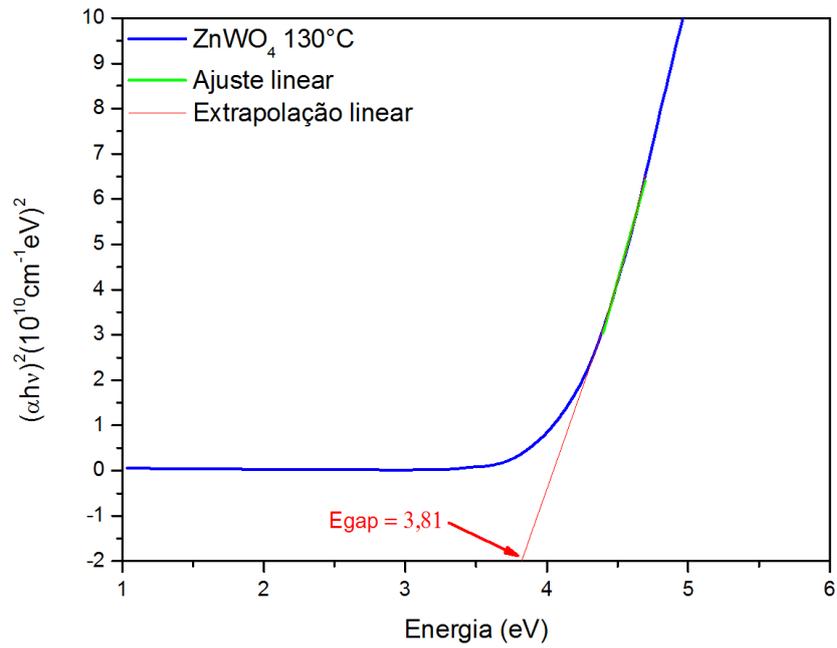
**Figura 13** – Espectro de UV-Vis de  $\text{ZnWO}_4$  sintetizado através de reação de co-precipitação.

Fonte: Próprio autor.

**Figura 14** – Espectro de UV-Vis de  $\text{ZnWO}_4$  sintetizado a  $120^\circ\text{C}$  através do método HAM.

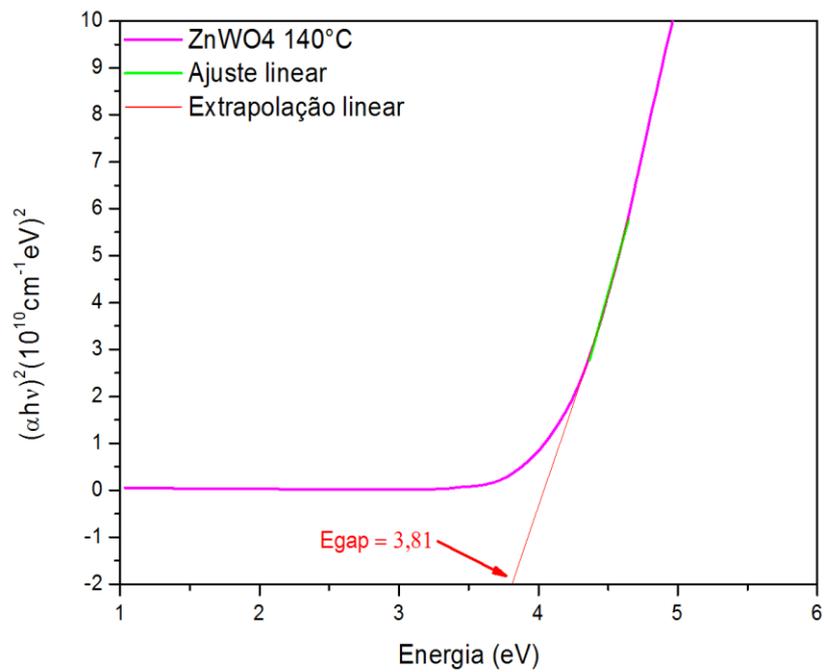
Fonte: Próprio autor.

**Figura 15** – Espectro de UV-Vis de ZnWO<sub>4</sub> sintetizado a 130°C através do método HAM.



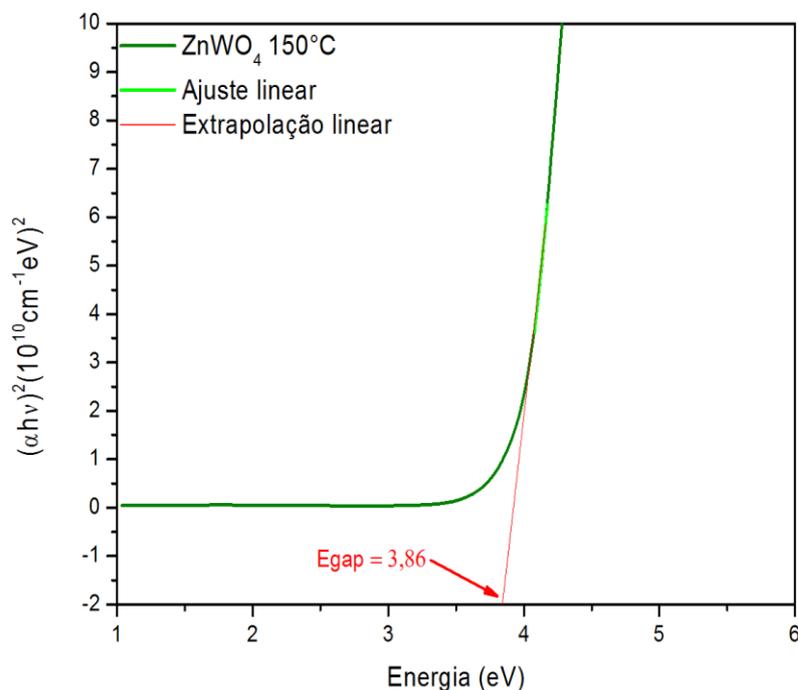
Fonte: Próprio autor.

**Figura 16** – Espectro de UV-Vis de ZnWO<sub>4</sub> sintetizado a 140°C através do método HAM.



Fonte: Próprio autor.

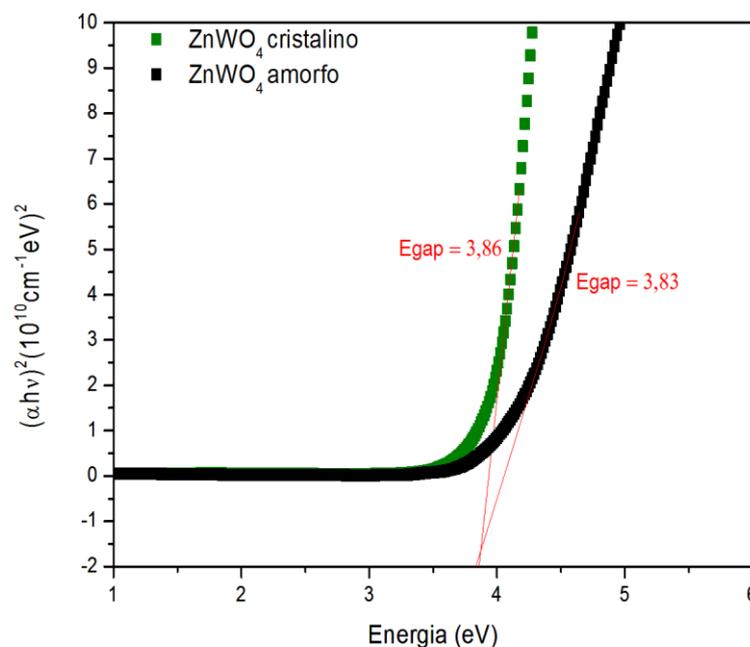
**Figura 17** – Espectro de UV-Vis de ZnWO<sub>4</sub> sintetizado a 150°C através do método HAM.



Fonte: Próprio autor.

Embora todas as curvas de absorção óptica obtidas para as amostras de ZnWO<sub>4</sub> apresentaram perfil semelhante (Fig. 13-17), é possível observar a tendência de aumento do ângulo de inclinação da exponencial concomitantemente ao aumento da ordem estrutural das amostras, cuja evolução acompanha o aumento da temperatura de síntese, de acordo com os dados do ensaio de DRX (Fig. 7). A Figura 18 representa a comparação entre a absorção da amostra de ZnWO<sub>4</sub> obtida após a reação de co-precipitação, com estrutura amorfa (Fig. 7-a), com aquela da amostra sintetizada a 150°C, amostra mais cristalina obtida nesse trabalho (Fig. 7-e), de acordo com os resultados do ensaio de DRX. Observou-se que a exponencial para ZnWO<sub>4</sub> cristalino apresenta-se quase reta, coerentemente com a proposta de Wood e Tauc (1972) e com a observação de Orhan e cols. (2005b) para a absorção óptica de CaWO<sub>4</sub> cristalino (ORHAN et al. 2005b; WOOD; TAUC, 1972).

**Figura 18** – Espectros de absorção UV-Vis de nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub> amorfo e cristalino.



ZnWO<sub>4</sub> amorfo, sintetizado através de reação de co-precipitação; ZnWO<sub>4</sub> cristalino, obtido através de síntese HAM, a 150°C, corresponde à amostra mais cristalina. A cristalinidade das amostras foi confirmada através dos ensaios de DRX. Fonte: Próprio autor.

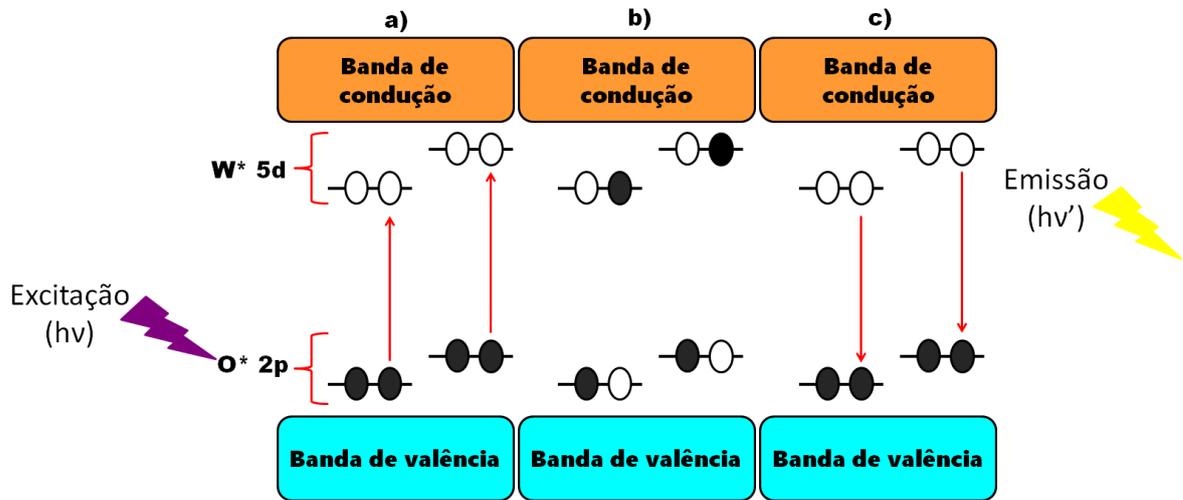
A curva de absorção óptica da amostra de ZnWO<sub>4</sub> mais cristalina, obtida nesse trabalho a 150°C, apresentou comportamento típico de semicondutores cristalinos, enquanto a curva para as demais amostras apresentou uma inclinação mais suave com uma cauda a baixas energias (Fig. 18), esse perfil sugere a existência de estados energéticos localizados dentro da banda proibida, os quais, por sua vez, correlacionam-se à presença de defeitos nos sólidos estudados (MOURA et al. 2013; ORHAN et al. 2005b; WOOD; TAUC, 1972).

De acordo com Wood e Tauc (1972), a redução dos valores de “band gap” está associada à presença de estados localizados dentro da banda proibida devido a defeitos estruturais das amostras, esse comportamento, por sua vez, reflete-se na emissão fotoluminescente das amostras. Nesse trabalho, a amostra de ZnWO<sub>4</sub> mais cristalina (obtida a 150°C), praticamente não apresentou emissão no espectro visível (Fig. 11), enquanto as amostras obtidas a 120, 130 e 140°C apresentaram banda larga de emissão na região amarelo-vermelho do espectro (Fig. 11), provavelmente devido à presença de estados energéticos localizados entre a banda de condução e a banda de valência. O perfil de absorção óptica exponencial com inclinação suave para as amostras semicristalinas juntamente com os valores de “band gap” sugerem que as propriedades ópticas dos semicondutores dependem do grau de ordem e desordem dos sólidos em estudo.

Orhan e cols. (2005a; 2005b) observaram a redução dos valores de “*band gap*” óptico para amostras de tungstato desordenados. Em seu trabalho voltado para o estudo das propriedades ópticas de  $\text{CaWO}_4$  desordenado, atribuíram a emissão fotoluminescente na região amarela do espectro visível, região de maior energia, ao decaimento radioativo de elétrons localizados no subnível 5d do tungstênio\*, localizado dentro do “*band gap*”, para o subnível 2p do oxigênio, localizado abaixo da banda de valência. Por outro lado, atribuíram a emissão em vermelho (menor energia) ao decaimento radioativo de elétrons dentro da banda proibida, ou seja, à transição de elétrons excitados localizados em  $\text{W}^*$  (5d) para  $\text{O}^*$  (2p) (ORHAN et al. 2005b). A presença de novos estados energéticos, entre a banda de valência e a banda de emissão, possibilita a ocorrência de processo multifonon de emissão fotoluminescente, conforme observado para as amostras semicristalinas obtidas nesse trabalho a 120, 130 e 140°C (Fig. 11).

Materiais com defeitos estruturais apresentam estados energéticos intermediários dentro da banda proibida de energia denominados buracos rasos ou profundos. Os buracos profundos situam-se próximos da banda de valência e são responsáveis pela fotoluminescência em regiões do espectro eletromagnético visível de menor energia, correspondente às cores verde, amarela e vermelha, já os buracos rasos, situados próximos à banda de condução, correspondem às emissões referentes às cores violeta e azul, regiões mais energéticas (LONGO et al. 2008; ORHAN et al. 2005a). Nesse trabalho, as amostras de  $\text{ZnWO}_4$  apresentaram emissão máxima em comprimentos de onda correspondentes a cor amarela, provavelmente devido a transições de elétrons situados próximos a banda de valência, ou seja, os materiais obtidos a 120, 130 e 140°C apresentam defeitos profundos. Diante do exposto, a Figura 19 ilustra uma proposta de mecanismo simples para o fenômeno de emissão fotoluminescente de  $\text{ZnWO}_4$  desordenado.

**Figura 19** – Representação esquemática das transições eletrônicas de nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  semicristalino.



a) Processo de excitação de elétrons do subnível 2p do oxigênio ( $\text{O}^*$ ) localizados acima da banda de valência; b) transição eletrônica de elétrons  $\text{O}^*$  (2p) para o subnível 5d do tungstênio ( $\text{W}^*$ ), localizados abaixo da banda de condução; c) fenômeno de emissão de fótons pelo decaimento radioativo de elétrons  $\text{W}^*$  (5d) para  $\text{O}^*$  (2p), localizados dentro da banda proibida. Fonte: Próprio autor.

Dessa maneira, sugere-se que a emissão fotoluminescente na região amarelo-vermelho do espectro visível de nanopartículas de tungstato de zinco desordenados, obtidas nesse trabalho a 120, 130 e 140°C, deve-se à presença de estados energéticos localizados dentro do “*band gap*”, os quais resultaram em menores valores de energia necessária para o acontecimento dos processos de emissão de fótons pelo decaimento radioativo, como consequência de aprisionamento de elétrons nas vacâncias de oxigênio.

### 1.5.7. POTENCIAL ZETA, ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO E TAMANHO HIDRODINÂMICO

As propriedades da superfície de nanopartículas são governadas, dentre outros fatores, pela sua carga superficial. Tais propriedades modulam a reatividade química de nanopartículas e definem as suas interações com os diferentes componentes biológicos, tais como membrana plasmática, proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA), receptores, células do sistema imune, etc. e, conseqüentemente, constituem fatores determinantes da sua citotoxicidade e do seu perfil de biodistribuição em meio biológico (BERTRAND et al. 2017; CAPELETTI et al. 2014; DUBEY et al. 2015; ERNSTING et al. 2013; LAGO et al. 2011; MAGER; LAPOINT; STEVENS, 2011).

Além disso, a carga superficial (potencial zeta) das NPs pode prever o comportamento das NPs nos fluidos biológicos, dado que a presença de cargas elétricas minimiza os fenômenos de aglomeração (CASALS et al. 2003). Dessa forma, a análise do potencial zeta é de fundamental importância para a realização de estudos pré-clínicos de nanomateriais candidatos a aplicações em química medicinal.

Nesse trabalho, a análise do potencial zeta das amostras de  $ZnWO_4$ , obtidas a  $120^\circ C$ , revela que elas possuem um potencial zeta médio negativo no valor de  $-17,5mV$ , conforme descrito na Tabela 8.

**Tabela 8** - Potencial zeta para amostras de  $ZnWO_4$  obtidas através do método HAM a  $120^\circ C$  durante 60 minutos.

<b>Amostra</b>	<b>Potencial zeta (mV)</b>
<b>1</b>	-12,50
<b>2</b>	-22,50
<b>Média</b>	-17,50
<b>Desvio padrão da média</b>	7,071

Fonte: Próprio autor.

O potencial zeta negativo apresentado pelas NPs de  $ZnWO_4$  pode ser atribuído à presença de ânions  $WO_4^{2-}$  devido ao equilíbrio de dissociação dessas NPs em água. Valores negativos para o potencial zeta sugerem estabilidade para esse material em sistemas biológicos, contudo estudos mais detalhados a respeito do pontecial zeta de NPs de  $ZnWO_4$  em fluidos biológicos devem ser conduzidos. Por outro lado, como, o potencial zeta modula

as interações entre as NPs e as células (CAPELETTI et al. 2014) e a maioria das células, incluindo as células cancerígenas, possuem um potencial zeta negativo, isto representaria uma barreira à interação e conseqüentemente à internalização de nanopartículas por células com uma superfície carregada negativamente (PATRA; TURNER, 2014).

Embora a superfície da maioria das células apresentem potencial zeta negativo, dados da literatura revelam que NPs de metais e de óxidos com potencial zeta negativo utilizadas em estudos pré-clínicos, *in vitro* e *in vivo*, possuem a capacidade de interagir com células (CAPELETTI et al. 2014; DA PAZ et al. 2012; KUNJACHAN et al. 2015; SOARES et al. 2011). De fato, considerando-se o efeito citotóxico seletivo de nanopartículas em células tumorais, tecidos em intenso processo de multiplicação como o endotélio de vasos sanguíneos em crescimento e microrganismos (ASSIS et al. 2018; FOGGI et al. 2017; LIN et al. 2012; LONGO, V. et al. 2014; ROCA et al. 2015), pode-se sugerir que a seletividade deve-se ao potencial zeta negativo, uma vez que células de tecidos inflamados, como o tecido tumoral, assim como células em processo de crescimento, apresentam mudanças na expressão de macromoléculas na membrana plasmática, que poderiam facilitar a interação com as nanopartículas (ERNSTING et al. 2013; MAGER, LAPOINTE; STEVENS, 2011).

Adicionalmente, NPs com potencial zeta negativo ( $< 10\text{mV}$ ) também são amplamente removidas da circulação pelas células fagocitárias do sistema mononuclear fagocítico ou sistema reticuloendotelial, localizadas principalmente no fígado e no baço, órgãos responsáveis pela depuração de substâncias estranhas ao sistema biológico. A ampla taxa de depuração de NPs com potencial zeta negativo da circulação implica em menor biodisponibilidade e como consequência ocorre a redução da quantidade de NPs que irão atingir o tecido alvo (ERNSTING et al. 2013; LI; HUANG, 2008; MONTEIRO et al. 2018; NAJAFI-HAJIVAR et al. 2016).

De acordo com os resultados descritos na Tabela 9, observou-se que as nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  apresentam um diâmetro hidrodinâmico médio de  $349,98 \pm 10,29\text{nm}$ . Além disso, analisando-se a distribuição do tamanho médio de  $\text{ZnWO}_4$ , observa-se que aproximadamente 86% das partículas obtidas apresentam tamanho hidrodinâmico menor que 300nm, conforme descrito na Tabela 9.

**Tabela 9** – Distribuição do tamanho médio hidrodinâmico de  $ZnWO_4$  obtido através de síntese HAM a  $120^\circ C$  durante 60 minutos.

Tamanho médio (nm)	Distribuição de tamanho de partícula (%)			
	$\leq 200$ nm	$\leq 300$ nm	300 – 500 nm	$\geq 500$ nm
349,98	1,70	42,20	52,30	3,80

Fonte: Próprio autor.

Algumas propriedades são necessárias aos nanomateriais com potencial para aplicação em química medicinal, dentre as quais, o diâmetro médio da partícula em meio aquoso, denominado tamanho hidrodinâmico, que deve ser menor que 500nm para que não haja a ativação da cascata da coagulação e formação de trombos, os quais se causarem a obstrução de um vaso sanguíneo de pequeno calibre em determinados tecidos, com encéfalo e pulmão, podem levar um indivíduo ao óbito (USP, 2016; YU; ZHENG , 2015). Além disso, NPs com tamanho médio menor que 500nm favorecem a sua chegada e retenção no tecido tumoral através do efeito de melhora da permeabilidade e retenção (EPR) (KHAWAR; KIM; KUH, 2015; MAEDA et al. 2000; MATSUMURA; MAEDA, 1986; PEER et al. 2007).

Muitos pesquisadores demonstraram que o diâmetro médio das nanopartículas determina o perfil de biodistribuição, *in vivo*, sendo que nanopartículas maiores que 300nm e menores do que 70nm são rapidamente eliminadas da circulação por células do sistema mononuclear fagocítico (SMF) (GREF et al. 1994). No entanto, algumas estratégias podem ser usadas para diminuir o reconhecimento das nanopartículas pelas células do SMF, aumentando assim a meia-vida de sua circulação no sangue, como a funcionalização com moléculas hidrofílicas na superfície das nanopartículas para reduzir a ligação às proteínas plasmáticas através de bloqueio estérico (ERNSTING et al. 2013; DE BARROS et al. 2015).

O índice de polidispersividade apresentado por  $ZnWO_4$  nesse estudo foi de 0,580, tal resultado sugere que as nanopartículas obtidas não formam um sistema monodisperso em água, uma vez que, idealmente, sistemas monodispersos apresentam índice de polidispersão menor que 0,3 (DE ASSIS et al. 2008; LAMPRECHT et al. 1999; TOBÍO et al. 1998). Todavia, o tamanho hidrodinâmico menor que 500nm apresentado pelas NPs de  $ZnWO_4$  habilita-as para a realização de ensaios, *in vivo*, com segurança.

### 1.5.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA POR EMISSÃO DE CAMPO

As Figuras 20-22 demonstram as micrografias obtidas através de FEG-SEM. Não foi possível identificar uma morfologia definida para as amostras obtidas a 120, 130 e 140°C (Fig. 20 e 21), contudo, a amostra obtida a 150°C apresentou maior regularidade quanto a sua geometria (Fig. 22).

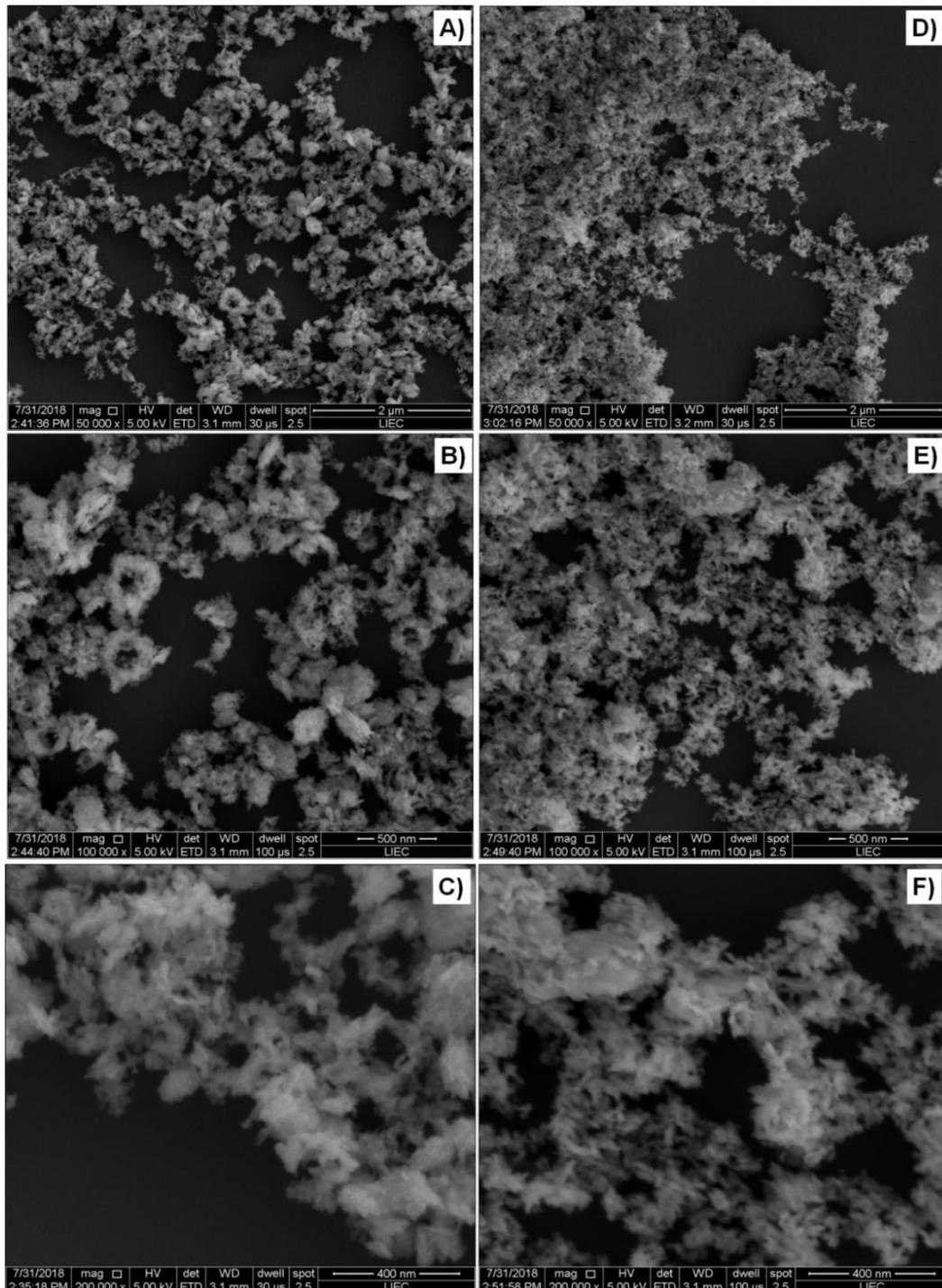
As micrografias das amostras obtidas em 120, 130 e 140° (Fig. 20 e Fig. 21) revelaram uma morfologia indefinida para as nanopartículas, contudo a amostra obtida a 150°C possui forma bastante definida do tipo flor (Fig. 22). Pereira e cols. (2018) sintetizaram NPs de tungstato de zinco através da mesma técnica e observaram que as amostras obtidas a 140°C, não apresentaram morfologia definida, enquanto as amostras obtidas a 150 e 160°C apresentaram formato de nanobastões (PEREIRA et al. 2018).

Diversas morfologias são descritas na literatura para  $ZnWO_4$  obtido através da síntese hidrotérmica. He et al. (2016) sintetizaram  $ZnWO_4$  com formato de nanofolhas, enquanto outros pesquisadores obtiveram nanobastões de  $ZnWO_4$  (CHEN, S-J. et al. 2003; ZHAI et al. 2016). A morfologia de nanopartículas correlaciona-se diretamente com os mecanismos de crescimento de cristais, os quais são regidos por diversos fatores, tais como pH, tempo e temperatura de síntese, solvente, dentre outros.

Quando as nanopartículas de  $ZnWO_4$  são obtidas por via hidrotérmica convencional, a literatura descreve a influência do pH na sua morfologia. Em geral um pH ácido é favorável para a formação de partículas esféricas, quando os tempos de síntese são longos (6 a 12 h), enquanto para períodos mais curtos, os valores básicos de pH são favoráveis.

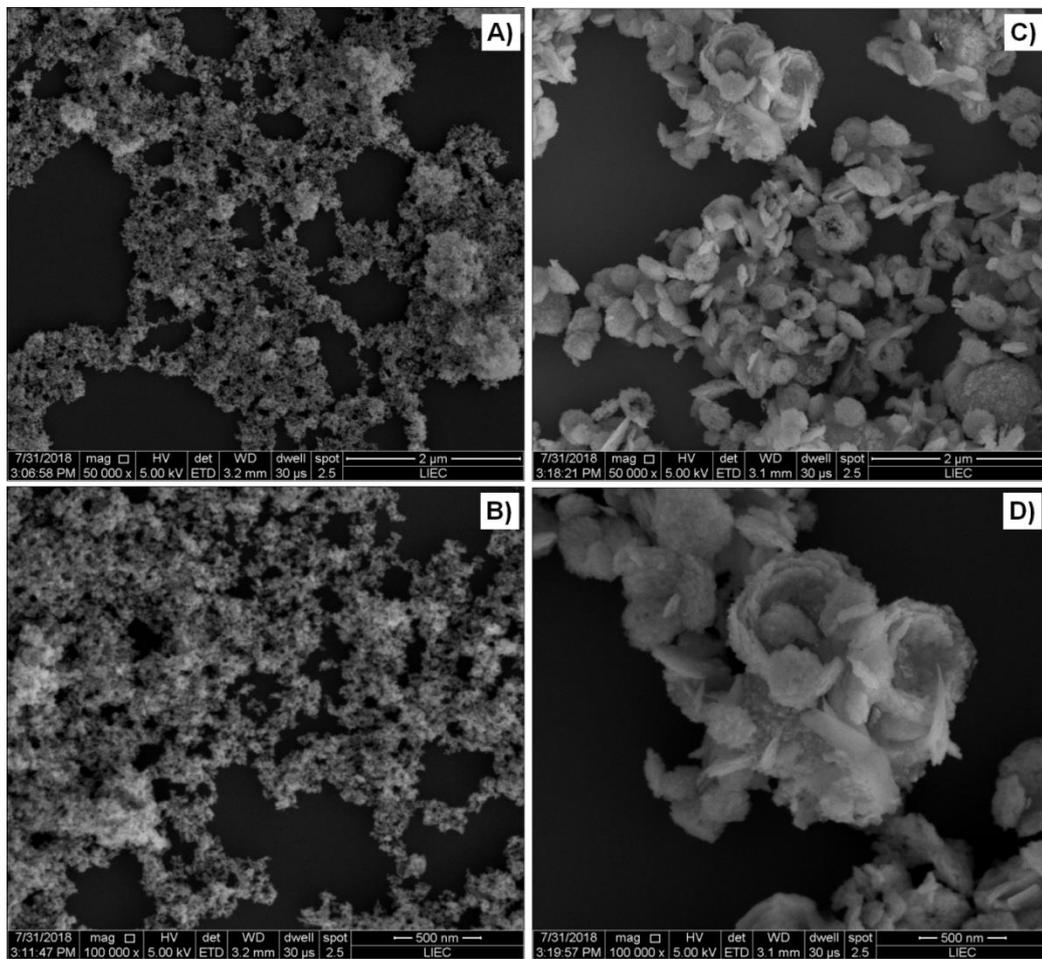
Yu e cols. (2003) avaliaram a influência do pH no crescimento de cristais de  $ZnWO_4$  sintetizados em sistema hidrotermal convencional a 180°C durante 12 horas. Eles revelaram o aumento dos cristais com o aumento do pH, variando-se o pH de 5 a 11, observaram a mudança da geometria das partículas de esferas (pH 5) para bastões (pH 6, 7, 8, 9, 10) de comprimentos crescentes, ao longo da série (YU et al. 2003).

**Figura 20** – Micrografia eletrônica de FEG SEM de  $\text{ZnWO}_4$  obtidos através do método HAM a  $120^\circ\text{C}$  e a  $130^\circ\text{C}$ .



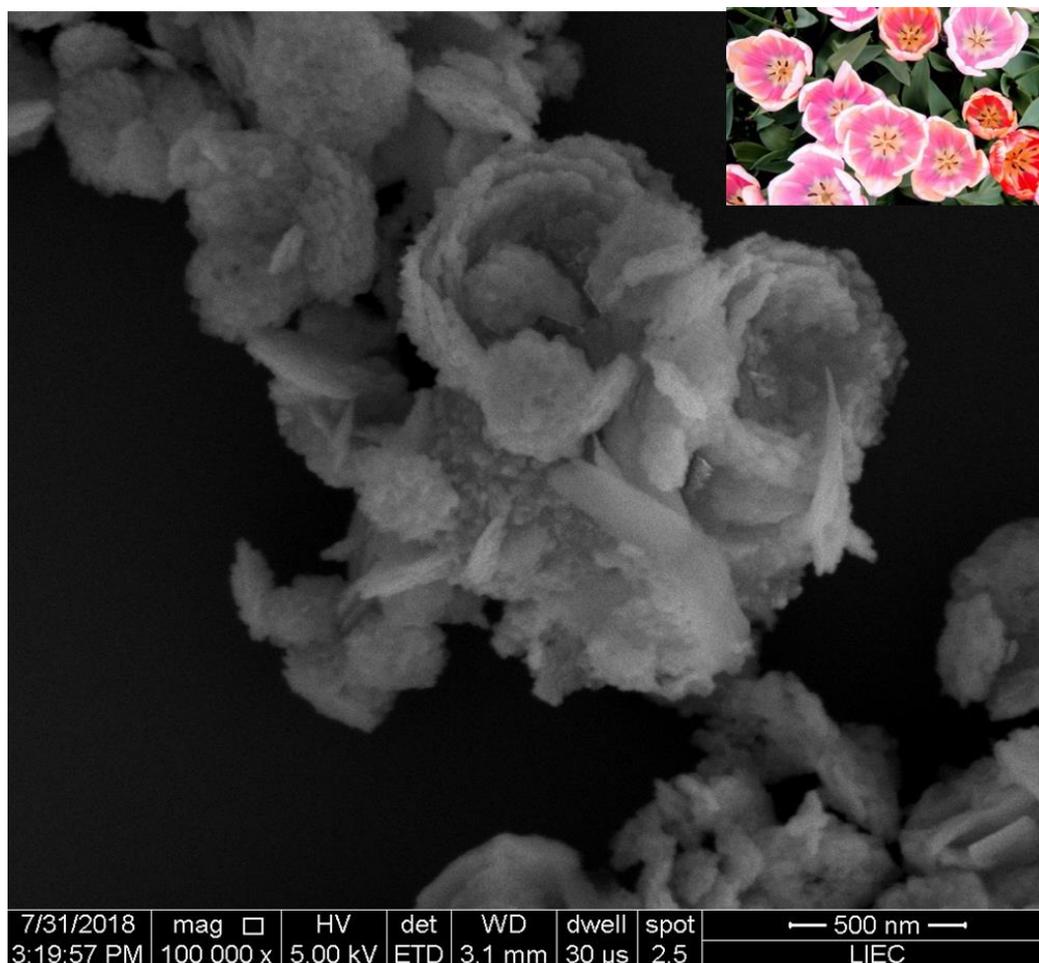
A, B e C:  $120^\circ\text{C}$ , aumentos 50.000 x; 100.000 x e 200.000 x, respectivamente. D, E e F:  $130^\circ\text{C}$ , aumentos 50.000 x; 100.000 x e 200.000 x. Fonte: Próprio autor.

**Figura 21** – Micrografia eletrônica de FEG SEM de  $\text{ZnWO}_4$  obtido através do método HAM a  $140^\circ\text{C}$  e  $150^\circ\text{C}$ .



A, B:  $140^\circ\text{C}$ , aumentos 50.000 x; 100.000 x, respectivamente. C, D:  $150^\circ\text{C}$ , aumentos 50.000 x; 100.000 x.  
Fonte: Próprio autor.

**Figura 22** – Micrografia eletrônica de FEG SEM de  $\text{ZnWO}_4$  obtido através do método HAM a  $150^\circ\text{C}$ .

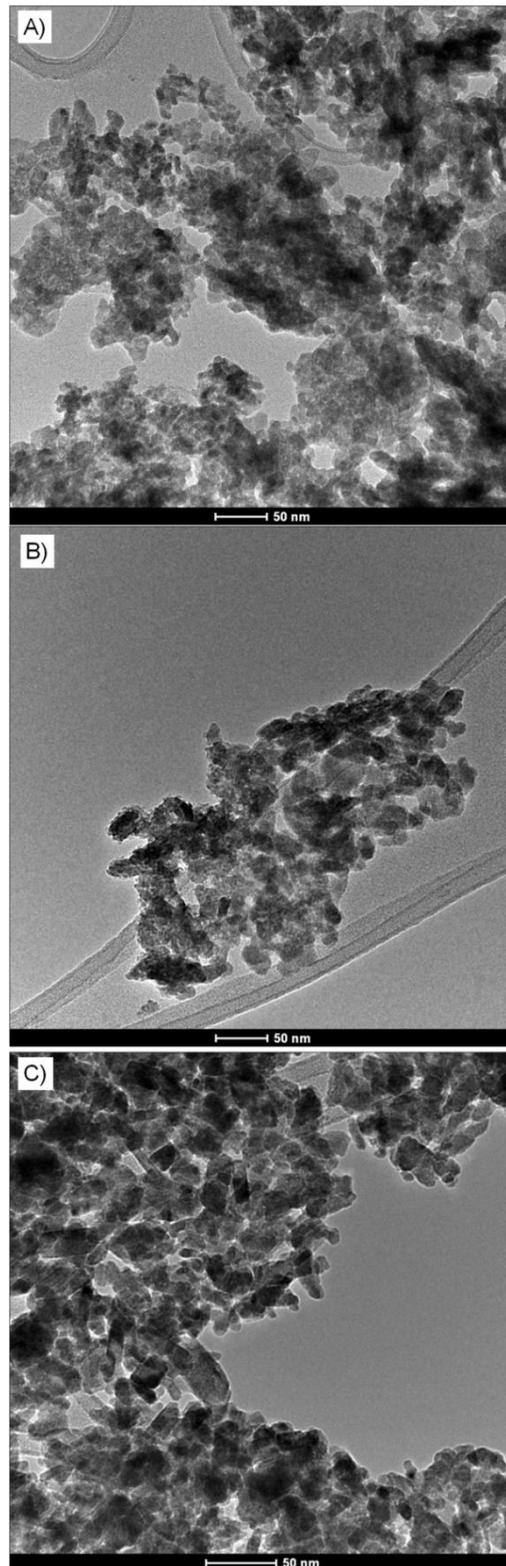


Aumento 100.000 x. Fonte: Próprio autor.

### 1.5.9. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

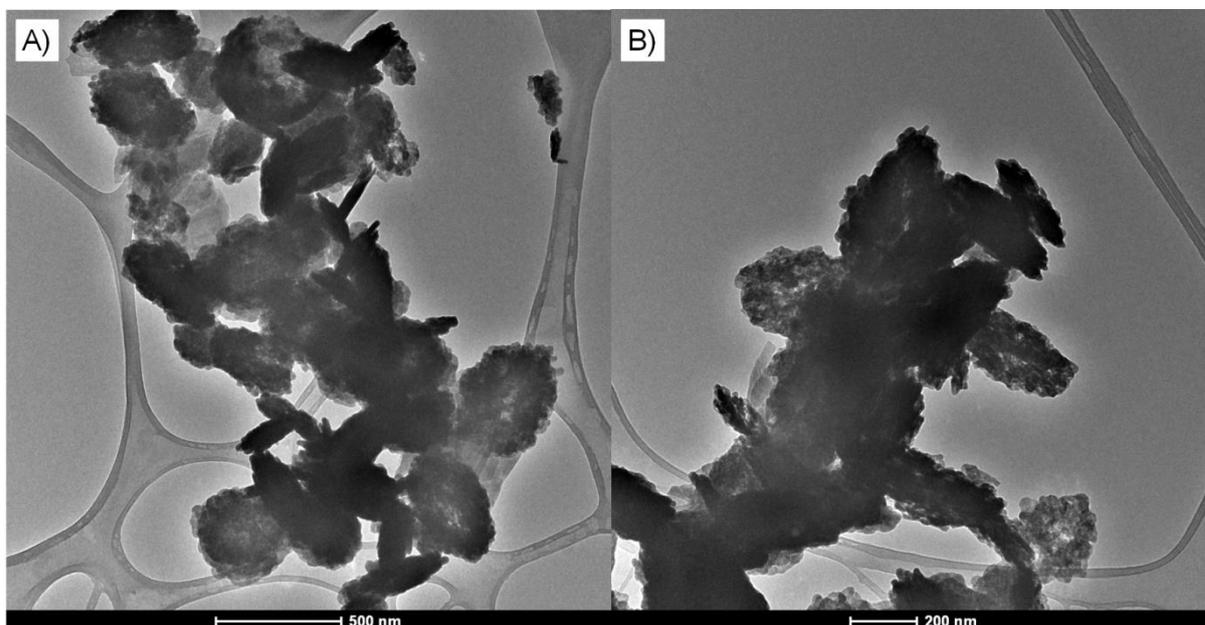
As Figuras 23-28 correspondem às micrografias eletrônicas de transmissão das amostras de  $\text{ZnWO}_4$  em função da temperatura de síntese. Comparando-se as micrografias é possível observar o efeito da temperatura na morfologia e no tamanho dos nanocristais de  $\text{ZnWO}_4$ . As amostras obtidas a  $120$ ,  $130$  e  $140^\circ\text{C}$  exibem morfologia indefinida (Fig. 23), entretanto, quando a temperatura é aumentada para  $150^\circ\text{C}$ , observou-se a presença de esferas com diferentes tamanhos (Fig. 24).

**Figura 23** - Micrografias eletrônicas de transmissão de nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  obtidas através de síntese HAM.



Amostras de  $\text{ZnWO}_4$  obtidas a 120°C (a); 130°C (b); 140°C (c). Escala: 50nm. Fonte: próprio autor.

**Figura 24** - Micrografia eletrônica de transmissão de nanopartículas de  $ZnWO_4$  obtidas através de síntese HAM, a  $150^\circ C$ .



Amostras de  $ZnWO_4$  a: escala 500nm; b: escala 200nm. Fonte: próprio autor.

O cálculo de tamanho médio de cristalito através da equação de Scherrer (Tabela 4) revelou que o aumento da temperatura de síntese ocasionou o aumento do tamanho médio das nanopartículas obtidas nesse trabalho, contudo não foi possível calcular o tamanho médio das nanopartículas através do ensaio de MET, devido à sobreposição de NPs observada nas micrografias eletrônicas. Embora o cálculo de tamanho médio de nanopartículas não pode ser realizado, comparando-se as micrografias das amostras obtidas a  $120$ ,  $130$  e  $140^\circ C$  (Fig. 23), observou-se uma tendência de aumento das dimensões das NPs conforme se aumentou a temperatura de síntese, esse aumento fica mais nítido para as amostras obtidas a  $150^\circ C$  (Figura 24).

Huang, Zhang e Zhu (2007) obtiveram resultados semelhantes para nanopartículas de  $ZnWO_4$  submetidas a síntese hidrotermal convencional (SHC) e em seguida calcinadas em forno, durante 1 hora. Eles demonstraram que as nanopartículas obtidas através de síntese hidrotermal, a  $180^\circ C$  por 2 horas, e amostras previamente submetidas a SHC e posteriormente calcinadas a  $400^\circ C$  não apresentaram morfologia definida e apresentaram-se sobrepostas umas às outras. A partir de  $450^\circ C$ , os autores observaram a redução da aglomeração do material assim como a morfologia das nanopartículas, as quais se apresentaram como poliedros tendendo ao formato esférico. Adicionalmente, eles demonstraram o aumento do

tamanho médio das partículas concomitantemente ao aumento da temperatura de síntese, assim como foi observado nesse trabalho (HUANG; ZHANG; ZHU, 2007).

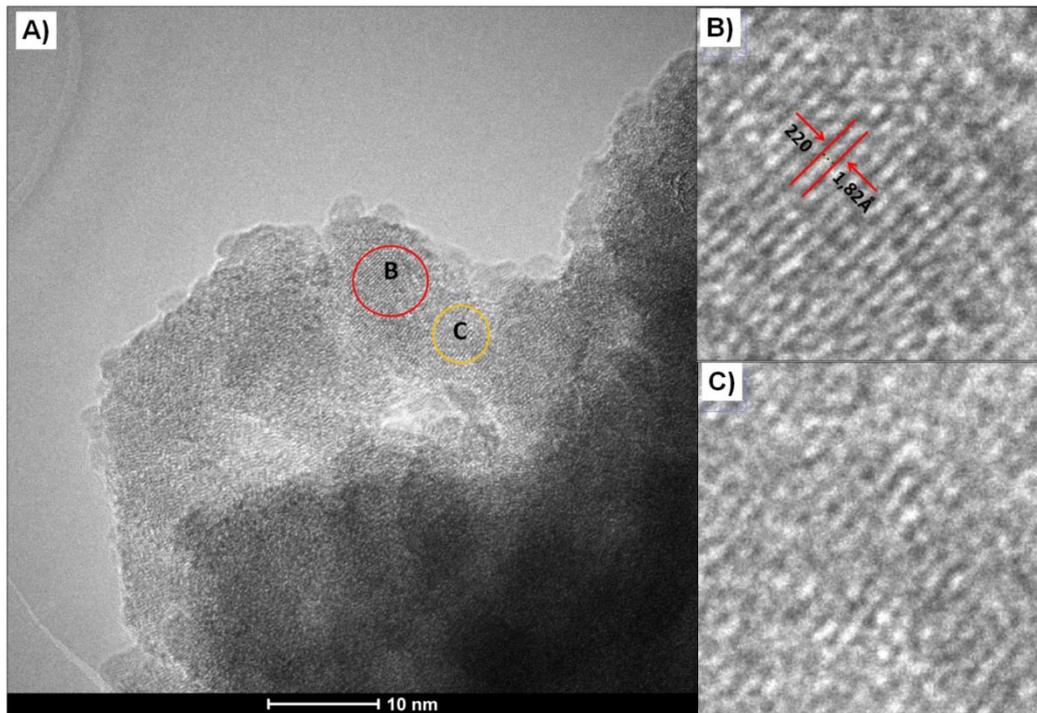
As micrografias obtidas através de MET (Fig. 23 e 24) estão de acordo com aquelas obtidas através do ensaio de FEG-SEM (Fig. 20-22), ambas as técnicas revelaram que as amostras obtidas a 120, 130 e 140°C não apresentaram morfologia definida, enquanto a amostra obtida a 150°C apresentou nanopartículas em forma de folhas, organizadas em camadas que sugerem um formato tipo flor.

As Figuras 25-28 demonstram os planos cristalinos de  $ZnWO_4$  em função da temperatura de síntese. As amostras obtidas a 120°C e a 130°C (Figuras 25 e 26) apresentaram-se semicristalinas, visto que foi possível observar regiões com planos cristalinos bem definidos e outras com planos em processo de formação, por outro lado, as micrografias referentes às amostras obtidas a 140 e a 150°C (Figuras 27 e 28) revelaram a elevada cristalinidade das nanopartículas, devido à presença de planos cristalinos bem definidos. Com auxílio do software gratuito ImageJ, nas regiões onde os planos cristalinos apresentaram-se bem definidos foi possível medir a distância entre planos adjacentes, e, conseqüentemente identificar o plano correspondente.

Os nanocristais sintetizados a 120° apresentaram crescimento na direção (220) (Fig. 25). Na amostra obtida a 130°C (Fig. 26), os nanocristais apresentaram crescimento nas direções (121) e (120), na amostra obtida a 140°C (Fig. 27) observou-se crescimento nas direções (-211) e (121), enquanto os nanocristais obtidos a 150°C (Fig. 28) cresceram nas direções (100) e (200). Com esses resultados, pode-se concluir que os nanocristais obtidos em diferentes temperaturas não apresentaram um mecanismo predominante de crescimento, visto que nas diferentes amostras foram observados crescimento em diferentes direções cristalográficas.

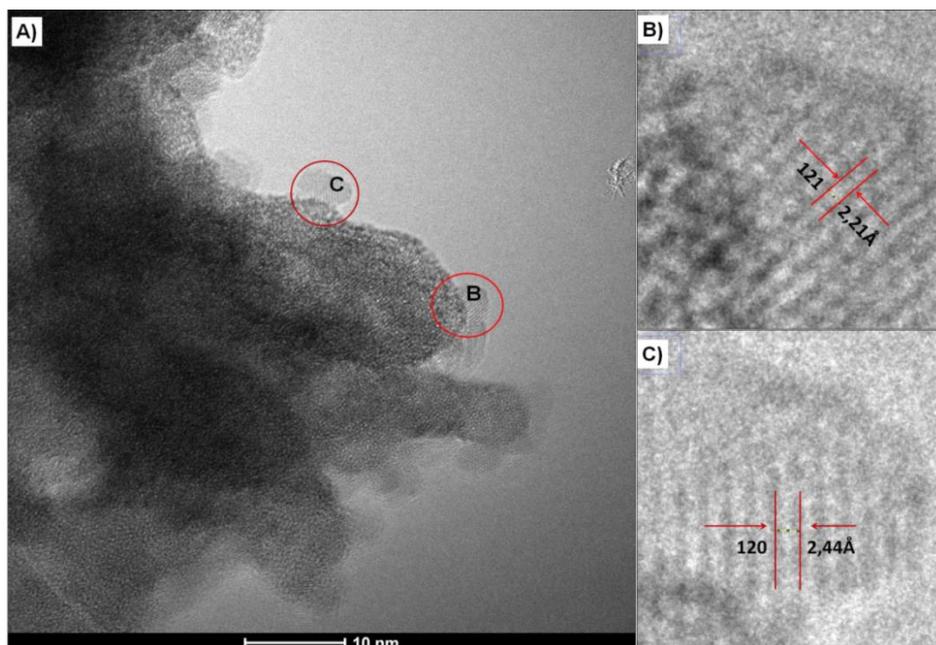
Os resultados da MET corroboram com aqueles do ensaio de DRX (Fig. 7), visto que a análise dos planos cristalinos (Figuras 25-28) confirmou a obtenção de nanocristais com estrutura monoclinica tipo wolframita. Adicionalmente, a ordem-desordem dos materiais também pode ser confirmada pela análise das micrografias eletrônicas, uma vez que as amostras obtidas a 120 e a 130°C (Figuras 25 e 26) apresentaram-se semicristalinas, enquanto as amostras obtidas a 140 e a 150°C (Figuras 27 e 28) apresentaram-se cristalinas.

**Figura 25** - Micrografia eletrônica de transmissão de nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  obtidas através do método HAM, a  $120^\circ\text{C}$ .



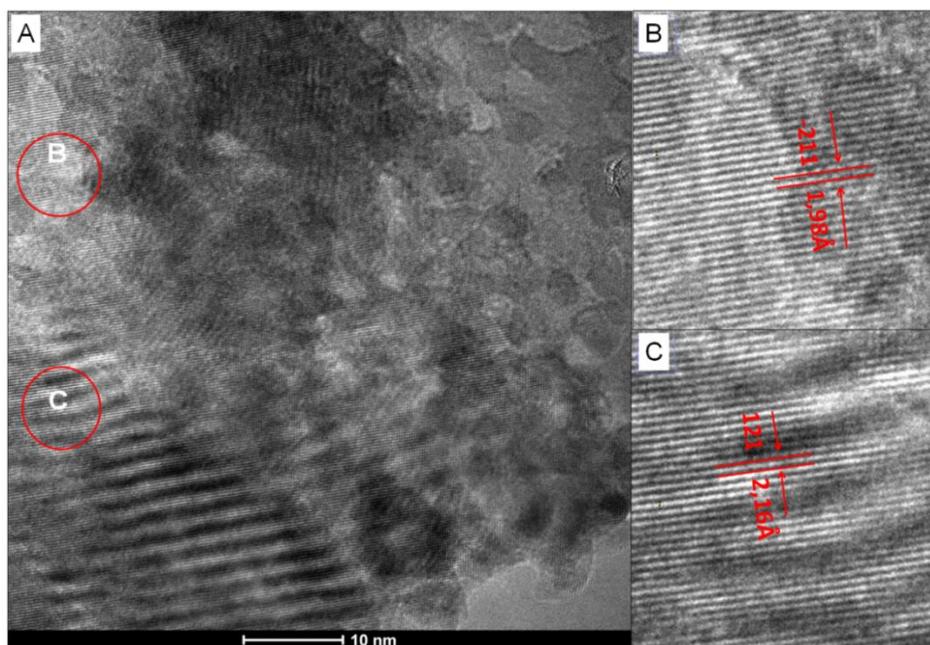
Escala 10nm (a); ampliação das regiões B (b) e C (c) da figura (a). Fonte: Próprio autor.

**Figura 26** - Micrografia eletrônica de transmissão de nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  obtidas através do método HAM, a  $130^\circ\text{C}$ .



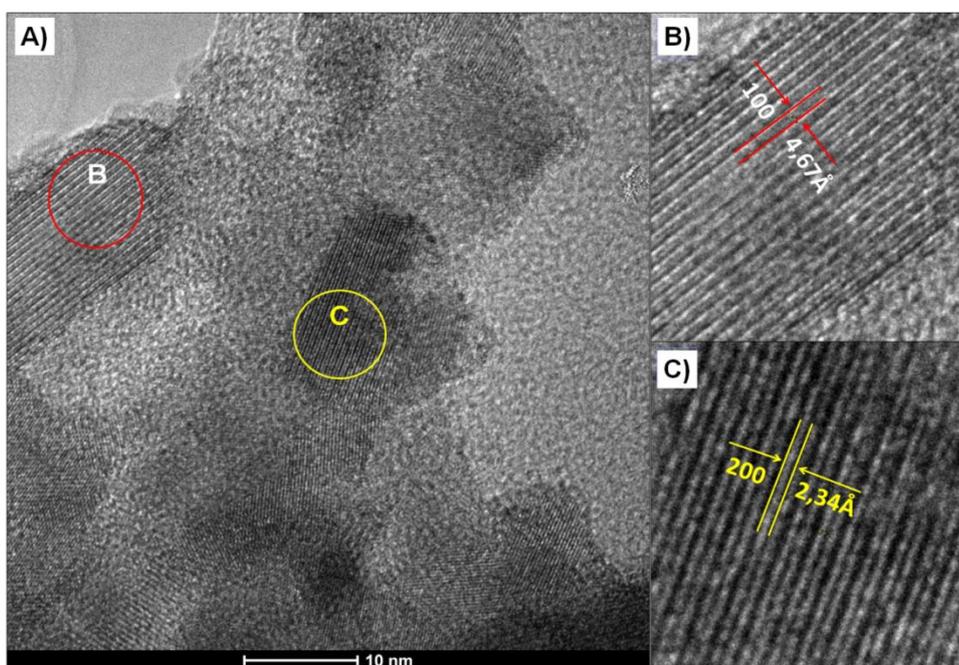
Escala 10nm (a); ampliação das regiões B (b) e C (c) da figura (a). Fonte: Próprio autor.

**Figura 27** - Micrografia eletrônica de transmissão de nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  obtidas através do método HAM, a  $140^\circ\text{C}$ .



Escala 10nm (a); ampliação das regiões B (b) e C (c) da figura (a). Fonte: Próprio autor.

**Figura 28** - Micrografia eletrônica de transmissão de nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  obtidas através do método HAM, a  $150^\circ\text{C}$ .



Escala 10nm (a); ampliação das regiões B (b) e C (c) da figura (a). Fonte: Próprio autor.

Juntos os resultados obtidos através das técnicas de microscopias eletrônicas de varredura e de transmissão, corroboram com aqueles dos ensaios de espectroscopias Raman

(Fig. 8), DRX (Fig. 7), UV-VIS (Figuras 13-18) e fotoluminescência (Fig.11), os quais revelaram que as amostras obtidas a 120, 130 e 140°C apresentaram-se semicristalinas, enquanto a amostra obtida a 150°C apresentou-se com elevada cristalinidade.

## 1.6. CONCLUSÃO PARCIAL

Nesse trabalho, foi demonstrada a obtenção de nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  após 1h de síntese hidrotermal assistida por micro-ondas a 120, 130, 140 e 150°C, contudo as amostras obtidas a 120, 130 e 140°C não apresentaram completa cristalinidade. Os resultados aqui apresentados revelaram pela primeira vez a emissão fotoluminescente de nanopartículas desordenadas de tungstato de zinco na região amarelo-vermelho do espectro visível e sugerem que essa propriedade esteja correlacionada à presença de estados energéticos intermediários, localizados dentro do “*band gap*”, provavelmente devido ao aprisionamento de elétrons nas vacâncias de oxigênio das nanopartículas desordenadas obtidas a 120, 130 e 140°C. Juntos esses dados realçam a influência do tamanho e do estado de ordem-desordem nas propriedades de nanopartículas de tungstato de zinco.

## Capítulo 2

**Estudo da citotoxicidade, *in vitro*, de nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub>**

CARLA JÚNIA SANTOS<sup>1</sup>; DANIEL CRISTIAN FERREIRA SOARES<sup>1</sup>; FRANCISCO  
MOURA FILHO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ CAMPUS DE ITABIRA

## RESUMO

Nanopartículas de tungstato de zinco são candidatas potenciais para uma série de aplicações tecnológicas, além disso, alguns estudos propõem que tungstatos metálicos nanoestruturados são promissores para aplicações em química medicinal devido às suas propriedades citotóxicas seletivas contra células tumorais, contudo ainda não há estudos, *in vitro*, sobre a biocompatibilidade de nanopartículas de tungstato de zinco. Dessa forma, o objetivo do presente capítulo foi verificar a hipótese de que nanopartículas de tungstato de zinco apresentam biocompatibilidade, ou seja, não apresentam toxicidade contra células normais humanas. Para a avaliação da biocompatibilidade de nanopartículas de  $ZnWO_4$ , obtidas através do método hidrotermal assistido por microondas, estudos de viabilidade celular foram conduzidos, *in vitro*, em linhagens de células normais humanas de rim embrionário [HEK-293 (ATCC® CRL-1573<sup>TM</sup>)]. Células HEK inoculadas em placas de cultivo de 12 poços foram submetidas a 24 e a 48 horas de tratamento com soluções de tampão salina-fosfato (PBS – CONTROLE NEGATIVO), dimetilsulfóxido (DMSO –CONTROLE POSITIVO) e NPs  $ZnWO_4$  (1,0, 10 e 20 $\mu$ g/mL). Para avaliar a influência das NPs de  $ZnWO_4$  na viabilidade celular de células normais HEK foram realizados os ensaios de viabilidade celular por meio de análise morfológica através da técnica de microscopia óptica e através da técnica de citometria de fluxo, utilizando-se o fluorocromo V450, que permite diferenciar células vivas de células mortas. Para avaliar se NPs de  $ZnWO_4$  promovem algum mecanismo de morte celular, em linhagem de células HEK, foi realizado o ensaio de apoptose celular através da técnica de citometria de fluxo, utilizando-se o kit de detecção de apoptose composto pelos fluorocromos anexina V-PE e 7-aminoactinomicina (7-AAD), seletivos para células em processo de morte programada precoce (apoptose) e em processo de morte induzida tardia (necrose), respectivamente. Os ensaios de viabilidade celular por análise morfológica e por citometria de fluxo revelaram que as nanopartículas de  $ZnWO_4$ , nas concentrações testadas, não promoveram alterações na morfologia celular e não ocasionaram redução da viabilidade celular, respectivamente, em relação ao grupo controle negativo. Adicionalmente, o ensaio de apoptose demonstrou que nanopartículas de  $ZnWO_4$  não estimulam processos de morte celular por apoptose ou necrose de maneira significativa, quando comparadas ao grupo controle negativo. Juntos, esses resultados sugerem que as nanopartículas de  $ZnWO_4$ , nas concentrações testadas, apresentam biocompatibilidade em linhagem de células normais de rim humano, contudo ensaios adicionais utilizando outras linhagens de células normais devem ser realizados, no futuro.

## 2.1.INTRODUÇÃO

A toxicidade de nanomateriais depende diretamente de suas propriedades físicas e químicas, tais como, composição, estrutura cristalina, tamanho, carga superficial, propriedades elétricas, dentro outras (DANIELSEN et al. 2014; ERNSTING et al. 2013; FOGGI et al. 2017; NAJAFI-HAJIVAR et al. 2016). Fundamentando-se nos relatos descritos na literatura sobre a citotoxicidade seletiva de nanopartículas de óxidos semicondutores, esse capítulo descreve os estudos, *in vitro*, para a avaliação de citotoxicidade de nanopartículas de tungstato de zinco, até então, não descritos na literatura.

Materiais candidatos a aplicações em química medicinal sejam como agente terapêutico ou de diagnóstico, devem ser submetidos a ensaios, *in vitro* e *in vivo*, que comprovem a sua segurança em meio biológico. Neste contexto algumas propriedades são fundamentais para esses materiais (WILLIAMS, 2008; YU; ZHENG, 2015):

- Não induzir a formação de trombos;
- Não induzir resposta imunológica;
- Não ser tóxico;
- Não ser carcinogênico;
- Não prejudicar o fluxo sanguíneo;
- Não produzir resposta inflamatória aguda ou crônica.

A citotoxicidade é definida como a capacidade, inerente e potencial, de determinada substância química de provocar alterações danosas ao organismo, como, por exemplo, alteração do funcionamento da célula ou morte celular. Os estudos voltados para a determinação da citotoxicidade são úteis para estabelecer o perfil de segurança para nanomateriais candidatos a aplicações em química medicinal e em diagnóstico, para tal, idealmente, os ensaios devem estabelecer a concentração letal 50 (IC<sub>50</sub>), que representa a concentração da substância capaz de promover inibição ou morte de 50% da população de células testadas, *in vitro* (SEBAUGH, 2011). Além de ser um parâmetro importante de segurança para aplicações biológicas de nanomateriais, o estudo de citotoxicidade em microrganismos patogênicos e em células tumorais também possibilita a descoberta de novos possíveis agentes quimioterápicos (BARREIRO; FRAGA, 2015).

O termo quimioterapia foi cunhado pela primeira vez por Paul Ehrlich, na segunda década do século passado, para referir-se a substâncias sintéticas citotóxicas utilizadas no tratamento de doenças infecciosas (KAUFMANN, 2008), as quais, por sua vez, podem ser

entendidas como a invasão de um organismo saudável por outros patogênicos, com consequente prejuízo da homeostase do organismo devido à presença de células estranhas capazes de causar doença no organismo. Os organismos patogênicos podem ser microrganismos, tais como fungos, bactérias, vírus, protozoários, ou até mesmo células do hospedeiro, no caso de células tumorais, que embora façam parte do organismo do hospedeiro, são reconhecidas como organismos patogênicos e desencadeiam uma resposta de defesa do organismo infectado, assim como outros organismos patogênicos estranhos ao corpo (GIESECKE, 2002).

Os medicamentos quimioterápicos apresentam citotoxicidade contra os agentes infecciosos, porém é extremamente desejável que essas substâncias sejam inócuas, ou seja, não sejam citotóxicas para as células normais dos animais a serem tratados. Dessa forma, constitui-se como vantagem a toxicidade seletiva de substâncias candidatas a agentes quimioterápicos, pois essa característica implica em redução significativa dos efeitos adversos oriundos da toxicidade das substâncias de interesse em outros tecidos não afetados pela infecção (CHABNER et al. 2010). Nesse ínterim, baseando-se na hipótese de que nanopartículas apresentam citotoxicidade seletiva (LIN et al. 2012; SELVAMANI et al. 2016), nesse trabalho avaliou-se a citotoxicidade de nanopartículas de tungstato de zinco contra células normais de humanos.

## 2.2. OBJETIVO GERAL

Investigar a biocompatibilidade de nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  em células normais humanas.

### 2.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estabelecer, *in vitro*, o cultivo de células normais humanas de rim embrionário para ensaios de citotoxicidade;
- b) Estudar, *in vitro*, a biocompatibilidade das NPs sintetizadas em linhagens normais de células humanas através do ensaio de viabilidade celular por meio de análise morfológica em microscopia óptica;
- c) Estudar, *in vitro*, a biocompatibilidade das NPs sintetizadas em linhagens normais de células humanas através do ensaio de viabilidade celular, por meio da técnica de citometria de fluxo;
- d) Estudar, *in vitro*, os mecanismos de morte celular das NPs sintetizadas em linhagens normais de células humanas através da técnica de citometria de fluxo.

## **2.3.MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.3.1. CULTIVO CELULAR**

Todos os experimentos de cultivo celular e citometria de fluxo foram realizados obedecendo-se os critérios de biossegurança descritos na norma ISO 10993-5 (2009), para tal todos os materiais utilizados foram previamente esterilizados e todas as etapas da manipulação de células foram realizadas em cabina de segurança biológica BIOSEG 12, classe II tipo A1 (Grupo Veco).

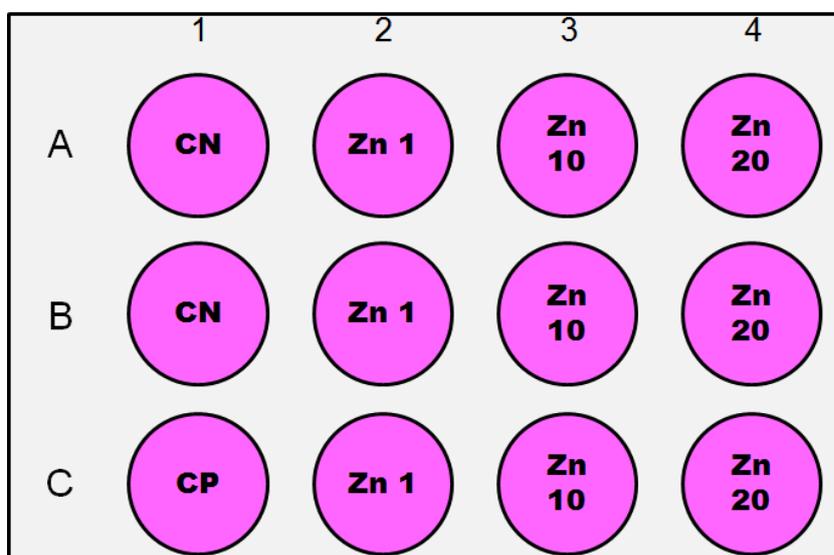
Para a análise da biocompatibilidade das NPs obtidas utilizou-se cultura de células de rim de embrião humano [human embryonic kidney (HEK)] (ATCC® CRL-1573™) de baixa passagem, morfologia epitelial e com propriedades de adesão, as quais foram cultivadas em frascos de cultivo celular apropriados [50mL, modelo K11-1050 (KASVI); 250mL, modelo K11-1250 (KASVI); 600mL, K11-1600 (KASVI)]. Utilizou-se meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) [4500mg/L glicose; 4M l-glutamina; 110mg/L piruvato de sódio; 3,7g/L bicarbonato de sódio (Sigma Aldrich)] suplementado com soro fetal bovino 10% e estreptomicina 1%. As células foram incubadas em incubadora de CO<sub>2</sub> modelo 311 (Thermo Fisher Scientific Asheville LLC) com atmosfera (95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub>) e umidade controladas, a 37°C.

### **2.3.2. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR MICROSCOPIA ÓPTICA**

Após as células adquirirem confluência de cerca de 90%, aproximadamente  $1,0 \times 10^8$  células foram transferidas para placas de cultivo celular de 12 poços, onde permaneceram durante 24 horas para adesão e aclimação, antes da realização dos tratamentos com nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub>.

Após a fixação das células às placas de cultivo (24h), foram preparadas suspensões de nanopartículas de tungstato de zinco em PBS e inoculadas nos poços contendo DMEM. Para tal foram estabelecidos os grupos experimentais descritos na Figura 29, conforme trabalho prévio conduzido por Barui e cols. (2012) que utilizaram em seus estudos nanopartículas de óxido de zinco.

**Figura 29** – Distribuição dos tratamentos em placa de 12 poços para ensaio de viabilidade celular de NPs de  $\text{ZnWO}_4$  em células HEK.



CN: controle negativo, tampão salina fosfato [*Phosphate Buffer Saline* (PBS)]; CP: controle positivo, dimetilsulfóxido [DMSO (20%)] (TONY et al. 2015); Zn 1:  $\text{ZnWO}_4$  1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Zn 10:  $\text{ZnWO}_4$  10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Zn 20:  $\text{ZnWO}_4$  20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Fonte: Próprio autor.

Dois experimentos independentes foram realizados 24 e 48 horas após o tratamento inicial, para avaliar os efeitos de nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  em células normais HEK. Para a avaliação da viabilidade celular através da observação direta da morfologia das células, transcorrido os tempos de incubação, as placas de cultivo tratadas foram analisadas com o auxílio de um microscópio óptico invertido AE2000 (Motic) e as imagens foram registradas utilizando-se uma câmera Moticam (Motic) acoplada ao microscópio.

### 2.3.3. ESTUDO DE VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO

O estudo de viabilidade celular de células HEK tratadas com NPs de  $\text{ZnWO}_4$  foi realizado através da técnica de citometria de fluxo utilizando-se o kit de viabilidade celular FVS450 [BD Horizon<sup>TM</sup> (BD Biosciences, São Paulo)], o qual possibilita a discriminação de células de mamíferos viáveis de não-viáveis. O kit possui um fluorocromo com emissão máxima em 450nm, o qual reage ligando-se covalentemente às aminas da superfície celular e do meio intracelular. Células mortas apresentam aumento da fluorescência quando comparadas às células vivas.

Após a observação e registro de imagens das células, elas foram removidas das placas de cultivo, com o auxílio de solução de tripsina 0,25% (p/V) /EDTA 0,53mM, e transferidas para tubos cônicos de centrífuga, os quais foram centrifugados a 1000 rpm durante 5 minutos. Após o descarte da solução sobrenadante, as células foram lavadas com PBS, novamente a solução sobrenadante foi descartada e as células ressuspensas em 1mL de PBS. À suspensão de células adicionou-se 1 $\mu$ L de solução contendo o fluorocromo FVS450 (0,25mg/mL) e agitou-se vigorosamente o tubo. Os tubos foram incubados protegidos da luz, à temperatura ambiente, durante 10 minutos. Transcorrido o tempo de incubação, as células foram lavadas, duas vezes, com 2mL de tampão PBS suplementado com soro fetal bovino [BD Pharmigen™, (BD Biosciences, São Paulo)]. Em seguida, as células foram ressuspensas em 2mL de PBS e submetidas ao ensaio de citometria de fluxo.

Para cada amostra foram realizadas 10.000 aquisições para a realização do tratamento estatístico adequado. Parâmetros como a intensidade de emissão do fluorocromo e outros relacionados ao desvio da luz dos lasers do citômetro pelas amostras, indicativos da granulosidade e complexidade das células [*Side Scattering* (SSC)] e do tamanho celular [*Foward scattering* (FSC)] foram mensurados. Os ensaios de viabilidade celular através de citômetro de fluxo foram realizados no laboratório de Bioengenharia da Universidade Federal de Itajubá Campus Itabira.

#### **2.3.4. ESTUDO DE MECANISMOS DE MORTE CELULAR ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO**

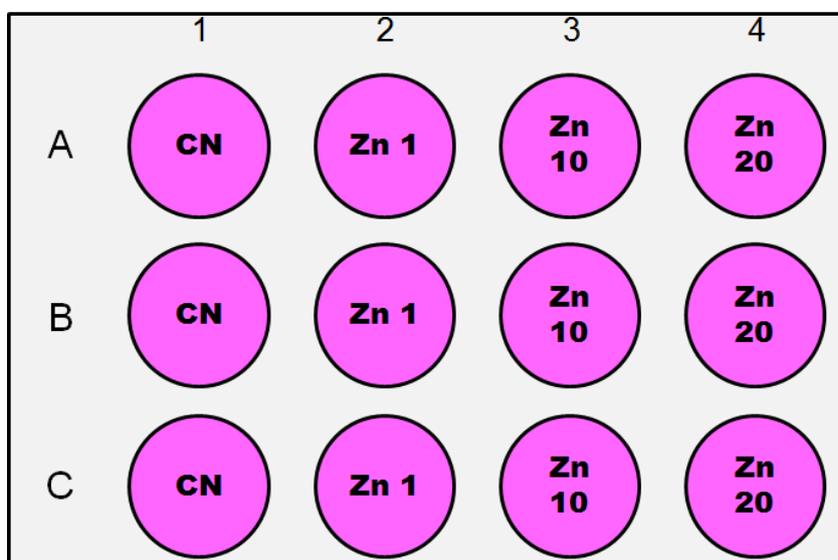
Com o intuito de verificar a toxicidade de NPs de ZnWO<sub>4</sub> contra células normais HEK, foi realizado o ensaio de mecanismos de morte celular, a partir do kit de detecção de apoptose anexina V-PE (anexina V conjugada ao fluorocromo ficoeritrina) [BD Pharmingen™ (BD Biosciences, São Paulo)]. Em sistemas biológicos, são descritos dois processos de morte celular, a apoptose, um processo fisiológico normal de morte programada das células, e a necrose, processo de morte celular induzido por lesões celulares, as quais podem ser mecânicas ou causadas por agentes físicos ou químicos. O kit de determinação de mecanismos de morte celular, utilizado nesse trabalho, baseia-se no uso de dois fluorocromos, anexina V-PE, seletivo para células em processo de morte celular por apoptose e o 7-aminoactinomicina (7-AAD), seletivo para células em processo de necrose.

A anexina V é uma proteína de ligação a fosfolipídios, dependente de Ca<sup>2+</sup>, com elevada afinidade pela fosfatidilserina, um fosfolipídio de membrana que migra para a superfície

extracelular da membrana plasmática na fase inicial do processo de apoptose. Moléculas de anexina V ligadas ao fluorocromo ficoeritrina preservam a sua afinidade para as moléculas de fosfatidilserina expostas na face externa da membrana e, portanto, são eficazes na identificação de células em estágios precoces de apoptose. A distinção entre células apoptóticas ou necróticas é possível devido às diferenças na permeabilidade da membrana celular, visto que células viáveis ou em estágios precoces de apoptose apresentam a membrana íntegra, o que impede a entrada do 7-AAD. Por outro lado, células danificadas ou mortas são permeáveis ao 7-AAD, devido à presença de lesões na membrana plasmática, o que torna esse fluorocromo seletivo para células em processos tardios de apoptose ou em necrose.

Para o ensaio de avaliação dos mecanismos de morte celular, um experimento independente foi conduzido em uma placa de 12 poços, de maneira análoga ao ensaio de viabilidade celular. Após a fixação das células no fundo da placa (24 h), elas foram submetidas aos tratamentos, conforme ilustrado na Figura 30.

**Figura 30** – Distribuição dos tratamentos em placa de 12 poços para ensaio de mecanismo de morte celular de NPs de  $ZnWO_4$  em células HEK.



CN: controle negativo (PBS);  $ZnWO_4$  1,0 $\mu$ g/mL: Zn 1;  $ZnWO_4$  10 $\mu$ g/mL: Zn 10;  $ZnWO_4$  20 $\mu$ g/mL: Zn 20.  
Fonte: Próprio autor.

Quarenta e oito (48) horas após os tratamentos, as células foram removidas com o auxílio de solução de tripsina 0,25% (p/V) /EDTA 0,53mM e transferidas para tubos cônicos de centrifuga, os quais foram centrifugados a 1000 rpm durante 5 minutos. Após o descarte

das soluções sobrenadantes, as células foram lavadas e centrifugadas, duas vezes, com PBS, novamente as soluções sobrenadantes foram descartadas e as células ressuspensas em 1mL do tampão de ligação (0,01M HEPES/NaOH, 0,14M NaCl, 0,25mM CaCl<sub>2</sub>), em seguida 100µL das suspensões de células foram transferidas para tubos de ensaio de 5mL e foram adicionados 5µL de anexina V-PE e 5µL de 7-AAD, em cada tubo. Os tubos foram gentilmente homogeneizados, incubados protegidos da luz, à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Transcorrido o tempo de incubação, foram adicionados 400µL do tampão de ligação em cada tubo e as amostras foram submetidas ao ensaio de citometria de fluxo.

Para cada amostra foram realizadas 10.000 aquisições para a realização do tratamento estatístico adequado. Os parâmetros avaliados foram as intensidades de emissão dos fluorocromos anexina V-PE e 7-AAD. Os ensaios de mecanismos de morte celular através de citômetro de fluxo foram realizados no laboratório de Bioengenharia da Universidade Federal de Itajubá Campus Itabira.

### **2.3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

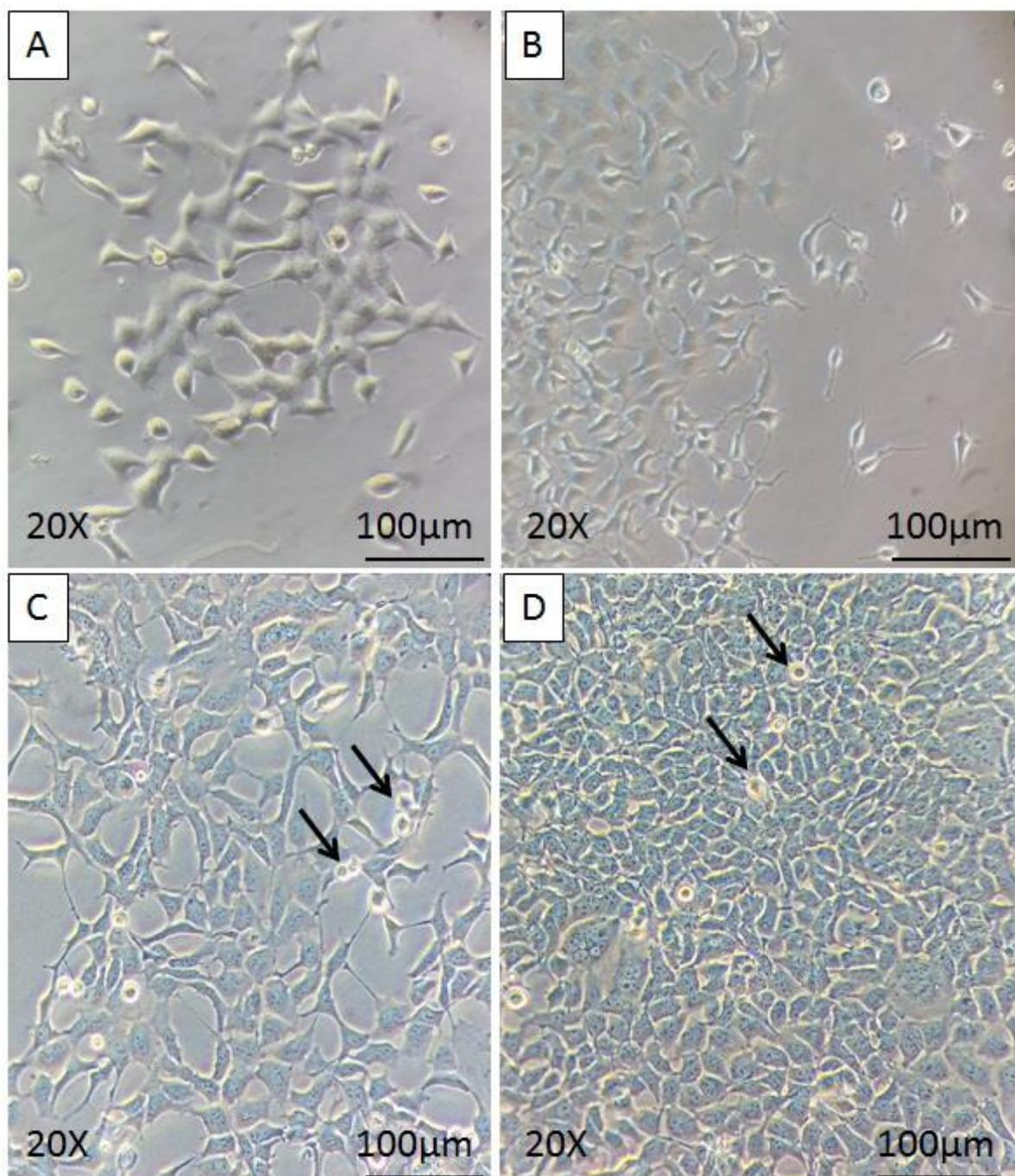
Os ensaios foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni. As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o software Graphpad Prism 5.0 Software para Windows (Graphpad Software Inc., California, USA). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) e o nível de significância estabelecido foi  $p < 0,05$ .

## **2.4.RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **2.4.1. CULTIVO CELULAR**

Para o desenvolvimento de estudos de biocompatibilidade e de mecanismos de morte celular, inicialmente realizou-se o cultivo celular de células HEK. A Figura 31 representa células HEK em diferentes estágios de crescimento. Essa linhagem de células normais embrionárias de rim humano caracteriza-se por sua morfologia epitelial, observada por meio de projeções do seu citoplasma, indispensáveis para a ocorrência de adesão entre as células, processo fundamental para o seu desenvolvimento (Figuras 31-A, 31-B). Além disso, as propriedades aderentes tornam essas células ideais para o cultivo em laboratório, visto que permitem a adesão entre as células e a superfície das placas de cultivo, conforme ilustrado na Figura 31. Quando as células atingem um crescimento adequado (cerca de 90% de confluência), apresentam-se intimamente aderidas umas às outras (Figura 31-D), momento ótimo para a sua utilização, seja para a realização de estudos, para dar continuidade ao cultivo em outros frascos, ou para o congelamento das células para a preservação da espécie.

**Figura 31** - Células HEK em diferentes estágios de desenvolvimento.



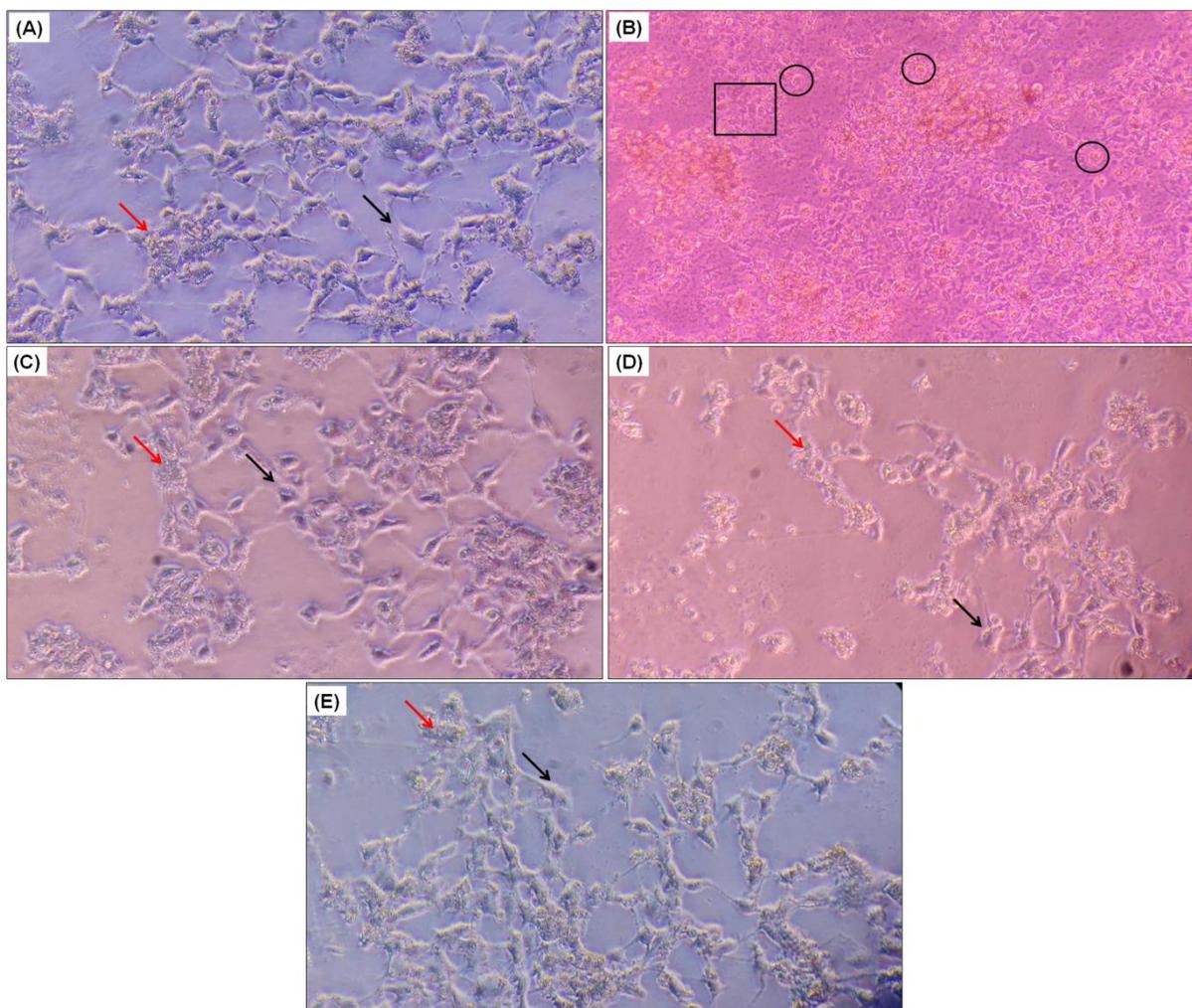
A-B: Início da formação da monocamada de células HEK, notam-se projeções citoplasmáticas que permitem o contato célula-célula; C: Estágio inicial de fechamento da monocamada de células, nota-se células mortas (setas); D: Estágio avançado de desenvolvimento, nota-se camadas sobrepostas de células, assim como células mortas (setas). Fonte Próprio autor.

#### 2.4.2. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Nesse trabalho, foi possível avaliar a biocompatibilidade de três concentrações de NPs de  $\text{ZnWO}_4$  em cultura de células HEK através das técnicas de microscopia óptica e citometria de fluxo. Com o objetivo de verificar a ocorrência de alterações da morfologia celular, assim como a presença de células mortas, inicialmente as placas de cultivo devidamente tratadas (Figura 29) foram submetidas a análise de viabilidade celular por observação direta em microscópio óptico. A Figura 32 ilustra as micrografias dos poços da placa de cultivo contendo células HEK submetidas a diferentes tratamentos.

A Figura 32-A representa o grupo controle negativo, onde as células foram tratadas com o solvente PBS, utilizado para o preparo das suspensões de NPs de tungstato de zinco. Nessa micrografia é possível observar a coexistência de células HEK aderidas ao fundo da placa de cultivo (seta preta) com morfologia epitelial normal e células HEK não aderidas (seta vermelha). Utilizou-se nesse trabalho a linhagem de células HEK, células epiteliais embrionárias de rim humano, que apresentam morfologia epitelial observada por meio de projeções do seu citoplasma e, conseqüentemente, propriedades aderentes, ou seja, elas aderem à superfície das placas de cultivo e quando atingem um crescimento adequado estão intimamente aderidas umas às outras, dessa maneira a Figura 32-A representa as células HEK em processo de crescimento na placa de cultivo, naturalmente, com um equilíbrio entre células que conseguiram se aderir e apresentam morfologia epitelial normal e outras sobrenadantes no meio de cultura, devido ao estresse mecânico ocasionado pela transferência das células de uma garrafa de cultivo para uma placa de cultivo (ATCC, 2018).

**Figura 32** – Micrografias de células HEK após 48 horas de inoculação dos diferentes tratamentos.



Células HEK, 48 horas após a inoculação de PBS (A (controle negativo)); DMSO (B (controle positivo)); nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (C); 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (D); 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (E). As setas pretas indicam células HEK aderidas ao fundo da placa. As setas vermelhas indicam células HEK não aderidas. O quadrado preto indica fragmentos celulares. Os círculos pretos indicam células mortas. Aumento: 40x. Fonte: Próprio autor.

A figura 32-B representa o grupo controle positivo, onde as células foram tratadas com um solvente citotóxico, DMSO (TONY et al. 2015). Nessa imagem é possível observar a predominância de células mortas (destacadas por círculos pretos), as quais apresentam alteração expressiva da sua morfologia quando comparada às células vivas com formato epitelial (Fig. 32-A), nota-se também a presença de fragmentos celulares (destacados pelo quadrado preto). A cor do meio de cultura é outra diferença nítida entre a imagem que representa as células viáveis (Fig. 32-A, controle negativo) e a imagem que representa as células mortas (Fig. 32-B, controle positivo), de modo que a primeira (Fig. 32-A) apresenta

coloração arroxeadada enquanto a segunda apresenta coloração rosa. A alteração de cor do meio de cultura, DMEM, utilizado nos ensaios de viabilidade celular deve-se à presença de um indicador de pH, o vermelho de fenol. O indicador ácido-base utilizado, em pH menor que 6,6 apresenta coloração amarela, em pH 7,4 sua cor é roxa, em pH maior que 8,0 apresenta-se vermelho e em pH maior que 8,1 possui coloração rosa (ou magenta). Cultivos celulares contendo células com crescimento normal apresentam alteração da cor vermelha para tons mais claros, passando pelo roxo em pH próximo de 7, até chegar ao amarelo, na medida em que as células consomem os nutrientes do meio e liberam seus metabólitos nele. Por outro lado, cultivos com células em processo de morte celular apresentam aumento do pH e o meio torna-se rosa intenso (magenta), devido à liberação do conteúdo citoplasmático das células, rico em metabólitos proteicos, principalmente, conforme observado na Fig. 32-B.

As Figuras 32-C, D, E representam as células HEK tratadas com nanopartículas de  $ZnWO_4$  nas concentrações 1,0, 10 e 20 $\mu$ g/mL, respectivamente. É possível observar, assim como na figura que representa o grupo controle negativo (Fig 32-A), a coexistência de células aderidas normais e células sobrenadantes. Comparando-se essas imagens com a Fig 32-B (controle positivo) não foram observadas células mortas ou fragmentos celulares de maneira significativa. Dessa forma, a análise da viabilidade celular através da observação direta com o auxílio do microscópio óptico (Figuras 32 A-E), sugere ausência de citotoxicidade para NPs de  $ZnWO_4$  nas concentrações de 1,0, 10 e 20 $\mu$ g/mL contra células HEK, uma vez que não foram observadas alterações significativas na morfologia celular.

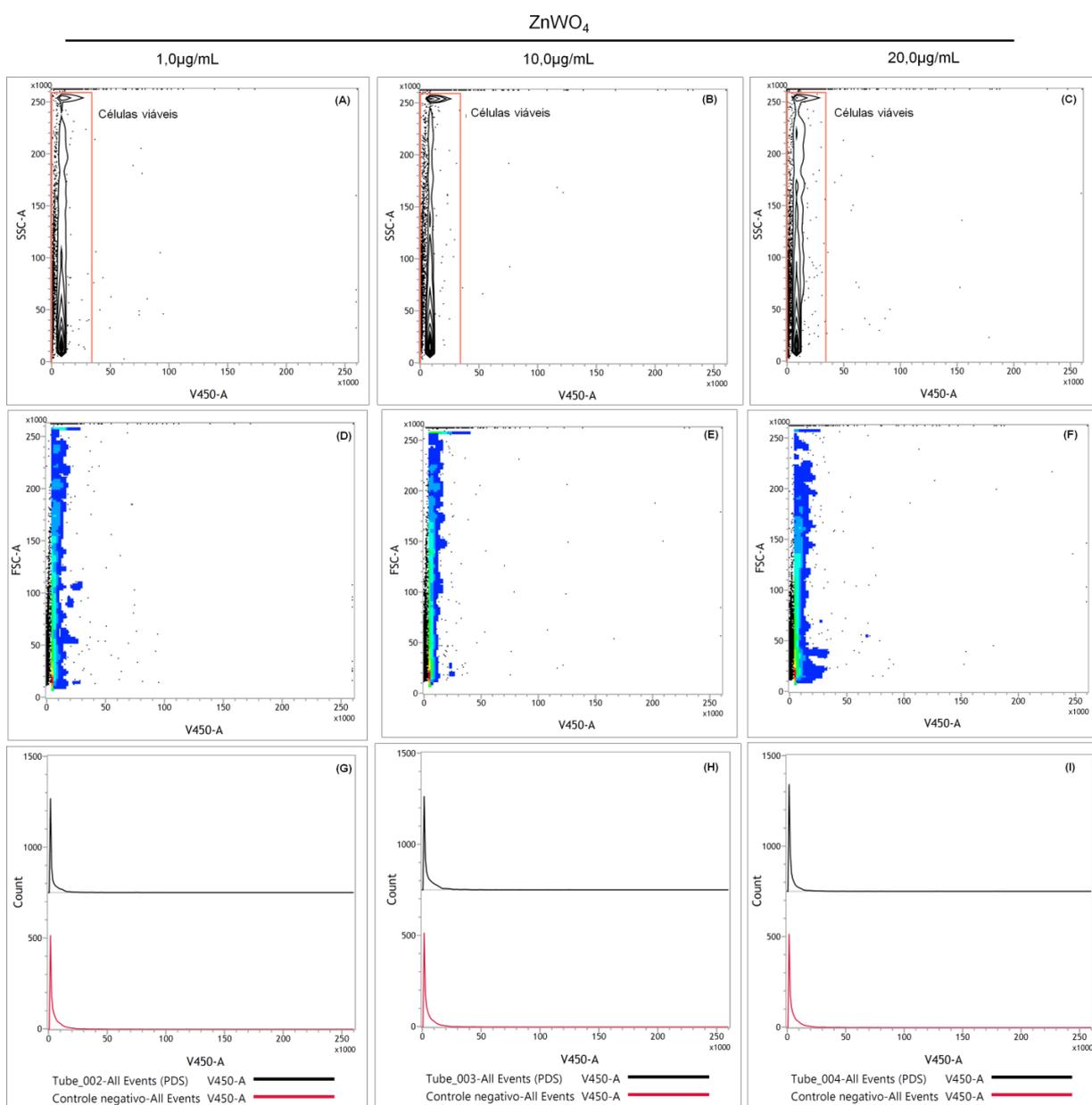
#### **2.4.3. ESTUDO DE VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO**

A Figura 33 ilustram as análises de viabilidade celular através da intensidade de absorção do fluorocromo (V450-A) por células HEK tratadas com diferentes concentrações de nanopartículas  $ZnWO_4$ . Nestas figuras, três parâmetros foram avaliados, o primeiro, SSC (sigla derivada do termo em inglês “*side scattering*”), refere-se à intensidade da luz dispersa em ângulos grandes (15 a 150°), esse parâmetro proporciona informações sobre a granulosidade e a complexidade celular. O segundo parâmetro avaliado, FSC (sigla derivada do termo em inglês “*foward scattering*”), correspondente à luz dispersa em ângulos pequenos (0,5 a 5°), proporciona informações sobre o tamanho das células analisadas, ou seja, sobre a sua integridade. E, por fim, o terceiro grupo de gráficos em forma de histograma (Fig. 3-g, h,

i), representa a intensidade de emissão do fluorocromo incorporado nas células. Todos os resultados foram plotados em função da intensidade de emissão fluorescente do fluorocromo V450 (BD FACSVeSe, 2011).

Todos os gráficos (Fig. 33) revelaram o mesmo perfil, caracterizado pela baixa intensidade de emissão do fluorocromo ( $< 10^1$ ) pelas células tratadas com diferentes concentrações de nanopartículas de tungstato de zinco, esse comportamento é típico de células viáveis, conforme observado no histograma referente ao grupo controle negativo (em vermelho) (Fig. 33-g, 33-h, 33-i).

**Figura 33** – Histogramas de viabilidade celular de células HEK, após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações de nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$ .



A:  $\text{ZnWO}_4$  1,0  $\mu\text{g/mL}$ ; B:  $\text{ZnWO}_4$  10  $\mu\text{g/mL}$ ; C:  $\text{ZnWO}_4$  20  $\mu\text{g/mL}$ , comparadas ao grupo controle negativo (PBS). Fonte: Software BD FACSuite.

A técnica de citometria de fluxo possibilita a distinção de populações celulares, nesse caso, células viáveis de células mortas, através de duas análises distintas:

- i. Através da avaliação do perfil de distribuição das células quanto aos parâmetros tamanho (FSC) e complexidade (SSC);
- ii. Com o uso de marcadores (fluorocromos) seletivos para células mortas.

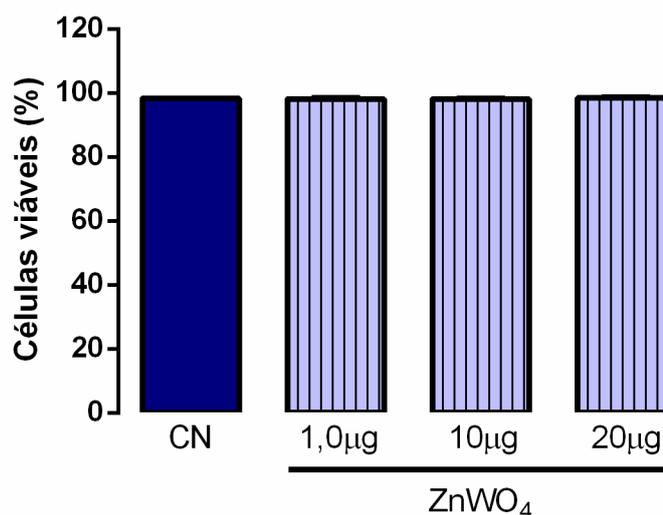
O objetivo dos estudos de citotoxicidade realizados nesse estudo foi avaliar o potencial tóxico das NPs sintetizadas em cultura de células HEK, dessa maneira o primeiro ensaio consistiu na utilização de um kit reagente (FVS450) que permite diferenciar células viáveis de células mortas. Esse fluorocromo (FVS450) reage e liga-se covalentemente às amins presentes no meio intracelular ou na superfície das células. Células em processo de necrose apresentam permeabilidade celular alterada o que favorece a difusão do corante para o seu meio intracelular e conseqüentemente a maior taxa de ligação às amins intracelulares de células em processo de morte celular do que de células viáveis impermeáveis. Células em processo de morte celular apresentam intensidade de fluorescência de 2-3 ordens de grandeza maior, em comparação às células viáveis.

Como o fluorocromo liga-se às amins presentes na membrana plasmática de células viáveis, observa-se através dos histogramas do grupo controle negativo (ilustrado em vermelho, nas figuras 33-g, 33-h, 33-i que as células viáveis apresentam baixa intensidade de fluorescência e, conseqüentemente, apenas uma população de células neste grupo experimental. Quando as células são tratadas com substâncias que podem desencadear processos que resultem em morte celular, a população de células mortas aparece nos histogramas em regiões de intensidade de fluorescência maior quando comparadas às células viáveis, contudo nesse trabalho, as concentrações testadas de NPs de tungstato de zinco não ocasionaram morte celular significativa, comparando-se com o grupo controle negativo, por esse motivo, em todos os gráficos ilustrados anteriormente, observou-se para todos os tratamentos apenas uma população bem definida de células viáveis, com baixa intensidade de emissão pelo fluorocromo.

A Figura 34 ilustra os resultados para o ensaio de citotoxicidade em forma de gráficos de barras, 24 horas após o tratamento com diferentes concentrações de nanopartículas de tungstato de zinco. As análises foram realizadas a partir da definição de um intervalo de confiança de 95% para as amostras tratadas com diferentes concentrações de  $ZnWO_4$  comparadas ao grupo controle negativo (CN), onde as células foram tratadas com o solvente tampão salina fosfato (PBS), utilizado para o preparo das suspensões de  $ZnWO_4$ . Após 24 horas de realização do tratamento de células HEK, as amostras que receberam PBS apresentaram viabilidade celular média de  $98,35 \pm 0,020$ , enquanto as amostras tratadas com  $ZnWO_4$  nas concentrações 1,0, 10 e  $20\mu\text{g/mL}$ , apresentaram viabilidade celular média de  $98,17 \pm 0,56$ ,  $98,17 \pm 0,31$ ,  $98,43 \pm 0,69$  (Fig. 34), respectivamente, dessa forma, após a análise estatística observou-se que não houve diferença significativa entre a porcentagem de células viáveis das amostras tratadas com tungstato de zinco comparadas ao grupo controle

negativo. Os dados aqui apresentados demonstraram que, após 24h, para todas as concentrações de  $\text{ZnWO}_4$  testadas, a viabilidade celular permaneceu superior a 95%.

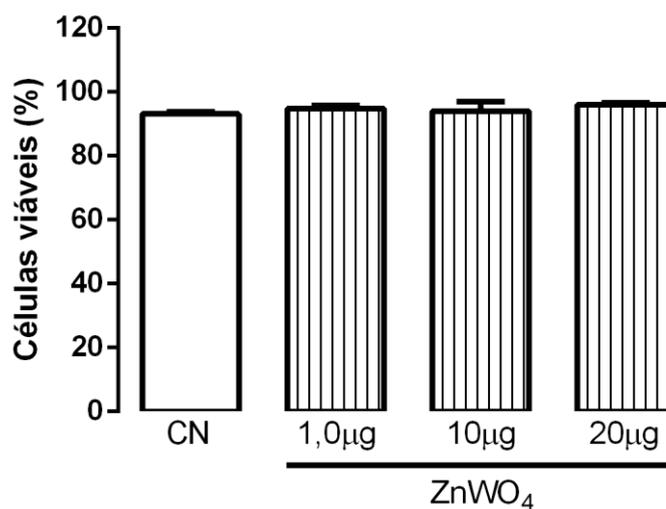
**Figura 34** – Efeitos de  $\text{ZnWO}_4$  após 24 horas, em linhagem de células HEK 293, através do ensaio de citometria de fluxo.



CN: controle negativo (PBS). As colunas representam a média  $\pm$  DP. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Bonferroni, com nível de significância  $p < 0.05$ ;  $n = 2-3/\text{grupo}$ .  
Fonte: Próprio autor.

A Figura 35 ilustra os resultados para o ensaio de citotoxicidade em forma de gráficos de barras, 48 horas após o tratamento com diferentes concentrações de nanopartículas de tungstato de zinco. As amostras que receberam PBS apresentaram viabilidade celular média de  $93,20 \pm 0,54$ , enquanto as amostras tratadas com  $\text{ZnWO}_4$  nas concentrações 1,0, 10 e 20µg/mL, apresentaram viabilidade celular média de  $94,84 \pm 0,91$ ,  $94,05 \pm 2,89$ ,  $95,99 \pm 0,66$  (Fig. 35), respectivamente, dessa forma, após a análise estatística observou-se que não houve diferença significativa entre a porcentagem de células viáveis das amostras tratadas com tungstato de zinco comparadas ao grupo controle negativo. Os dados aqui apresentados demonstraram que após 48h, para todas as concentrações de  $\text{ZnWO}_4$  testadas a viabilidade celular permaneceu superior a 90%.

**Figura 35** – Efeitos de  $ZnWO_4$  após 48 horas, em linhagem de células HEK 293, através do ensaio de citometria de fluxo.



CN: controle negativo (PBS). As colunas representam a média  $\pm$  DP. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Bonferroni, com nível de significância  $p < 0.05$ ;  $n = 2-3$ /grupo. Fonte: Próprio autor.

A interação das NPs com células dos diferentes tecidos de organismos vivos é diretamente influenciada pelas suas propriedades físicas e químicas, tais como, composição, estrutura cristalina, tamanho, carga superficial, propriedades elétricas, pKa, grau de ionização, dentre outras (DANIELSEN et al. 2014; ERNSTING et al., 2013; FOGGI et al. 2017; NAJAFI-HAJIVAR et al. 2016). Uma vez presente na circulação sanguínea de mamíferos, essas NPs podem interagir com várias macromoléculas presentes no plasma sanguíneo, como proteínas plasmáticas, por exemplo, e também com macromoléculas constituintes das células, tais como receptores, DNA, dentre outros. Adicionalmente, a interação entre NPs e essas macromoléculas depende de fatores relacionados ao organismo, dentre os quais, espécie, fatores genéticos, fatores imunológicos, estado nutricional, sexo, estado hormonal, idade, massa corpórea, estado emocional, estado patológico (DANIELSEN et al. 2014; JOHNSTON et al. 2009).

Dessa forma, os estudos de citotoxicidade, *in vitro*, em diferentes linhagens celulares podem apresentar resultados não conclusivos, uma vez que as células cultivadas isoladamente não apresentam o mesmo metabolismo, mecanismos de defesa e as mesmas interações do que aquelas apresentadas dentro de um sistema vivo (WILLIAMS, 2008), portanto, a realização de ensaios *in vitro* não exclui a necessidade de ensaios de citotoxicidade *in vivo* para a

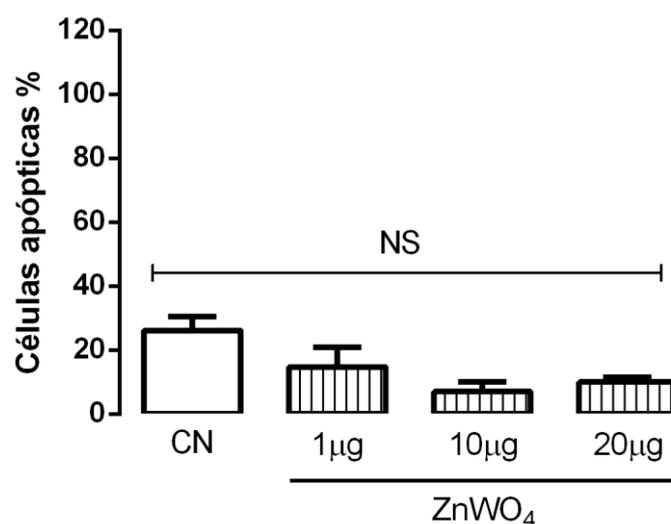
avaliação adequada do potencial tóxico de NPs com potencial para aplicações em química medicinal (HELMUS; GIBBONS; CEBON, 2008).

Diante do exposto, os resultados apresentados no ensaio de viabilidade celular, revelaram que nanopartículas de  $ZnWO_4$  (nas concentrações testadas) não promoveram efeito citotóxico na linhagem de células normais HEK, contudo, ensaios adicionais serão realizados no futuro, com o objetivo de estabelecer a  $IC_{50}$  para esse material.

#### **2.4.4. ESTUDO DE MECANISMOS DE MORTE CELULAR ATRAVÉS DA TÉCNICA DE CITOMETRIA DE FLUXO**

A Figura 36 ilustra a porcentagem de células HEK em processo de apoptose, após 48h de tratamento com diferentes concentrações de nanopartículas de  $ZnWO_4$ . Baixos percentuais de processos apoptóticos foram determinados para as células tratadas com  $ZnWO_4$  a 1,0, 10,0 e 20,0 $\mu$ g/mL ( $14,71 \pm 6,18$ ;  $7,07 \pm 3,01$  e  $10,01 \pm 1,49$ , respectivamente). Estas células foram consideradas principalmente PE-anexina V e 7-AAD negativo, uma vez que os controles negativos (células HEK-293 não tratadas) atingiram valores de  $26,12 \pm 4,45\%$  e foram considerados como apoptose basal (Fig. 36). Assim, mesmo sob diferentes concentrações de  $ZnWO_4$ , não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de apoptose, indicando um perfil de baixa toxicidade das nanopartículas nas células HEK-293. Estes resultados estão de acordo com o teste de viabilidade celular (Figuras 34 e 35), anteriormente descrito.

**Figura 36** – Efeitos de  $ZnWO_4$  sobre a apoptose em linhagem de células HEK 293, após 48 horas, através do ensaio de citometria de fluxo.



CN: Controle negativo (PBS). NS: não há diferença significativa. As colunas representam a média  $\pm$  DP. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Bonferroni, com nível de significância  $p < 0.05$ ;  $n = 2-3/\text{grupo}$ . Fonte: SANTOS et al. 2018 (adaptado).

Os resultados aqui apresentados estão de acordo com aqueles apresentados em estudo conduzido por Dong e cols. (2014), o qual demonstrou a biocompatibilidade de nanopartículas de  $MnWO_4$  em linhagem de células normais HEK 293 e tumorais A549 (células epiteliais de carcinoma pulmonar humano), para todas as concentrações testadas (8,0 a 1000µg/mL) (DONG et al. 2014). Assim como demonstrado para as NPs de tungstato de zinco obtidas nesse trabalho, esses autores também observaram níveis de viabilidade celular superiores a 90%, após o tratamento das células com concentrações crescentes das NPs, sugerindo, até o presente momento, a ausência de toxicidade para NPs de tungstato de zinco e de manganês, obtidos através do método hidrotermal assistido por micro-ondas.

## 2.5.CONCLUSÃO PARCIAL

No presente trabalho, após a condução de estudos de viabilidade celular de nanopartículas de tungstato de zinco em linhagem de células normais de rim humano, foi demonstrada a biocompatibilidade dessas NPs através de três protocolos experimentais, a análise da morfologia celular por meio da técnica de microscopia óptica, ensaio de viabilidade celular por meio da técnica de citometria de fluxo e ensaio de mecanismo de morte celular utilizando também a técnica de citometria de fluxo. Com base nos resultados aqui apresentados sugere-se que as NPs de  $ZnWO_4$  obtidas através do método hidrotermal assistido por micro-ondas podem ser utilizadas com segurança em estudos conduzidos *in vivo*.

## Capítulo 3

**Estudo das propriedades biológicas, *in vivo*, de nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub>**

CARLA JÚNIA SANTOS<sup>1</sup>; JANAÍNA DE ALCÂNTARA LEMOS<sup>2</sup>; ANDRÉ LUIS  
BRANCO DE BARROS<sup>2</sup>; ARMANDO DA SILVA CUNHA JUNIOR<sup>2</sup>; DANIEL  
CRISTIAN FERREIRA SOARES<sup>1</sup>; FRANCISCO MOURA FILHO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ CAMPUS DE ITABIRA.

<sup>2</sup> – UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS.

## RESUMO

O câncer é um importante problema de saúde pública mundial, com elevada mortalidade e morbidade associadas. Após quase 70 anos da concepção da quimioterapia do câncer, poucos avanços foram observados, de maneira que os pacientes ainda sofrem com problemas relacionados à baixa seletividade e à elevada toxicidade do tratamento. Visando resolver esse problema, nanopartículas de óxidos metálicos foram propostas como estratégia seletiva em técnicas que envolvem simultaneamente a terapia e o diagnóstico do câncer, devido às propriedades exclusivas dos materiais nanoestruturados que permitem a incorporação de moléculas diversas em sua superfície e à sua capacidade de bioacumulação em tecidos tumorais, devido ao efeito EPR. Nesse contexto, o objetivo do presente capítulo foi descrever e discutir os estudos sobre o perfil de biodistribuição de nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  radiomarcadas com o radioisótopo tecnécio<sup>99</sup> metaestável ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), em animais sadios e com tumor induzido, assim como verificar se as NPs acumulam-se nos vasos sanguíneos tumorais e apresentam atividade anti-angiogênica. Ensaio de biodistribuição das nanopartículas radiomarcadas com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  foram realizados em camundongos Balb/C sadios e com tumor de Ehrlich. Além disso, o potencial anti-angiogênico das nanopartículas de tungstato de zinco foi investigado através do ensaio de membrana corioalantóica (MCA) utilizando ovos de galinha fertilizados. As amostras de tungstato de zinco apresentaram efeito anti-angiogênico em baixas doses no modelo de MCA. Os resultados do ensaio de radiomarcção revelam a formação de complexos  $^{99\text{m}}\text{Tc-ZnWO}_4$  estáveis em meio biológico por até cerca de 24 horas, enquanto o ensaio de depuração sugere rápida eliminação plasmática do complexo. Os resultados do ensaio de biodistribuição revelam intensa captação do complexo por órgãos responsáveis pela eliminação de substâncias exógenas (baço, fígado e pulmão) e também revelam ampla eliminação através da via renal para esse material. Por fim, estudos conduzidos com animais com tumor de Ehrlich revelaram que as NPs de  $^{99\text{m}}\text{Tc-ZnWO}_4$  foram significativamente captadas pelo tumor. Juntos os resultados sugerem que nanopartículas de tungstato de zinco poderiam concentrar-se eficazmente nos capilares tumorais facilitando a ação de outras drogas e permitindo de maneira simultânea, ao tratamento, o diagnóstico de imagem de tumores sólidos.

### 3.1.INTRODUÇÃO

#### 3.1.1. CÂNCER E NANOMATERIAIS

O câncer é um problema de saúde pública mundial, especialmente nos países em desenvolvimento, uma vez que apresenta elevada morbidade e taxa de mortalidade (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2014). Pode ser definido como um conjunto de mais de 100 doenças de elevada complexidade anatomo-fisiológicas, cuja patogenia caracteriza-se pelo crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos. Com o crescimento acelerado, essas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, os quais, em geral, resultam em prejuízo do funcionamento do tecido acometido além de poderem espalhar-se para outras regiões do corpo (BRASIL, 2015).

Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) o número de novos casos da doença no Brasil, biênio 2016-2017, poderá chegar a cerca de 600.000 (BRASIL, 2015). A estimativa mundial, realizada em 2012, apontou que, dos 14 milhões de casos novos estimados, mais de 60% ocorreram em países em desenvolvimento. Para a mortalidade, a situação agrava-se quando se constata que, dos 8 milhões de óbitos previstos, 70% ocorreram nesses mesmos países (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2014).

Esse grupo de doenças pode ser dividido em dois sub-grupos, os tumores sólidos, que acometem órgãos e tecidos, e as leucemias, que acometem sangue e medula óssea. Dentro da classe dos tumores sólidos, tem-se os carcinomas, que ocorrem na pele e em órgãos internos; os sarcomas acometem o tecido ósseo, cartilagem tecido adiposo, músculo e outros tecidos conectivos; e os cânceres do sistema nervoso central, com comprometimento do encéfalo e medula espinhal. Para cada tipo de câncer, há protocolos clínicos que definem a associação de terapias para garantir o sucesso do tratamento.

O início da terapia anticancerígena foi marcado por procedimentos locais altamente invasivos, como cirurgia para remoção do tecido doente e radioterapia. Atualmente o tratamento, na maioria das vezes, ainda se baseia na remoção cirúrgica do tumor seguido de radioterapia ou quimioterapia multimodal, ou seja, administração de um coquetel de fármacos com mecanismos de ação diferentes visando eliminar de forma significativa as células tumorais e minimizar a resistência dessas células a essas drogas (CHABNER et al., 2010, p. 1185; BEIK et al., 2016).

Após quase 70 anos da concepção da quimioterapia do câncer, poucos avanços são observados quanto a seletividade e eficácia dos fármacos utilizados, o que implica em consequências clínicas importantes, dentre as quais se destacam a grande quantidade de efeitos adversos que o tratamento ocasiona para os pacientes e a ineficácia da terapia. Dessa maneira, além de a quimioterapia ser significativamente debilitante, o paciente diagnosticado com câncer, muitas vezes apresenta prejuízo em sua qualidade de vida e redução relevante da expectativa de vida. Diante destes dados impactantes, é urgente o planejamento e a avaliação de ações eficazes de prevenção e controle do câncer.

Devido a grande variabilidade das respostas dos tumores perante os tratamentos disponíveis e em fase de pesquisa, algumas técnicas estão sendo aprimoradas com o objetivo de tratar de maneira mais seletiva e minimamente invasiva o câncer, uma delas é a imunoterapia, cujos pesquisadores que contribuíram de maneira expressiva para seu desenvolvimento receberam o Nobel de Medicina e Fisiologia de 2018 e a outra é a técnica de hipertermia a partir da administração de nanopartículas direcionadas aos tumores sólidos (SHI et al. 2016).

É notável que nas duas últimas décadas é crescente o desenvolvimento de pesquisas que propõem a combinação de duas ou mais propriedades em um único sistema nanoestruturado. Estes novos sistemas fundamentam-se no uso simultâneo de propriedades que permitem o diagnóstico, a liberação controlada de drogas citotóxicas já disponíveis no mercado ou a ativação remota de nanopartículas citotóxicas a partir de técnicas de hipertermia, ou seja, é o início de uma nova era da terapia antitumoral, a qual será o resultado da união de compostos orgânicos, representados pelos lipossomas multifuncionais ou outros veículos poliméricos de liberação de drogas, com compostos inorgânicos, as NPs de metais ou óxidos semicondutores, que conferem as propriedades físicas necessárias à eficácia dessa nova modalidade de tratamento (CHOI et al. 2012; DA PAZ et al. 2012; JUNG et al. 2013; KWON et al. 2017; LI et al. 2015; SEO et al. 2018; SHUBAYEV; PISANIC; JIN, 2009; SMITH et al. 2007; OLERILE et al. 2017; WU et al. 2017; ZHU et al. 2009).

Estes sistemas multifuncionais, direcionados seletivamente a tumores sólidos, permitem que procedimentos de diagnóstico e/ou terapia possam ser conduzidos de forma simultânea e minimamente invasiva com resultados mais efetivos e menor incidência de efeitos adversos. Adicionalmente, representam uma alternativa eficaz para a resolução de grandes problemas associados à quimioterapia, tais como, baixa seletividade e elevada toxicidade das drogas disponíveis no mercado, e ainda, representam uma esperança para contornar a

multirresistência que os tumores apresentam perante essas drogas (CALDERÓ et al. 2017; KAPSE-MISTRY et al. 2014; KOLLURU et al. 2013; SHAPIRA et al. 2011).

A terapia do câncer baseada no uso de nanopartículas chama a atenção da comunidade científica devido a ocorrência de mudanças na permeabilidade vascular do tecido tumoral que favorecem o acúmulo de NPS no interior do tecido, a esse efeito dá-se o nome de aumento da permeabilidade e retenção (EPR). Em condições normais, nanopartículas não possuem a capacidade de atravessar o espaço entre as células endoteliais dos vasos sanguíneos de diversos tecidos, contudo em tecidos inflamados, ocorre o aumento do espaço intercelular com consequente aumento da permeabilidade vascular, como consequência observa-se o aumento do acúmulo de NPs em tecidos acometidos por inflamação, dentre os quais o tecido tumoral (KHAWAR; KIM; KUH et al. 2015; MAEDA et al. 2000; PEER et al. 2007).

Além disso, nanopartículas despertam o interesse de pesquisadores para aplicações em química medicinal, a partir de uma perspectiva física, uma vez que o tamanho reduzido permite uma interface direta com a maioria dos componentes celulares e a elevada razão superfície/volume permite que a sua superfície seja funcionalizada com drogas citotóxicas, com corantes que emitem na região do infravermelho próximo do espectro eletromagnético, com moléculas fluorescentes ou com radioisótopos possibilitando a produção de sistemas multifuncionais aplicáveis em terapia e/ou diagnóstico do câncer (LEE et al. 2018; SEO et al. 2018; SMITH et al. 2007; WU et al. 2017).

Assim, nas duas últimas décadas, várias pesquisas são direcionadas ao estudo das propriedades, *in vitro* e *in vivo*, de sistemas multifuncionais nanoestruturados como candidatos para aplicação em teranóstico do câncer, incluindo sistemas radiomarcados.

### **3.1.2. RADIOISÓTOPOS E CÂNCER**

Nos últimos 30 anos, a utilização de radioisótopos como auxiliares no diagnóstico do câncer e de outras doenças, em nível de pesquisas e na prática clínica, tem atraído o interesse de vários pesquisadores devido às suas excelentes propriedades físicas e químicas e à possibilidade de produção de sistemas multifuncionais cada vez mais específicos para determinadas doenças e tumores, além de permitirem o acompanhamento em tempo real de alterações fisiológicas no tumor alvo de terapia citotóxica. Atualmente, existem aproximadamente 30 desses compostos sendo utilizados em medicina nuclear (ARAÚJO, 2005; MARQUES; OKAMOTO; BUCHPIGUEL, 2001; PAPAGIANNPOULOU, 2017).

Radionuclídeos ou radioisótopos são elementos radioativos que atuam como ferramentas importantes no diagnóstico de imagem e até mesmo na terapia de algumas doenças. Na prática clínica, radioisótopos que emitem radiação gama são utilizados em quantidade traço com o propósito de diagnosticar doenças, como câncer, infecções, trombose, anormalidades hepáticas e renais e desordens cardíacas e neurológicas. O uso da radiação gama consiste em um método seguro devido às características físicas desse tipo de radiação, a qual, embora apresente grande penetrabilidade nos tecidos, possui baixo poder de ionização, o que torna a técnica de cintilografia segura para aplicações em animais de experimentação e em humanos (ANDERSON; WELCH, 1999; de BARROS et al. 2012; JURISSON; CUTLER; SMITH, 2008; ODA et al. 2017).

Atualmente, radionuclídeos emissores de radiação gama, tais como o tecnécio<sup>99m</sup>, iodo<sup>123</sup>, índio<sup>1</sup>, galio<sup>67</sup> e o tálio<sup>201</sup>, entre outros, são utilizados na produção de radiofármacos para o diagnóstico de doenças. Os radiofármacos são formados por um radioisótopo ligado a uma substância química de interesse capaz de ligar-se especificamente a um tecido alvo. Uma vez administrado ao paciente, o radiofármaco deposita-se no órgão ou tecido alvo e imagens podem ser adquiridas a partir da detecção da radiação proveniente do paciente, utilizando-se equipamentos apropriados. Trata-se de um procedimento não invasivo, que possibilita avaliações anatômicas, morfológicas e funcionais (ANDERSON; WELCH, 1999; ARAÚJO, 2005; MONTEIRO et al. 2018; PAPAGIANNPOULOU, 2017; PHILLIPS, 1999).

Dentre os radioisótopos utilizados atualmente, o tecnécio metaestável é o mais utilizado, pois se destaca por suas excelentes propriedades físicas e químicas, sua meia-vida de cerca de 6 horas, decaimento por emissão de radiação gama pura, com fótons de 140keV, seu baixo custo, disponibilidade, rapidez e facilidade na obtenção de complexos radiomarcados. Além disso, devido aos seus vários estados de oxidação, possibilita a formação de complexos estáveis com diferentes números de coordenação, com diversos ligantes orgânicos ou inorgânicos (ARMSTRONG; VALLIANT, 2010; PAPAGIANNPOULOU, 2017).

Vários estudos revelam que nanopartículas formam sistemas estáveis com radioisótopos, dentre os quais o tecnécio, e sugerem que os complexos formados constituem excelente ferramenta para estudos de biodistribuição de nanopartículas em animais sadios e também em estudos que visam avaliar a bioacumulação de NPs em tumores (BERTRAND et al. 2017; DE BARROS et al. 2015; MONTEIRO et al. 2017; 2018; ODA et al. 2017). Nesse ínterim, nesse trabalho, propôs-se a produção de nanopartículas radiomarcadas com tecnécio 99 metaestável (<sup>99m</sup>Tc), com o objetivo de avaliar o perfil de biodistribuição de NPs de tungstato de zinco em animais sadios e com tumor de Ehrlich.

### 3.1.3. ANGIOGÊNESE

A terapia anti-angiogênica baseada no uso de materiais nanoestruturados constitui outra área que desperta bastante interesse dos pesquisadores interessados em estratégias eficazes de controle do crescimento de tumores (GHALAMFARSA et al. 2018; KIM, M. et al. 2017; MAJUMDER; BHUNIA; CHAUDHURI, 2018; TIAN et al. 2018; SATAPATHY et al. 2018; YAN et al. 2018; ZHANG et al. 2017;. ZHENG et al. 2017).

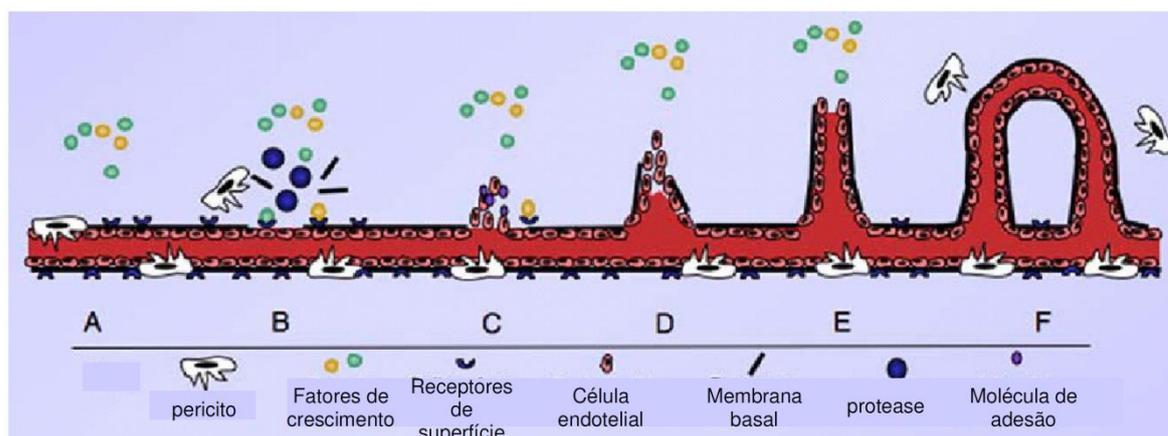
A angiogênese, termo cunhado pela primeira vez em 1935, para descrever o crescimento de novos vasos na placenta (HERTIG, 1935), é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir da vasculatura pré-existente. A ocorrência desse processo de maneira fisiológica, durante a reprodução, desenvolvimento e reparo de feridas, caracteriza-se pelo tempo de duração limitado, podendo durar dias (ovulação), semanas (reparo de feridas) ou meses (desenvolvimento embrionário), enquanto a angiogênese patológica, que ocorre durante algumas condições de inflamação e hipóxia, pode durar anos (CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001; FOLKMAN, 2007). O processo desenvolve-se através da interação entre células endoteliais, matriz celular, células periendothelias (células musculares lisas e pericitos) e estromais e é regulado por uma série de fatores pró e anti-angiogênicos (CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001).

Historicamente, os primeiros fatores de crescimento descritos foram os fatores básico e ácido de crescimento de fibroblastos (FCFB, FCFA, respectivamente) e o fator de crescimento de células endoteliais, atualmente denominado fator de crescimento do endotélio vascular (FCEV). Hoje, são conhecidos diversos fatores de crescimento pró-angiogênicos, os quais modulam a angiogênese, basicamente, através de dois mecanismos, diretamente através da ativação das células endoteliais, estimulando a sua locomoção e a ocorrência de mitoses ou indiretamente através do recrutamento e ativação de outros tipos celulares que liberam fatores de crescimento, tais como macrófagos, plaquetas e células tumorais (FOLKMAN; KLAGSBRUN, 1987; FOLKMAN, 2007).

Alguns mecanismos são propostos para explicar a angiogênese, mas o modelo atual que permite uma melhor compreensão sobre esses mecanismos sugere que a partir de estímulos promovidos pelos fatores pró-angiogênicos, as células endoteliais tornam-se móveis, invasivas e emitem filopódios, que consistem em projeções citoplasmáticas finas, assim as células endoteliais ativadas iniciam a formação de ramificações a partir da vasculatura de origem. As células que conduzem a formação da ramificação são chamadas de células de ponta, enquanto as células de talo, as quais emitem menos filopódios, organizam-se em torno

do lúmen da vasculatura em formação e proliferam-se para originar os novos vasos. As células de ponta anastomosam-se com brotos vizinhos ativados para formar a rede de novos vasos (Figura 37). O processo de ramificação finaliza-se quando ocorre diminuição dos fatores pró-angiogênicos (POTENTE; GERHARDT; CARMELIET, 2011).

**Figura 37** – Etapas da angiogênese.



A: Fatores pró-angiogênicos são liberados nas proximidades dos capilares. B: Os fatores de crescimento desencadeiam uma cascata de sinalização ao se ligarem em seus receptores expressos nas células endoteliais. Proteases são secretadas e iniciam a degradação da membrana basal, como consequência células perivasculares de suporte tais como pericitos e células de músculo liso dissociam-se do vaso. C: As células endoteliais ativadas movem-se a partir da lesão da membrana basal, proliferam-se e migram em direção ao estímulo angiogênico. D e E: O broto capilar continua seu crescimento e quando a região proximal ao vaso parental atinge a maturação forma-se uma nova membrana basal. F: Pontas de brotos vizinhos tocam-se e anastomosam-se para formar um vaso através do qual o sangue começa a fluir. O recrutamento de pericitos completa a formação de um novo capilar funcional. Fonte: Jones; Sleeman, 2006 (adaptado).

Em indivíduos normais, os níveis dos fatores reguladores pró e anti-angiogênicos apresentam-se em equilíbrio (POTENTE; GERHARDT; CARMELIET, 2011; RISSAU, 1997). No entanto, esse equilíbrio pode ser perturbado por fatores químicos ou físicos tais como, injúria tissular, hipóxia, alteração na liberação de citocinas e de fatores de crescimento, alterações do fluxo sanguíneo e da forma celular, desencadeando atividade pró-angiogênica ou anti-angiogênica (OTROCK et al. 2007).

O aumento de fatores anti-angiogênicos pode ocorrer em doenças isquêmicas, como infarto do miocárdio, em doenças neurodegenerativas e na obesidade, enquanto o aumento dos fatores pró-angiogênicos, pode ocorrer em doenças inflamatórias, como artrite reumatoide e aterosclerose, em cânceres malignos e em doenças oculares, como retinopatia diabética (CARMELIET, 2003; FOLKMAN, 2007).

A importância da angiogênese no câncer e em outras doenças foi demonstrada a partir da década de 1960, após uma série de pesquisas pioneiras coordenadas pelo pesquisador Judah Folkman (1933-2008), o qual demonstrou, inicialmente, que o crescimento dos tumores sólidos depende da angiogênese (FOLKMAN; LONG; BECKER, 1963; FOLKMAN; COLE; ZIMMERMAN, 1966; FOLKMAN, 2001; HANAHAN; WEINBERG, 2000). Naquela época, evidências experimentais levantaram a hipótese de que havia um fator responsável pela angiogênese dos tumores sólidos, o fator de angiogênese tumoral (FAT) (FOLKMAN et al. 1971a) o que desencadeou uma série de pesquisas visando a descoberta e ou desenvolvimento de drogas que o inibissem, como estratégia seletiva para o tratamento do câncer.

Os avanços das pesquisas sobre o papel da angiogênese no câncer permitiram elucidar que a angiogênese não é crucial apenas para o crescimento dos tumores sólidos, mas participa ativamente da patogenia da doença, contribuindo para sinais e sintomas característicos, como hemorragia, trombose, anemia, ascite abdominal, dor óssea, os quais muitas vezes são incapacitantes e podem levar o paciente a óbito. Como consequência, embora alguns fármacos anti-angiogênicos já tenham seu uso aprovado por agências de regulamentação nacionais e internacionais, ainda há um interesse imenso da indústria farmacêutica e de pesquisadores de todo o mundo no desenvolvimento de fármacos anti-angiogênicos mais seletivos ao tecido tumoral e, portanto, menos tóxicos aos outros tecidos (FOLKMAN, 2007).

Alguns fármacos que atuam seletivamente sobre o processo de angiogênese são aprovados para uso clínico, especialmente aqueles que inibem alguma etapa do processo modulada pelo VEGF, fator de crescimento cujos níveis estão aumentados em várias doenças dependentes de angiogênese (AIELLO et al. 1994; SATCHI-FAINARO et al. 2005). Anticorpos monoclonais anti-VEGF foram aprovados pela agência reguladora norte americana *Food and Drug Administration* (FDA), o bevacizumabe (Lucentis®) aprovado em 2004 para o tratamento de câncer colorretal e em 2006 para a terapia de câncer de pulmão e o ranibizumabe, fragmento do bevacizumabe (Avastin®) aprovado em 2006 para o tratamento de degeneração macular. Outros fármacos anti-angiogênicos foram aprovados para o tratamento de câncer, como erlotinibe (câncer de pulmão), bortezomibe e talidomida (mieloma múltiplo), sorafenibe e sunitinibe para câncer renal, dentre outros (FOLKMAN, 2007).

Recentemente, as propriedades antiangiogênicas de NPs de metais e óxidos semicondutores foram demonstradas, *in vivo* e *in vitro* (DIVYA et al. 2018; GURUNATHAN et al. 2009; KALISHWARALAL et al. 2011). Kalishwaralal e cols. (2009) demonstraram, *in vitro*, que NPs de prata apresentaram efeito inibitório sobre etapas cruciais da angiogênese

moduladas pelo VEGF, como a proliferação e a migração de células endoteliais. Em outro trabalho os mesmos pesquisadores demonstraram os efeitos antiangiogênicos das NPs de prata em um modelo animal de angiogênese e ainda sugeriram que tais efeitos são devidos à inibição da via de sinalização PI3K/Akt induzida por VEGF, de maneira concentração dependente (GURUNATHAN et al. 2009).

Adicionalmente, além da demonstração de atividade antiangiogênica de algumas NPs, nos últimos anos, sistemas nanoestruturados multifuncionais foram propostos visando a reunião em um único sistema de propriedades que possibilitam simultaneamente o diagnóstico de imagem, a liberação controlada de drogas citotóxicas e antiangiogênicas em tumores sólidos (GHALAMFARSA et al. 2018; KIM, M. et al. 2017; MAJUMDER; BHUNIA; CHAUDHURI, 2018; TIAN et al. 2018; SATAPATHY et al. 2018; YAN et al. 2018; ZHANG et al. 2017;. ZHENG et al. 2017) e outras doenças (PONT et al. 2018) onde a angiogênese constitui importante alvo de ação de drogas. Diante do exposto, propôs-se avaliar nesse trabalho a hipótese de que nanopartículas de tungstato de zinco poderiam se tornar uma terapia inovadora para deter a progressão de tumores sólidos devido a atividade antiangiogênica, possibilitada pelo efeito EPR.

### 3.2. OBJETIVO GERAL

Investigar o comportamento de nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  em modelos animais de biodistribuição e de angiogênese.

#### 3.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar a radiomarcção de NPs de  $\text{ZnWO}_4$  com Tecnécio 99 metaestável ( $\text{Tc-}^{99\text{m}}$ );
- b) Estudar, *in vivo*, a estabilidade da radiomarcção dos complexos  $^{99\text{m}}\text{Tc-ZnWO}_4$  em presença de plasma de camundongo e solução salina;
- c) Avaliar, *in vivo*, a depuração plasmática dos complexos  $^{99\text{m}}\text{Tc-ZnWO}_4$  em camundongos saudáveis e com tumor de Ehrlich implantado;
- d) Realizar estudos de biodistribuição, *ex vivo*, dos complexos  $^{99\text{m}}\text{Tc-ZnWO}_4$  em camundongos saudáveis e com tumor de Ehrlich implantado;
- e) Obter imagens cintilográficas, *in vivo*, dos complexos  $^{99\text{m}}\text{Tc-ZnWO}_4$ ;
- f) Estudar, *in vivo*, a atividade antiangiogênica das NPs de  $\text{ZnWO}_4$  através do modelo de membrana corioalantoica de embrião de galinha (MCA).

### 3.3.MATERIAIS E MÉTODOS

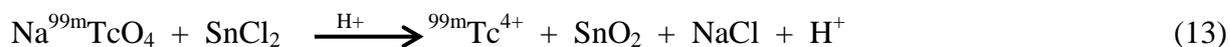
#### 3.3.1. PREPARO E MARCAÇÃO DO COMPLEXO $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$

Inicialmente, foram pesadas 20mg das NPs de  $\text{ZnWO}_4$ , obtidas a  $120^\circ\text{C}$ , as quais foram dispersas em 10mL de água ultrapura com auxílio de um ultrassom de alta frequência (CPX 500, Cole-Palmer Instruments, Vernon Hills, EUA), durante 30 minutos e em banho de gelo. A amostra preparada foi colocada no banho de ultrassom por 20 minutos para desaglomeração e logo após, o tubo foi deixado em repouso durante 10 minutos para a decantação das nanopartículas maiores.

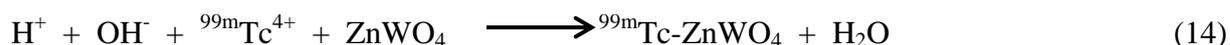
Para a radiomarcção, uma alíquota de  $100\mu\text{L}$  da amostra após a decantação foi colocada em um frasco. Foram adicionados  $200\mu\text{L}$  da solução de cloreto estano em HCl  $0,25\text{M}$  ( $1\text{mg/mL}$ ). O pH foi ajustado para 7,0 com solução de hidróxido de sódio  $1,0\text{M}$ . O frasco foi lacrado e realizou-se vácuo. Em seguida, foram adicionados  $100\mu\text{L}$  de pertecnetato de sódio ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ). A mistura reagente foi mantida em temperatura ambiente por 15 min. O conteúdo foi transferido para um tubo Eppendorf®, o frasco foi lavado com  $500\mu\text{L}$  de cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$  0,9% p/v) e, em seguida, centrifugado a  $10.000 \times g$ , por 10 min, para purificação da amostra. O sobrenadante foi separado do sólido formado, coletado e transferido para outro tubo Eppendorf®. Foram adicionados  $500\mu\text{L}$  de solução de  $\text{NaCl}$  0,9% (p/V) no tubo Eppendorf®, contendo o sólido, o qual foi levado ao banho de ultrassom para completa ressuspensão da amostra. As reações envolvidas no preparo do complexo  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  estão descritas a seguir:

## REAÇÃO DE COMPLEXAÇÃO

### Etapa I:



### Etapa II:



### 3.3.2. PUREZA RADIOQUÍMICA

Para a determinação do rendimento da marcação, foi utilizado o método de cromatografia de camada delgada (CCD). Uma pequena alíquota da suspensão preparada, conforme descrito no item anterior, foi aplicada a 1cm da base da placa cromatográfica de papel Whatman® 3 (fase estacionária) e arrastada pela fase móvel (metiletilcetona) para determinação de tecnécio livre ( ${}^{99\text{m}}\text{TcO}^{4-}$ ). O óxido de tecnécio ( ${}^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ ) foi removido da preparação por centrifugação, em 10.000 x g por 10 minutos. Após secagem, as fitas foram cortadas na metade e a porcentagem da pureza foi obtida por meio do cálculo de porcentagem de impureza radioquímica (equações 15 e 16). A radioatividade presente nas tiras de cromatografia foi determinada por um contador gama (Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter, PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, EUA).

$$\% {}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- = \frac{\text{Radioatividade da região superior da tira de papel}}{\text{Radioatividade da região inferior da tira de papel}} \times 100 \quad (15)$$

$$\% {}^{99\text{m}}\text{TcO}_2 = \text{Radioatividade sobrenadante} - \% {}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^- \quad (16)$$

Para a determinação da pureza radioquímica foi calculado o teor de  ${}^{99\text{m}}\text{TcO}^{4-}$  formado após a marcação e, o teor de  ${}^{99\text{m}}\text{TcO}_2$  após o processo de centrifugação, utilizando a Equação 17:

$$\% \text{Pureza radioquímica} = 100 - (\% \text{TcO}_4^- + \% \text{TcO}_2) \quad (17)$$

Através da diferença entre os resultados obtidos da porcentagem de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  e de marcação, foi possível determinar a quantidade de  $^{99m}\text{TcO}_2$  produzido durante a reação de complexação.

### **3.3.3. ESTABILIDADE DA RADIOMARCAÇÃO *IN VITRO***

#### **3.3.3.1. ESTABILIDADE DA RADIOMARCAÇÃO EM SOLUÇÃO NaCl 0,9% (p/v)**

A estabilidade, *in vitro*, do complexo de nanopartículas de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  formado após o processo de radiomarkação também foi avaliada através de CCD, em presença de solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v), a temperatura ambiente. As alíquotas foram retiradas nos tempos de 1, 2, 4, 6 e 24 horas para análise da pureza radioquímica e do teor de impurezas, conforme descrito anteriormente.

#### **3.3.3.2. ESTABILIDADE DA RADIOMARCAÇÃO EM PLASMA *IN VITRO***

Para obtenção do plasma, foi coletado um volume (aproximadamente 1mL) de sangue de camundongos Balb/C sadios e colocado em um tubo Eppendorf® contendo anticoagulante. Os tubos foram centrifugados a 10.000 x g por 10 min para que houvesse a separação do plasma dos demais elementos sanguíneos. Para cada 1mL de plasma foram adicionados 100µL da amostra contendo  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$ . A amostra foi mantida sob agitação, a 37°C. Foram retiradas alíquotas nos tempos de 1, 2, 4, 6 e 24 horas e aplicadas na placa de CCD, para avaliação da pureza radioquímica, conforme descrito anteriormente.

### **3.3.4. ESTUDOS EM ANIMAIS**

Todos os experimentos realizados em animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA) por meio do protocolo nº 376/2016 (Anexo A). Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas, com peso corpóreo entre 20 a 25g, adquiridos e mantidos no biotério da Faculdade de Farmácia (FaFar) da UFMG, com livre acesso à água e comida, sob ciclo claro-escuro de 12 h (início às 7:00 h) e temperatura controlada ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

### 3.3.5. DEPURAÇÃO PLASMÁTICA

Alíquotas de 100µL da suspensão contendo o complexo  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  foram injetadas pela veia caudal de camundongos saudáveis. Foi realizada uma incisão na cauda dos animais e o sangue (aproximadamente 20µL) foi coletado, em tubos previamente pesados, nos tempos de 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360, 480 e 1440 min após a administração do complexo marcado. Os tubos foram levados ao contador gama (PerkinElmer Wallac Wizard 1470-020 Gamma Counter, PerkinElmer Inc., Waltham, EUA) para a determinação da radioatividade. Uma alíquota padrão contendo a mesma quantidade de radioatividade injetada nos animais foi contada simultaneamente em um tubo separado, para corrigir os cálculos pelo decaimento físico do  $^{99m}\text{Tc}$ . Os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama de sangue (%DI/g), calculada conforme descrito na Equação 18.

$$\% \text{DI/g} = \frac{\text{cpm/g de tecido}}{\text{cpm da atividade padrão}} \times 100 \quad (18)$$

Estes dados foram utilizados para construir uma curva de depuração sanguínea onde foi possível determinar o tempo de meia-vida de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$ , utilizando-se o software GraphPad Prism 5.

### 3.3.6. ESTUDOS EX VIVO DE BIODISTRIBUIÇÃO DE $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$ EM ANIMAIS SADIOS E COM TUMOR DE EHRLICH

Dois experimentos independentes foram conduzidos, o primeiro para animais saudáveis e o segundo para animais com tumor de Ehrlich implantado na coxa posterior direita. Cada grupo de animais (saudáveis ou com tumor) foi dividido em dois grupos, cada um, inicialmente contendo 8 animais, sendo que foi injetado, em cada animal, 100µL das NPs de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  com aproximadamente 3,7 MBq de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  para o primeiro grupo (1 hora) e 11,1 MBq de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  para o segundo (4 horas). Após os tempos de 1 hora e 4 horas, os animais foram anestesiados com solução de Ketamina na dose de 80 mg/Kg (Dopalen® 10%, Vetbrands Agroline - Campo Grande, Brasil) e Xylazina na dose de 15 mg/Kg (Dopaser® 2%, Hertape Calier - Juatuba, Brasil) e, em seguida, submetidos à eutanásia. Órgãos e tecidos como: fígado, baço, rins, estômago, coração, pulmão, tireoide, intestino delgado, intestino grosso, cérebro, músculo e tumor, foram retirados, pesados e levados ao contador gama para

determinação da radioatividade, juntamente com um padrão contendo a mesma quantidade de radioatividade injetada nos animais, para corrigir os cálculos pelo decaimento físico do  $^{99m}\text{Tc}$ . Os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama (%DI/g) e calculados conforme descrito na Equação 19:

$$\%DI/g = \frac{\text{cpm/ g de tecido} \times 100}{\text{cpm da atividade padrão}} \quad (19)$$

### **3.3.7. IMAGENS CINTILOGRÁFICAS EM ANIMAIS SADIOS E COM TUMOR DE EHRLICH**

Para a obtenção das imagens, é necessário injetar uma quantidade mínima de radioatividade para que haja uma captação que seja capaz de gerar uma imagem com qualidade. Portanto, as imagens foram feitas nos animais do segundo grupo, os quais receberam uma dose de radiação maior que o primeiro, nos tempos de 1 e 4 horas após a administração do complexo radiomarcado. Os camundongos foram anestesiados e mantidos em posição de decúbito ventral sob a gama-câmara (Nuclide<sup>TM</sup> TH 22, Mediso, Hungria). Uma janela de 20% simétrica foi utilizada para um pico de energia fixo de 140keV. As imagens foram obtidas e armazenadas em uma matriz 256 x 256, por 300 segundos cada.

### **3.3.8. ESTUDOS COM ANIMAIS CONTENDO TUMOR DE EHRLICH**

Para a realização de estudos com animais contendo tumor sólido de Ehrlich, inicialmente as células tumorais, armazenadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas a temperatura ambiente. Em seguida, cerca de 100 $\mu\text{L}$  das células de Ehrlich foram injetadas, por via intraperitoneal, em camundongos BALB/c. Os animais foram mantidos no biotério por dez dias, sem restrição de água e ração. Após esse período, os camundongos foram anestesiados com solução de Ketamina (80 mg/Kg) e Xylazina (15 mg/Kg), o líquido ascítico foi retirado e colocado em um tubo cônico de centrífuga estéril. O líquido ascítico foi centrifugado a 5000rpm por 5 min, o sobrenadante foi retirado e o sedimento foi ressuspensão com solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v). Após esse processo, uma alíquota das células foi corada com solução de Tripán 0,4% e contada em microscópio, com aumento de 400x, com o

auxílio de uma câmara de Neubauer, e a concentração foi calculada de acordo com a Equação 20:

$$\text{N}^\circ \text{ células/mL} = X \times \text{FD} \times 10^4 \quad (20)$$

Onde, X é a média do número de células contadas nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer e FD é o fator de diluição utilizado.

Após a contagem, as células foram diluídas para uma concentração de  $1 \times 10^7$  células/mL. O volume igual a  $100 \mu\text{L}$  da suspensão dessas células foi implantado, por via subcutânea, na coxa direita dos camundongos, os quais também foram mantidos no biotério por 18 dias, sem restrição de água e alimento.

### **3.3.9. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-ANGIOGÊNICA EM MODELO DE MEMBRANA CORIOALANTOICA DE EMBRIÃO DE GALINHA**

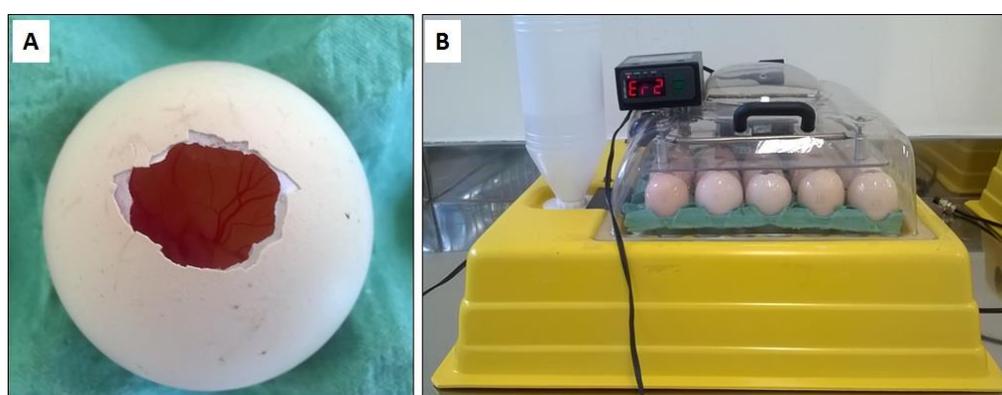
O desenvolvimento de drogas inibidoras de angiogênese tornou-se possível graças ao desenvolvimento de modelos experimentais a partir da década de 1970 (FOLKMAN; KLAGSBRUNS, 1987), dentre os quais, cultura de células endoteliais vasculares de veia umbilical (JAFFE et al. 1973), aorta (GOSPODAROWICZ et al. 1976) e capilares (FOLKMAN; HAUDENSCHILD; ZETTER, 1979) e bioensaio da membrana corioalantoica (MCA) de embrião de galinha (AUSPRUNK; KNIGHTON; FOLKMAN, 1974; KLAGSBRUN; KNIGHTON; FOLKMAN, 1976). O ensaio da MCA é uma alternativa a modelos que utilizam mamíferos para a avaliação pré-clínica de sistemas de liberação de fármacos, biomateriais e implantes para reconstituição de tecidos, pois o ensaio é utilizado também como forma de avaliar-se a atividade e a citotoxicidade de novas drogas e biomateriais (VARGAS et al. 2007).

Para a avaliação da atividade anti-angiogênica dos compostos sintetizados nesse trabalho utilizou-se o método previamente descrito por Burt e cols. (1995) e Knoll e cols. (1999), com algumas modificações.

Os ovos embrionados da espécie *Gallus domesticus*, linhagem Ross, adquiridos junto à empresa Rivelli, localizada no município de Mateus Leme – MG, foram incubados ( $37^\circ\text{C}$  e 60% de umidade relativa do ar) na posição horizontal, utilizando-se uma incubadora automática digital (Premium Ecológica®). No 3º dia do desenvolvimento embrionário, fez-se

uma abertura circular de aproximadamente 2,0 cm de diâmetro na região da câmara de ar da casca dos ovos, descartando-se os ovos inviáveis (não embrionados). Retirou-se a membrana interna da casca para a exposição da MCA (Figura 38-A) e os ovos foram selados com fita adesiva transparente. Com o auxílio de um suporte de isopor, os ovos foram acondicionados verticalmente na incubadora (Figura 38-B), onde permaneceram até o 5º dia de desenvolvimento embrionário.

**Figura 38** – Ovos embrionados utilizados no ensaio de atividade anti-angiogênica em modelo de membrana corioalantoica.



A: Exposição da MCA no 3º de desenvolvimento embrionário. Nota-se a extensa vascularização do tecido embrionário. B: Ovos incubados. Fonte: Próprio autor.

Para a obtenção da curva dose x resposta anti-angiogênica de nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$ , 20 $\mu\text{L}$  das suspensões foram inoculadas sobre discos de celulose de tamanho padronizado previamente colocados sobre a MCA. As injeções foram realizadas no 5º e 6º dia de desenvolvimento embrionário. Os seguintes grupos experimentais foram estabelecidos, para a obtenção da curva dose resposta de NPs  $\text{ZnWO}_4$ , conforme conduzido por Barui e cols. (2012) para a atividade antiangiogênica de nanopartículas de óxido de zinco, uma vez que, até o momento das realização desses ensaios não foram encontrados dados na literatura sobre a atividade antiangiogênica de NPs de  $\text{ZnWO}_4$ :

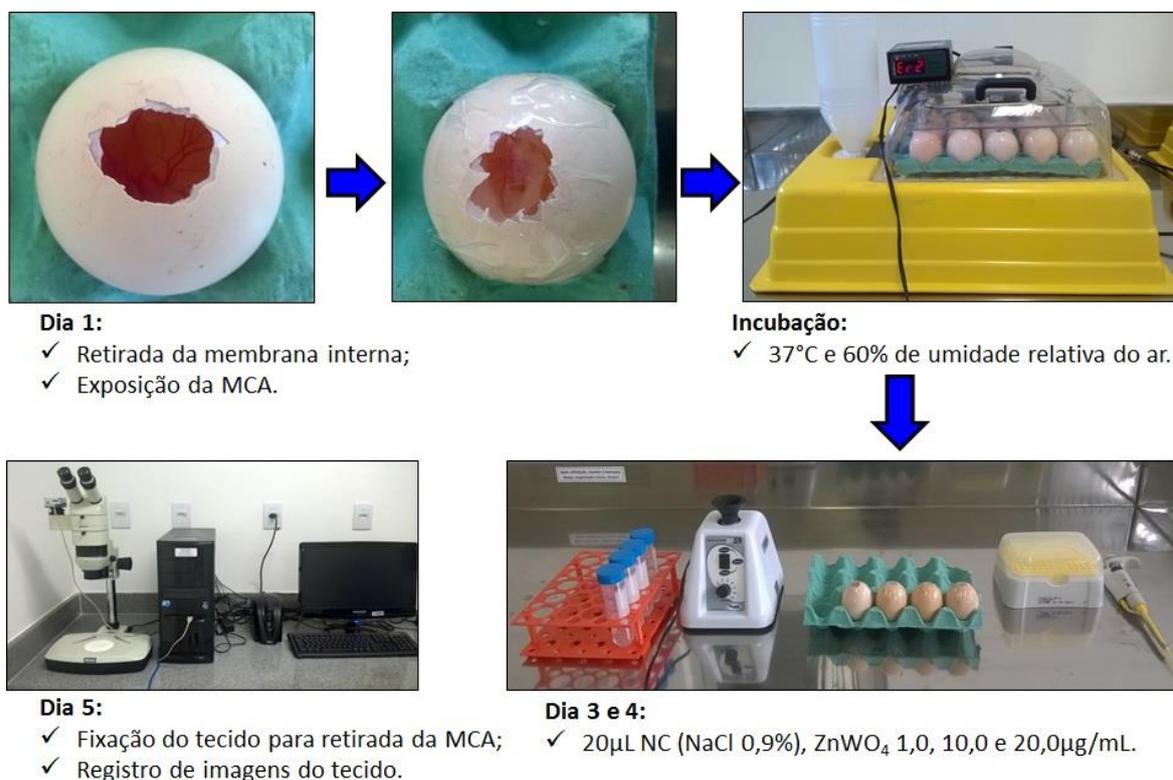
- i. Solução fisiológica estéril (NaCl 0,9% p/V);
- ii.  $\text{ZnWO}_4$  1,0  $\mu\text{g/mL}$ ;
- iii.  $\text{ZnWO}_4$  10,0  $\mu\text{g/mL}$ ;
- iv.  $\text{ZnWO}_4$  20,0 $\mu\text{g/mL}$ .

No 7º dia de desenvolvimento, ou seja, 48h após a primeira inoculação das suspensões de tungstato de zinco, realizou-se a extração das MCAs após prévia fixação do tecido com

solução de formaldeído a 3,7% por 10 minutos. As imagens foram registradas com o auxílio de câmera digital (Software Leica Application Suite V 3.3.0, Germany) acoplada a um estereomicroscópio (Leica, model DM4000B, Germany). As imagens obtidas foram analisadas com o auxílio do programa gratuito ImageJ versão 1.44 para a quantificação dos vasos sanguíneos. Os resultados do grupo com solução salina [NaCl 0,9% p/V (controle negativo)] foram fixados como 100% para o cálculo da redução (%) dos vasos sanguíneos. Os ensaios de angiogênese foram realizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia (UFMG).

O delineamento experimental do ensaio de angiogênese está ilustrado na Figura 39.

**Figura 39** – Delineamento experimental do ensaio de atividade anti-angiogênica em membrana corioalantóica de embrião de galinha.



Fonte: Santos et al. 2018 (adaptado).

### 3.3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni ou de Newman-Keuls para múltiplas comparações, conforme apropriado. As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o software Graphpad Prism 5.0 para Windows (Graphpad Software Inc., California, USA). Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) e o nível de significância estabelecido foi  $p < 0,05$ .

### 3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.4.1. PUREZA RADIOQUÍMICA DA RADIOMARCAÇÃO DO COMPLEXO $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{ZnWO}_4$

A reação de formação de complexos com o  $^{99m}\text{Tc}$  é um procedimento relativamente simples, no qual inicialmente ocorre uma reação de oxirredução entre o radioisótopo na forma de ânion  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  (NOX +8) e o agente redutor ( $\text{Sn}^{2+}$ ). Em seguida ocorre uma reação de complexação entre as nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  e o radioisótopo reduzido [ $^{99m}\text{Tc}^{4+}$  (NOX +4)], conforme descrito nas equações 13 e 14 (Tópico 3.3.1.). Na reação de complexação, as nanopartículas de tungstato de zinco atuaram como agente quelante, de forma que os elétrons não ligantes do oxigênio ocuparam os orbitais vazios do radioisótopo tecnécio reduzido.

Eventualmente, a reação de complexação entre o agente quelante ( $\text{ZnWO}_4$ ) e o radioisótopo reduzido ( $^{99m}\text{Tc}^{4+}$ ) pode ser lenta e duas impurezas radioquímicas podem ser formadas, o próprio pertecnetato ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ), devido a sua não redução ou ainda o óxido de tecnécio ( $\text{TcO}_2$ ), uma espécie reduzida e hidrolisada. Esse problema pode ser resolvido com a adição de uma segunda espécie reativa, nesse trabalho foram utilizados ânions hidroxila ( $\text{OH}^-$ ), que são capazes de se ligar rapidamente ao  $^{99m}\text{Tc}$  em processo de redução, porém com baixa estabilidade de ligação, de forma que na presença do agente quelante ( $\text{ZnWO}_4$ ) os ânions hidroxila serão deslocados após adição de ácido, possibilitando a formação da espécie radiomarcadas mais estável, o complexo  $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{ZnWO}_4$ .

A porcentagem total de impurezas radioquímicas, portanto, refere-se ao somatório das porcentagens de espécies  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  e  $\text{TcO}_2$ . Nesse trabalho, as análises de pureza revelaram um total  $2,7 \pm 1,1$  % de impurezas e um rendimento médio de pureza radioquímica do complexo  $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{ZnWO}_4$  de  $97,3\% \pm 1,1$ , ou seja, os resultados sugerem que no mínimo 97% dos átomos de tecnécio ligaram-se às nanopartículas de tungstato de zinco, revelando o elevado rendimento da reação de complexação entre NPs de  $\text{ZnWO}_4$  e  $^{99m}\text{Tc}$ .

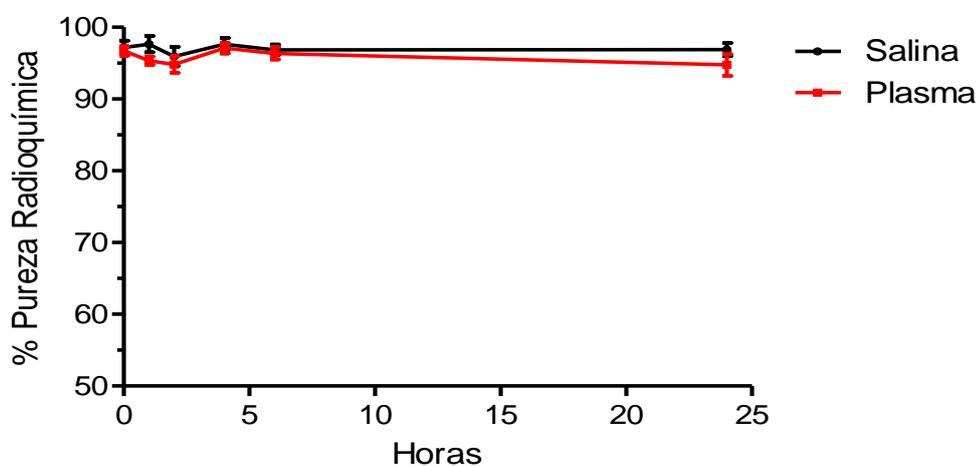
A pureza radioquímica é o primeiro parâmetro de qualidade a ser avaliado após a produção de NPs radiomarcadas. Conforme recomendação da agência regulamentadora norte americana, FDA (*U.S. Food and Drug Administration*), e da farmacopeia americana (USP, 2016) o valor recomendado mínimo é de 90% de pureza. A presença de impurezas pode alterar a especificidade do complexo radiomarcado para o órgão ou tecido alvo, comprometendo assim a qualidade das imagens, resultando em imagens de baixa qualidade devido à alta radiação de fundo ao redor dos tecidos e, ainda, pode expor o paciente ou o

animal a doses maiores de radiação. O procedimento de filtração das suspensões contendo as amostras radiomarcadas em filtros estéreis, com diâmetro de poro no valor de  $0,22\mu\text{m}$ , é eficaz na remoção de  $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ , contudo esse procedimento não é eficaz na remoção do ânion pertecnetato ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ) (ODA et al. 2017; BARBOSA et al. 2015). Dessa forma, o valor médio de pureza radioquímica encontrado para as nanopartículas de  $^{99\text{m}}\text{Tc-ZnWO}_4$  sugere a eficiência do processo de radiomarcção desse material, realizada nesse trabalho e torna-o apto para a realização de ensaios, *in vivo*, como estudos de biodistribuição e obtenção de imagens cintilográficas (DE BARROS et al. 2012; DE BARROS et al. 2015; ZIESSMAN; O'MALLEY; THRALL, 2014).

### 3.4.2. ESTABILIDADE DA RADIOMARCAÇÃO *IN VITRO*

Para a obtenção de resultados robustos a partir do uso de complexos radiomarcados, em pesquisa ou em diagnóstico, é desejável que os compostos radiomarcados sejam estáveis nos veículos utilizados antes da administração nos animais, assim como nos fluidos biológicos. A Figura 40 representa os resultados de estabilidade da radiomarcção, *in vitro*, através da análise da pureza radioquímica do  $^{99\text{m}}\text{Tc-ZnWO}_4$  em solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v) e em plasma de camundongo, durante 24 horas. Observou-se que os complexos radiomarcados de  $^{99\text{m}}\text{Tc-ZnWO}_4$  são estáveis em solução de NaCl 0,9% (p/V) e em plasma de camundongo, por até 24 horas, uma vez que em todos os tempos de análise, as amostras apresentaram pureza radioquímica superior a 90%. Após 24 horas do processo de radiomarcção o complexo  $^{99\text{m}}\text{Tc-ZnWO}_4$  permaneceu estável nos dois meios testados, com valores de pureza radioquímica de  $96,9\% \pm 1,6$  e de  $97,1\% \pm 1,5$ , em solução de NaCl e em plasma de camundongo, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores médios de pureza radioquímica apresentados nos diferentes meios testados, o que sugere a formação de um sistema com excelente estabilidade, por até 24 horas.

**Figura 40** – Estabilidade de radiomarcção do complexo  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$ , em função do tempo.



Os pontos representam a média  $\pm$  DP. n = 4/grupo. Fonte: próprio autor.

Nanopartículas radiomarcadas constituem uma nova classe de materiais que despertam o interesse de vários pesquisadores devido ao seu potencial para aplicações em técnicas de diagnóstico de imagem baseadas em cintilografia, devido à sua estabilidade em meio biológico e ao seu longo tempo de circulação (DE BARROS et al. 2012). Nesse trabalho, demonstrou-se pela primeira vez que NPs de tungstato de zinco originam complexos estáveis com o radioisótopo  $^{99m}\text{Tc}$  em dois meios de interesse, solução fisiológica de cloreto de sódio (0,9% p/V) e plasma de camundongo, por até 24 horas.

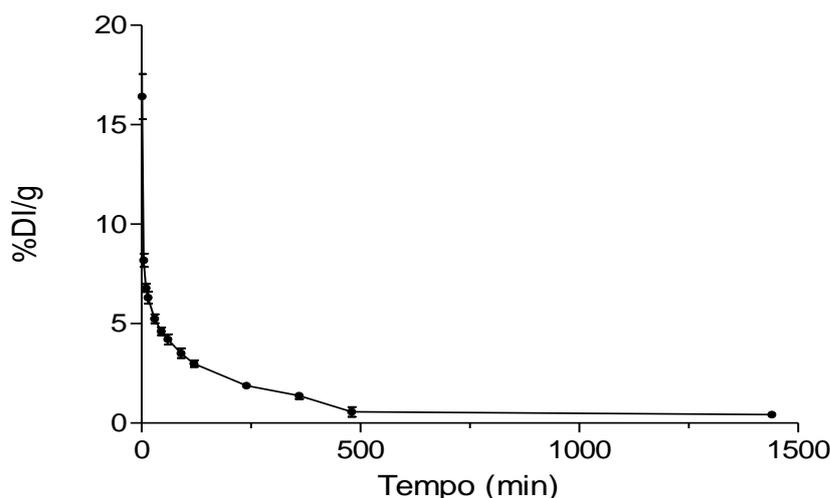
A estabilidade de complexos radiomarcados implica em robustez dos experimentos conduzidos em longos períodos de tempo, visto que se houver degradação das amostras radiomarcadas durante a realização dos ensaios, *in vivo*, a quantidade de radiação detectada pelos cintilógrafos será alterada pela presença impurezas, tais como  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  e  $^{99m}\text{TcO}_2$ , e, portanto, os resultados não serão confiáveis. Dessa maneira, os resultados aqui apresentados sugerem que o complexo  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  possibilitará a realização de ensaios robustos de biodistribuição, *in vivo* (DE BARROS et al. 2012).

### 3.4.3. DEPURAÇÃO PLASMÁTICA

Após a administração, por via intravenosa, em animais saudáveis, o complexo  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  apresentou um perfil de depuração sanguínea rápido e tempo de meia vida plasmática ( $T_{1/2}$ ) bifásico, ou seja, os seus níveis sanguíneos diminuíram de forma bifásica, de maneira

que na primeira fase observou-se um tempo de meia vida plasmática rápido de 1,6 minutos (96 segundos), enquanto a segunda fase apresentou meia vida plasmática lenta de 84,5 minutos, conforme ilustrado na Figura 41.

**Figura 41** – Depuração sanguínea do complexo  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  em animais sadios, após administração intravenosa.



Os dados foram expressos como a porcentagem média da dose injetada  $\pm$  DP. n = 7/grupo. Fonte: Próprio autor.

Os estudos farmacocinéticos referem-se à avaliação quantitativa do desenvolvimento temporal dos processos de absorção, distribuição, biotransformação e excreção dos fármacos após a sua administração, *in vivo* (LI; HUANG, 2008; BUXTON, 2010). Nesse trabalho propôs-se a síntese de um radiofármaco, o complexo radiomarcado de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$ , e a compreensão de dois parâmetros farmacocinéticos, a taxa de depuração plasmática ou o tempo de meia-vida plasmático e o perfil de distribuição desses complexos nos tecidos de camundongos sadios e com tumor de Ehrlich.

Todos os processos farmacocinéticos de substâncias químicas em organismos vivos dependem da sua eficiência em atravessar as membranas biológicas, portanto, as propriedades físico-químicas da membrana e das substâncias de interesse definem o seu comportamento durante esses processos. Dentre os fatores que contribuem para a evolução dos processos farmacocinéticos, destacam-se a composição, a solubilidade, o grau de ionização, a lipossolubilidade, o tamanho, a forma, a carga residual da superfície (potencial zeta) e a taxa de ligação das substâncias de interesse às proteínas plasmáticas (BUXTON, 2010; ERNSTING et al. 2013; YU; ZHENG, 2015).

Além disso, o processo de distribuição de substâncias em organismos vivos depende de fatores fisiológicos do animal, tais como, o fluxo sanguíneo e linfático que alcança os órgãos, os quais, por sua vez, dependem do débito cardíaco, do fluxo sanguíneo regional, da permeabilidade capilar e do volume tecidual (BUXTON, 2010; YU; ZHENG, 2015).

A primeira etapa do estudo do comportamento farmacocinético abrange a avaliação do tempo de permanência do material em estudo na circulação sanguínea, denominado tempo de meia vida. Na primeira fase da meia vida biológica, órgãos que recebem maior volume de sangue, como fígado, rins, cérebro, pulmões e outros, receberão a maior dose da substância estudada. Por conseguinte, a segunda fase de distribuição das substâncias, *in vivo*, é representada pela sua chegada até os tecidos menos irrigados, tais como, pele, tecido adiposo, músculos e a maioria dos órgãos (ERNSTING, et al. 2013; BUXTON, 2010; YU; ZHENG, 2015).

Além do volume de sangue que os órgãos recebem, outro fator fisiológico que limita a distribuição de nanopartículas pelos tecidos é a permeabilidade capilar, que pode ser entendida como o espaço existente entre as células endoteliais que compõem a parede dos vasos sanguíneos. Tecidos como o fígado, o baço e a medula óssea, mesmo em condições fisiológicas, apresentam maior permeabilidade vascular, devido a importantes funções fisiológicas realizadas por esses tecidos, dentre as quais reconhecimento e remoção de substâncias estranhas ao organismo, denominadas xenobióticos (BUXTON, 2010; BARREIRO; FRAGA, 2015; GONZALEZ; TUKEY, 2010). Para a remoção de NPs da circulação na primeira fase da depuração plasmática, o baço e o fígado são os órgãos mais ativos (DONG et al. 2014; ERNSTING et al. 2013; LI et al. 2018; LI; HUANG, 2008; YANG et al. 2014; YU; ZHENG, 2015).

Para aplicações em química medicinal, especialmente para favorecer a ocorrência do efeito EPR, é desejável que as NPs apresentem um longo tempo de circulação. Alguns trabalhos associam o tamanho médio de nanopartículas à sua taxa de depuração (LIU; MORI; HUANG, 1992; ULRICH, 2002; YANG et al. 2007; YU; ZHENG, 2015).

Os tamanhos dos poros ou fenestras dos capilares de alguns órgãos são fatores limitantes do processo de difusão de NPs para o seu interior, de forma que NPs com tamanho menor que 5nm são rapidamente eliminadas pelos rins, aquelas com tamanho menor que 50nm atravessam passivamente as fenestras vasculares hepáticas e por fim NPs com diâmetro médio entre 400 e 500nm alcançam o baço. As fenestras vasculares dos tumores, por sua vez, variam de 400 a 600nm até microns. Dessa forma, NPs de interesse para aplicações em teranóstico do câncer devem apresentar um tamanho médio superior a 50nm e inferior a

400nm, visando um maior tempo de circulação (CHOI et al. 2007; ERNSTING et al. 2013; KIM; FAIX; SCHNITZER, 2017; LIU; MORI; HUANG, 1992; YUAN et al. 1995).

Nesse contexto, o rápido declínio dos níveis plasmáticos de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$ , observado na primeira fase da depuração plasmática, pode estar associado a uma ampla taxa de depuração renal para esse material, pois substâncias com tamanho médio menor que 5nm são eliminadas por essa via (CHOI et al. 2007) e as nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  utilizadas nos ensaios de biodistribuição apresentaram um tamanho médio de 3,67nm. Por outro lado, o rápido declínio dos níveis plasmáticos pode ser atribuído também à ampla captação do complexo radiomarcado por órgãos específicos (ERNSTING et al., 2013; LI; HUANG, 2008; YU; ZHENG, 2015).

O perfil de depuração plasmática apresentado pelo complexo  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  revela a redução expressiva da concentração do complexo em plasma, em menos de 2 minutos. Esse fenômeno pode estar correlacionado à eficiência dos órgãos responsáveis pela eliminação de substâncias estranhas ao organismo, principalmente baço e fígado em fagocitar essas NPs (DONG et al. 2014; ERNSTING et al. 2013; LI et al. 2018; LI; HUANG, 2008; ODA et al. 2017; YANG et al. 2014; YU; ZHENG, 2015).

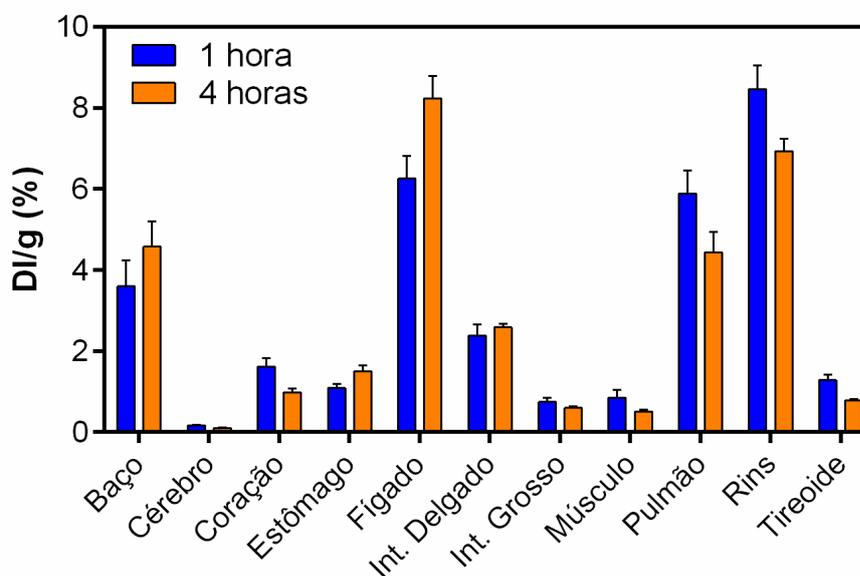
#### **3.4.4. BIODISTRIBUIÇÃO E IMAGENS CINTILOGRÁFICAS DO COMPLEXO $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$ EM ANIMAIS SADIOS**

O perfil, ex vivo, de biodistribuição de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  está ilustrado na Figura 42 e os valores médios de porcentagem de dose injetada / grama de tecido (DI/g) foram descritos na Tabela 10. A Figura 42 revela que houve absorção de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  por todos os órgãos analisados, contudo, significativa diferença foi observada em termos de quantidade. Após 1 hora de administração, por via endovenosa, os órgãos que demonstraram menor captação do complexo radiomarcado foram cérebro, intestino (int.) grosso e músculo, com valores de porcentagem de DI/g de  $0,1656 \pm 0,02465$ ,  $0,7492 \pm 0,2804$  e  $0,8484 \pm 0,5431$ , respectivamente (Tabela 10). O estômago, a tireoide, o coração e o intestino delgado apresentaram valores de porcentagem de DI/g de  $1,090 \pm 0,3054$ ,  $1,286 \pm 0,3521$ ,  $1,615 \pm 0,5886$  e  $2,386 \pm 0,7519$  (Tabela 10). E, por fim, os órgãos que apresentaram a maior porcentagem de captação do complexo, expressa em DI/g, foram o baço ( $3,596 \pm 1,822$ ), o pulmão ( $5,887 \pm 1,620$ ), o fígado ( $6,257 \pm 1,561$ ) e os rins ( $8,461 \pm 1,652$ ) (Tabela 10).

De modo geral, a maioria dos órgãos analisados apresentou redução da porcentagem de DI/g após 4h de administração do complexo (cérebro, intestino grosso, músculo, tireoide,

coração, pulmão e rins) (Fig. 42). Por outro lado, observou-se o aumento da porcentagem de DI/g no estômago, int. delgado, baço e fígado, após 4h, de maneira que o fígado apresentou a maior captação de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  (Fig. 42), representada por um valor de porcentagem de DI/g  $8,236 \pm 1,568$  (Tabela 10).

**Figura 42** – Biodistribuição do complexo  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  em diferentes órgãos de camundongos saudáveis.



As colunas representam a média  $\pm$  DP. n = 7-8/grupo. Fonte: Próprio autor.

**Tabela 10** – Biodistribuição do complexo  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  em diferentes órgãos de camundongos saudáveis.

Órgão	1h	4h
Cérebro	0,1656 ± 0,02465	0,1055 ± 0,03101
Intestino grosso	0,7492 ± 0,2804	0,5986 ± 0,08994
Músculo	0,8484 ± 0,5431	0,5102 ± 0,1179
Estômago	1,090 ± 0,3054	1,504 ± 0,3980
Tireoide	1,286 ± 0,3521	0,7870 ± 0,07185
Coração	1,615 ± 0,5886	0,9832 ± 0,2579
Intestino delgado	2,386 ± 0,7519	2,590 ± 0,2524
Baço	3,596 ± 1,822	4,574 ± 1,748
Pulmão	5,887 ± 1,620	4,439 ± 1,427
Fígado	6,257 ± 1,561	8,236 ± 1,568
Rins	8,461 ± 1,652	6,929 ± 0,8527

As colunas representam a média ± DP. n = 7-8/grupo. Fonte: Próprio autor.

A literatura descreve a captação de tecnécio livre ( $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ), uma impureza radioquímica decorrente da baixa estabilidade dos complexos formados durante o ensaio de radiomarcção, por órgãos como estômago e tireoide. Nesse trabalho, baixos níveis de captação foram observados para esses órgãos, o que sugere uma alta pureza radioquímica e estabilidade do complexo  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$ , *in vivo*, frente à descomplexação do  $^{99m}\text{Tc}$  (ZIESSMAN; O'MALLEY; THRALL, 2014).

Nesse trabalho, a maior captação de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  foi observada pelos rins, 1 hora após a administração. Como as NPs de tungstato de zinco utilizadas nesse ensaio apresentam tamanho médio de 3,67nm, esse resultado está coerente com dados da literatura que relatam a ampla eliminação renal de NPs com tamanho menor que 5nm (CHOI et al. 2007).

O processo de opsonização é uma das barreiras biológicas mais importantes nas aplicações biomédicas de nanopartículas, pois as proteínas opsoninas presentes no soro sanguíneo podem se ligar rapidamente a nanopartículas, permitindo que os macrófagos as reconheçam e removam da corrente sanguínea (LIU; MORI; HUANG, 1992; MOGHIMI; HUNTER, 2001; NAGAYAMA et al. 2007; OWENS; PEPPAS, 2006).

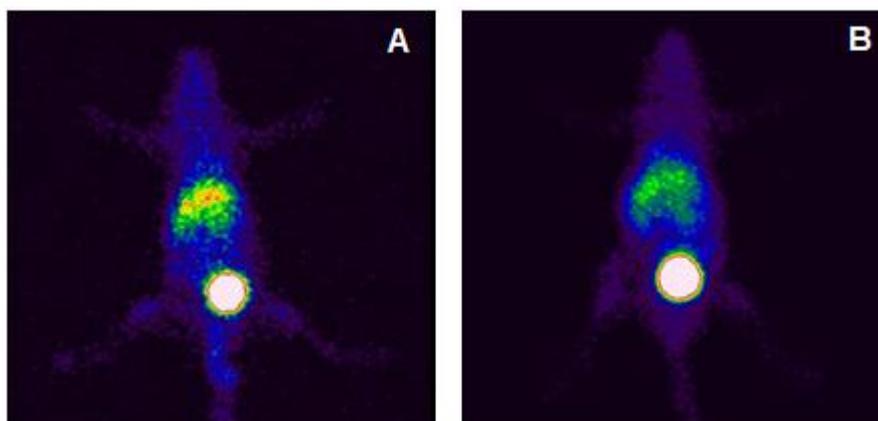
A presença de elevadas doses (DI/g) de NPs de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  no baço, fígado e pulmões, nos diferentes tempos analisados nesse trabalho, pode ser atribuída à ampla taxa de

opsonização por células fagocitárias residentes nesses tecidos, como células de Kupffer no fígado, macrófagos alveolares no pulmão e macrófagos, bem como células B no baço, tal como observado em outros trabalhos dedicados a estudos de biodistribuição de NPs de óxidos (DONG et al. 2014; ELGRABLI et al. 2015; YANG et al. 2014).

Estudos conduzidos por Yang e cols. (2014) revelaram resultados semelhantes para NPs de ZnO com tamanho médio de 5,4nm. Eles verificaram o acúmulo das NPs principalmente no fígado e nos pulmões e observaram que elas foram excretadas principalmente através das fezes (processamento hepático e excreção biliar) (YANG et al. 2014). Em outro estudo conduzido por Dong e cols. (2014) com nanopartículas de tungstato de magnésio sintetizadas através do método hidrotermal assistido por micro-ondas, com diâmetro médio de 20nm, eles demonstraram elevada captação das NPs pelo fígado e pelo intestino.

As imagens cintilográficas obtidas nesse trabalho estão representadas na Figura 43. É possível observar o mesmo perfil de captação do complexo  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  pelos órgãos e tecidos analisados, conforme demonstrado nos estudos de biodistribuição (Fig. 42). Pode-se observar que o estômago e a tireoide não obtiveram uma captação significativa, indicando baixo teor de impurezas radioquímicas, o que não compromete a qualidade da imagem com radiações de fundo ao redor dos tecidos e do sangue.

**Figura 43** – Imagens cintilográficas obtidas após a administração endovenosa de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  em camundongos saudáveis.



A: 1 hora; B: 4 horas após a administração endovenosa de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$ . Fonte: próprio autor.

As imagens (Fig. 43) ilustram a maior captação do complexo radiomarcado pelo fígado, baço e pulmões, devido ao seu acúmulo nos órgãos ricos em células fagocitárias, de acordo com os dados dos estudos de biodistribuição (Tabela 10). No ensaio de

biodistribuição, foi demonstrada a maior taxa de captação do complexo radiomarcado pelos rins (Tabela 10).

As imagens cintilográficas (Fig. 43) demonstraram a presença de grande quantidade do complexo na bexiga, realçando a participação do sistema renal na eliminação das NPs sintetizadas nesse trabalho, com tamanho menor que 5nm. Outros estudos também reiteram a importância do tamanho médio de partícula no perfil de eliminação das NPs da circulação.

Elgrabli e cols. (2015) demonstraram ampla captação de NPs de  $\text{TiO}_2$  pelo fígado, baço e pulmões, realçando a importância das células fagocitárias desses tecidos na remoção de NPs da circulação, mas também demonstraram a eliminação dessas NPs pela via renal (ELGRABLI et al. 2015). Yang e cols. (2015) também avaliaram a influência do tamanho das NPs no perfil de distribuição, de forma que NPs de FeO menores que 10nm foram rapidamente absorvidas pelos rins e pelo fígado, enquanto doses maiores de NPs com tamanho superior a 40nm foram absorvidas pelo baço (YANG et al. 2015). Em outro estudo, Yang e cols. (2014) observaram baixa absorção de NPs de quantum dots de ZnO funcionalizadas com polietilenoglicol (PEG) pelos rins, e demonstraram a importância da via hepática-intestinal para a eliminação dessas NPs.

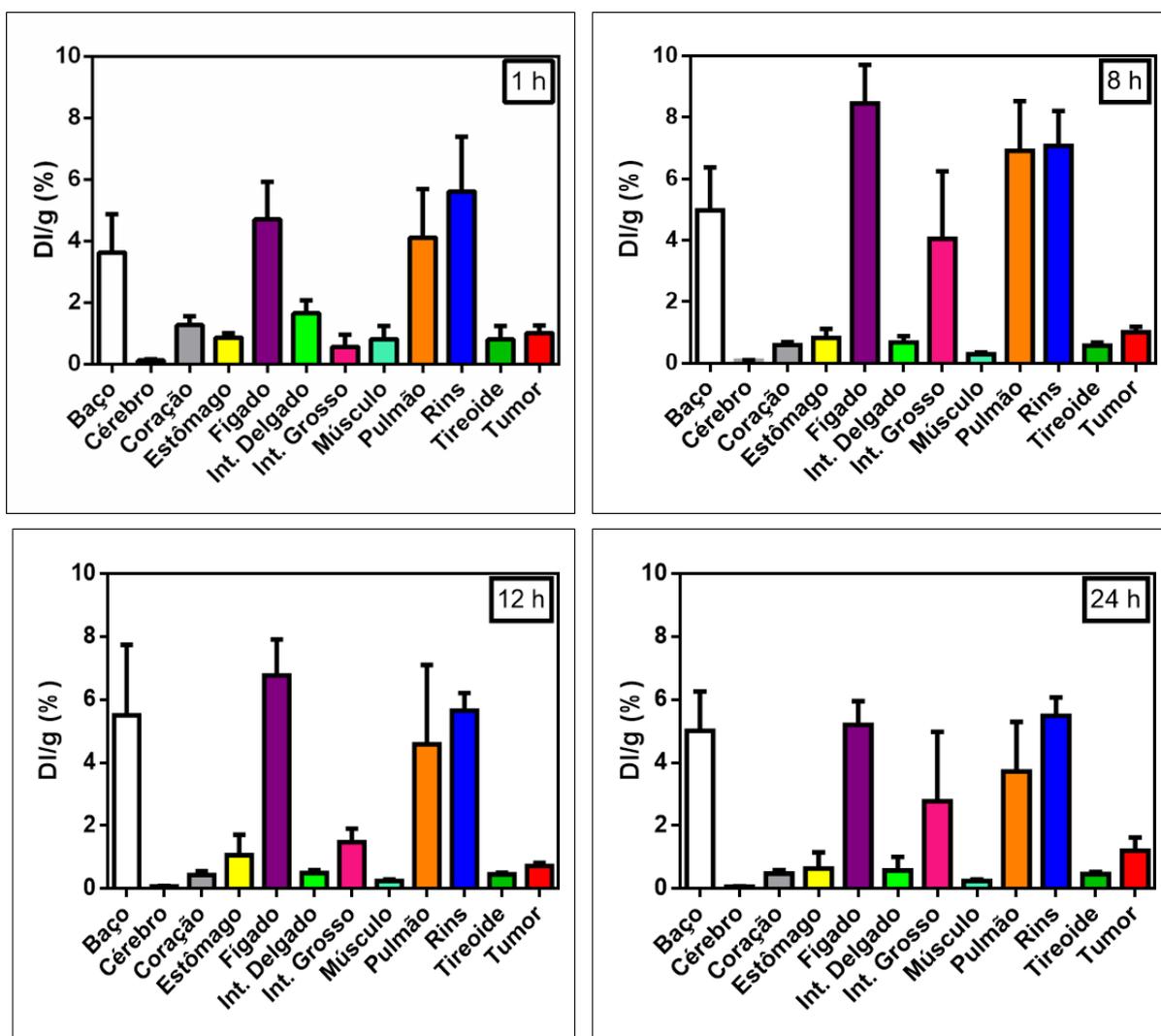
### **3.4.5. BIODISTRIBUIÇÃO E IMAGENS CINTILOGRÁFICAS DO COMPLEXO $^{99\text{m}}\text{Tc-ZnWO}_4$ EM ANIMAIS COM TUMOR DE EHRLICH**

A Figura 44 ilustra o perfil de biodistribuição do complexo  $^{99\text{m}}\text{Tc-ZnWO}_4$  em camundongos BALB/c portadores do tumor de Ehrlich, em diferentes tempos após a administração endovenosa. Os estudos de biodistribuição do complexo  $^{99\text{m}}\text{Tc-ZnWO}_4$  em animais com tumor de Ehrlich revelaram um perfil semelhante àquele apresentado para os animais saudáveis. De acordo com a Figura 44 observou-se que o complexo distribuiu-se por todos os tecidos. Após 1h de administração endovenosa do complexo, as menores porcentagens de captação (DI/g) foram observadas para o cérebro ( $0,1182 \pm 0,03321$ ), intestino grosso ( $0,5638 \pm 0,3876$ ), músculo ( $0,8166 \pm 0,4257$ ), tireoide ( $0,8050 \pm 0,4373$ ), estômago ( $0,8619 \pm 0,1469$ ), coração ( $1,274 \pm 0,2836$ ) e intestino delgado ( $1,658 \pm 0,4144$ ) (Fig. 44). De forma análoga aos estudos com animais saudáveis (Fig. 42), as maiores porcentagens de captação (DI/g) foram observadas para o pulmão, baço, fígado e rins (Fig. 44).

Nos órgãos que apresentaram os menores valores de absorção de  $^{99\text{m}}\text{Tc-ZnWO}_4$  na primeira hora (cérebro, int. grosso, músculo, tireoide, estômago, coração, int. delgado)

observou-se a redução dos valores de porcentagem de dose injetada / grama de tecido, ao longo do tempo de análise dos tecidos (Fig. 44), exceto para o intestino grosso, que apresentou um pico de absorção do complexo radiomarcado após 8 h de administração, no valor de  $4,054 \pm 2,201$  DI/g (%) (Fig. 44), o que pode sugerir que esse sistema também represente uma via de eliminação para as NPs de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$ .

**Figura 44** – Biodistribuição do complexo  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  em diferentes órgãos de camundongos com tumor de Ehrlich.



As colunas representam a média  $\pm$  DP. n = 8/grupo. Fonte: Próprio autor.

Dentre os órgãos que apresentaram os maiores valores de absorção do complexo radiomarcado, observou-se que o pulmão ( $6,922 \pm 1,614$ ), o fígado ( $8,461 \pm 1,251$ ) e os rins ( $7,079 \pm 1,136$ ) apresentaram pico de absorção 8 horas após a administração endovenosa de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$ , contudo o baço apresentou seu pico de absorção do complexo após 12h, o que

pode ser atribuído a um possível processo de saturação das células fagocitárias dos pulmões e do fígado, uma vez que no tempo de 8h esses órgãos apresentaram seu pico máximo de absorção do complexo (Fig. 44).

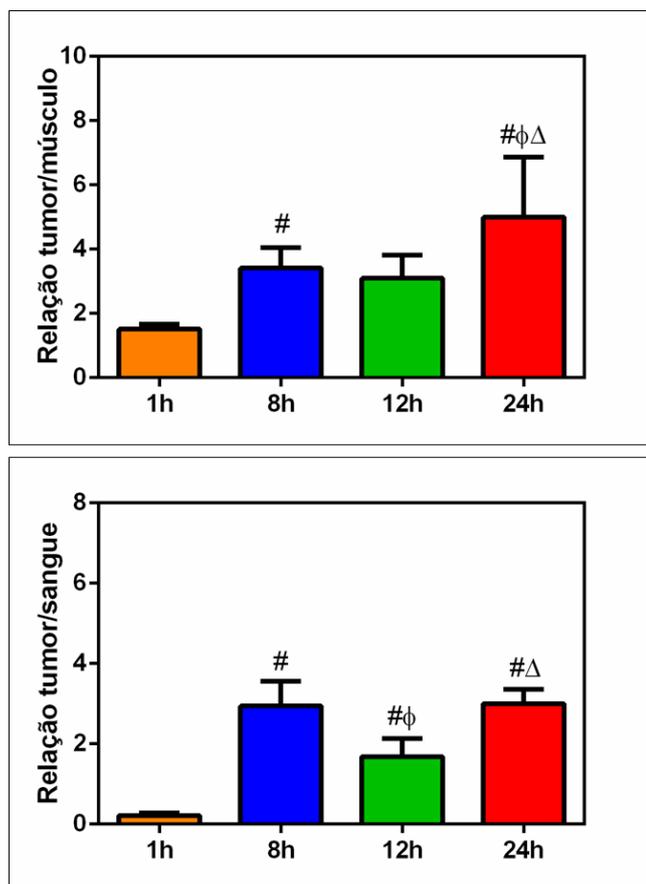
Em estudo conduzido por Dong e cols. (2014) com NPs de  $\text{MnWO}_4$  que apresentaram tamanho médio de 20nm, foi demonstrada a captação máxima de NPs pelo fígado e pelo intestino 2 e 24 horas após a administração endovenosa das NPs. Diferentemente dos resultados aqui apresentados para NPs de  $^{99\text{m}}\text{Tc-ZnWO}_4$ , eles não observaram taxas de absorção significativas pelo pulmão, baço e rins, realçando a importância do tamanho de partícula como premissa para compreensão do perfil de distribuição de materiais nanoestruturados (DONG et al. 2014).

Observou-se que houve a absorção do complexo pelo tumor com valores de porcentagem de dose injetada / grama de tecido praticamente constantes após 1h ( $1,016 \pm 0,2351$ ), 8h ( $1,010 \pm 0,1761$ ) e 24h ( $1,204 \pm 0,4216$ ), entretanto, após 12h de administração do complexo observou-se o menor valor de absorção pelo tumor ( $0,7235 \pm 0,09863$ ) (Fig. 45).

As alterações no microambiente tumoral, tais como aumento da permeabilidade vascular mediada por fatores vasodilatadores liberados pelo próprio tecido tumoral, defeitos nas fenestras vasculares e drenagem linfática ineficiente, resultam no efeito de permeação e retenção vascular aumentada (EPR), facilitando o acúmulo de NPs no tecido tumoral e em sítios de metástase (MAEDA; TSUKIGAWA; FANG, 2016; YU; ZHENG, 2015).

O cálculo da relação alvo/não alvo, onde o alvo representa o tumor localizado na pata direita do animal e o não alvo representa o músculo da pata contralateral saudável do mesmo animal, revelou alta afinidade do complexo radiomarcado  $^{99\text{m}}\text{Tc-ZnWO}_4$  pelo tumor quando comparado com grupo controle, músculo da pata contralateral, conforme ilustrado na Figura 45. Análises estatísticas revelaram um valor de relação tumor/músculo de  $1,516 \pm 0,1496$ , após 1h de administração (Fig. 45). Observou-se a ocorrência de aumento crescente da dose de  $^{99\text{m}}\text{Tc-ZnWO}_4$  absorvida pelo tumor em função do tempo, de forma que a relação tumor/músculo após 8 horas ( $3,411 \pm 0,6413$ ) de administração do complexo foi estatisticamente diferente daquela observada após 1 h e após 24h de administração ocorreu o pico máximo de absorção representado por um valor de relação tumor/músculo de  $4,993 \pm 1,1879$ , sendo que esse valor é estatisticamente diferente das doses absorvidas após 1, 8 e 12h (Fig. 45). O valor encontrado para a relação tumor/músculo após 12h ( $3,099 \pm 0,7166$ ), não apresentou diferença significativa daqueles observados após 1 e 8h de administração (Fig. 45).

**Figura 45** – Relação alvo/não alvo após a administração do complexo  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$ .



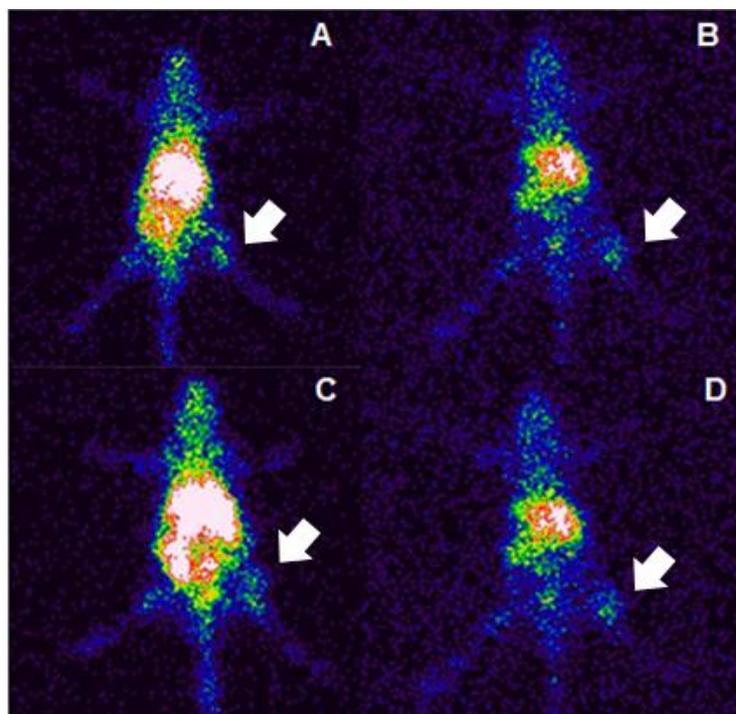
As colunas representam a média  $\pm$  DP. # Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 1h;  $\Phi$  diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 8h;  $\Delta$  diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo 12h.  $p < 0,05$ , ANOVA seguida de teste de Newman-Keuls para múltiplas comparações,  $n = 5-8$ /grupo. Fonte: Próprio autor.

Os estudos da relação entre as concentrações de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  no tumor e no sangue revelam que após 1h de administração o complexo não foi absorvido em quantidades apreciáveis pelo tumor, devido ao baixo valor encontrado para a relação tumor/sangue,  $0,2163 \pm 0,06486$  (Fig. 45). Após 8h de administração do complexo, observou-se o aumento crescente da relação tumor/sangue, exceto para o tempo de 12h (Fig. 45). As análises estatísticas revelaram que existe diferença significativa entre as doses absorvidas pelo tumor após 8 ( $2,943 \pm 0,6107$ ), 12 ( $1,684 \pm 0,4479$ ) e 24h ( $3,002$ ), comparadas àquela absorvida após 1h de administração (Fig. 45). Assim como apresentado para a relação tumor/músculo, a análise da relação de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  absorvido pelo tumor em comparação aos níveis sanguíneos, também revelou a ocorrência do pico de absorção do complexo pelo tumor após 24h de administração (Fig. 45).

As análises da relação tumor/músculo apresentadas na Fig. 45 revelaram que a partir de 1h de administração endovenosa do complexo o valor foi sempre superior a 1,5, ou seja, NPs de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  são 50% mais captadas pelo tumor em comparação ao grupo controle negativo, o músculo da pata contralateral. Os resultados aqui apresentados sugerem a eficiência de NPs de  $\text{ZnWO}_4$  em direcionar o radioisótopo  $^{99m}\text{Tc}$  ao tecido tumoral, possibilitando a obtenção de imagens de qualidade e sugerem, portanto, que esse material é um importante candidato para aplicações em teranóstico do câncer (PHILLIPS, 1999; DE BARROS, 2012).

A Figura 46 ilustra as imagens cintilográficas obtidas após 1, 8, 12 e 24 horas de administração endovenosa de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  em camundongos BALB/c portadores de tumor de Ehrlich. As imagens cintilográficas revelaram um perfil semelhante àquele apresentado para o perfil de biodistribuição do radiofármaco para animais sadios (Fig. 43), o que sugere que a presença do tumor não altera a distribuição da suspensão de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  em camundongos BALB/c portadores de tumor de Ehrlich. As imagens obtidas também demonstraram a maior captação do complexo pelo tumor em relação ao músculo contralateral (controle negativo) (Fig. 46). Nesse ínterim, os estudos de biodistribuição aqui apresentados revelam que NPs de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$  podem ser úteis na identificação de tumor de Ehrlich e, provavelmente, de outros tipos de tumores sólidos.

**Figura 46** – Imagens cintilográficas obtidas após a administração endovenosa de  $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{ZnWO}_4$  em camundongos com tumor de Ehrlich.



A: 1 hora; B: 8 horas; C: 12 horas e D: 24 horas após a administração endovenosa; as setas indicam o tumor.  
Fonte: próprio autor.

Nesse capítulo, demonstrou-se que o complexo  $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{ZnWO}_4$  apresentou excelente estabilidade em solução fisiológica (NaCl 0,9% p/V) e em plasma; as NPs de  $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{ZnWO}_4$  foram rapidamente absorvidos por vários órgãos, inclusive pelo tecido tumoral, apresentando assim um tempo de meia-vida bifásico caracterizado pela rápida redução dos níveis plasmáticos na primeira fase. Demonstrou-se também que, provavelmente, as NPs de  $^{99m}\text{Tc}$ - $\text{ZnWO}_4$  são eliminadas principalmente pela via renal; apresentaram longo tempo de circulação plasmática e apresentaram efeito EPR significativo. Juntamente com os resultados do ensaio de citotoxicidade, descritos no capítulo 2, as nanopartículas sintetizadas oferecem segurança para aplicações como radiofármaco em estudos envolvendo animais contendo o tumor de Ehrlich, contudo algumas modificações em sua superfície podem ser úteis para reduzir a sua fagocitose pelas células de defesa localizadas no baço, pulmão e fígado.

A baixa seletividade das drogas antitumorais disponíveis na clínica é um problema impactante durante a condução da quimioterapia de pacientes com câncer, visto que muitas drogas são potencialmente citotóxicas e podem ocasionar danos irreversíveis nos tecidos saudáveis (CHABNER et al. 2010). A proposta do uso de NPs em teranóstico do câncer surgiu como uma expectativa para resolver esse problema, contudo, assim como foi demonstrado

nesse estudo, muitos trabalhos também revelam que NPs não são exclusivamente absorvidas pelo tecido tumoral.

Com o intuito de aumentar o tempo de circulação plasmática de NPs candidatas a aplicações em pesquisa e teranóstico do câncer, algumas estratégias foram propostas no intuito de melhorar a seletividade de NPs, tais como a injeção intratumoral (LI et al. 2018) e a funcionalização da superfície das NPs com moléculas inertes ao meio biológico (ERNSTING et al. 2013; LI et al. 2018; LI; HUANG, 2008; XUE et al. 2018; YANG et al. 2014; ZHAO et al. 2017).

Atualmente a estratégia mais aceita é a funcionalização da superfície de NPs com moléculas, geralmente hidrossolúveis, que alteram algumas propriedades das NPs. Estudos revelam que a funcionalização é capaz de promover mudanças nos valores do potencial zeta das NPs, tornando-os neutros ( $\pm 10\text{mV}$ ), de promover o aumento do tamanho médio hidrodinâmico e a diminuição da ligação de proteínas plasmáticas, tais como as opsoninas, de forma que essas mudanças reduzem de maneira expressiva a fagocitose das NPs por células fagocitárias do fígado, baço e pulmões, conseqüentemente ocorre o aumento da biodisponibilidade e do tempo de circulação das NPs, permitindo que doses maiores das NPs sejam absorvidas pelo tecido tumoral (ERNSTING et al. 2013; LI; HUANG, 2008; XUE et al. 2018; YANG et al. 2014; ZHAO et al. 2017).

#### **3.4.6. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-ANGIOGÊNICA EM MODELO DE MEMBRANA CORIOALANTOICA DE EMBRIÃO DE GALINHA**

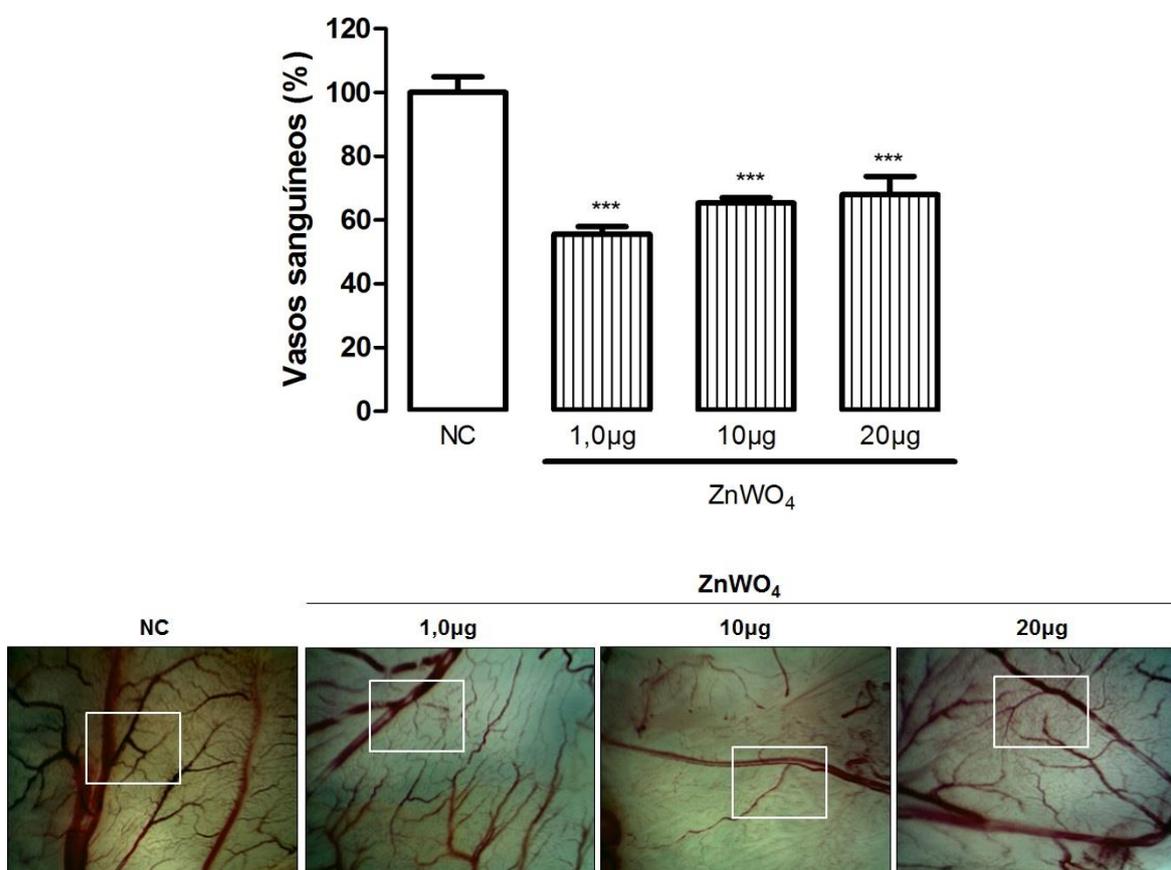
Considerando-se que o crescimento dos tumores sólidos depende da angiogênese (FOLKMAN; LONG; BECKER, 1963; FOLKMAN; COLE; ZIMMERMAN, 1966; FOLKMAN, 2001; HANAHAN; WEINBERG, 2000), que a redução da vasculatura ao redor de tumores sólidos contribui significativamente para a eficácia da terapia antitumoral (KUNJACHAN et al. 2015; TIAN et al. 2018) e que as NPs de tungstato de zinco radiomarcadas apresentaram elevada afinidade pelo tecido tumoral, propôs-se avaliar a eficiência das NPs de tungstato de zinco em reduzir a porcentagem de vasos sanguíneos por meio do ensaio de atividade anti-angiogênica em membrana corioalantoica de embrião de galinha.

A porcentagem de vasos sanguíneos na MCA após a aplicação das suspensões de NPs de  $\text{ZnWO}_4$  e solução salina fisiológica estéril ( $\text{NaCl}$  0,9% p/V, controle negativo - NC) é mostrada na Figura 47. A porcentagem de área média de vasos sanguíneos que permaneceu na

MCA após a aplicação de  $\text{ZnWO}_4$  1,0, 10,0 e 20,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $55,59 \pm 5,84$ ,  $65,36 \pm 3,89$ ,  $67,91 \pm 10,24$ , respectivamente) está representada na Figura 47.

Observou-se que houve diferença estatisticamente significativa, ao nível de  $p < 0,0001$ , nos grupos tratados com as dispersões de  $\text{ZnWO}_4$  quando comparado ao grupo controle, portanto, esses resultados sugerem que nanopartículas  $\text{ZnWO}_4$ , nas doses utilizadas nesse ensaio, inibem a angiogênese, *in vivo*, com ausência de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos pré-existentes (Figura 47-A).

**Figura 47** - Efeito do tratamento com nanopartículas de tungstato de zinco,  $\text{ZnWO}_4$ , (1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 20,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sobre a angiogênese em ensaio da membrana corioalantoica.



NC: Controle negativo (salina). Os valores foram calculados fixando-se o NC como 100%. As colunas representam a média  $\pm$  DP da área vascularizada (\*\* $p < 0,0001$  em relação ao grupo NC; ANOVA seguida de teste de Bonferroni;  $n = 5-10/\text{grupo}$ ). Fonte: SANTOS et al. 2018 (adaptado).

Nas últimas décadas, muitos estudos revelaram que a angiogênese patológica participa ativamente da patogênese, sintomas e, até mesmo, morte de um grupo de doenças chamadas

doenças dependentes da angiogênese, incluindo câncer, doenças autoimunes, aterosclerose e degeneração macular (FOLKMAN, 1971b; FOLKMAN 2007; HOEBEN et al. 2004; MAJUMDER; BHUNIA; CHAUDHURI, 2018; PONT et al. 2018; POTENTE; GERHARDT; CARMELIET, 2011). Assim, é constante o interesse de pesquisadores na descoberta de drogas com potencial pró ou anti-angiogênico e de sistemas nanoestruturados multifuncionais que permitam o diagnóstico e tratamento seletivo das doenças dependentes de angiogênese, focando principalmente o câncer, devido à alta morbidade e mortalidade associadas a essa doença (GHALAMFARSA et al. 2018; KIM et al. 2017; SATAPATHY et al. 2018; TIAN et al. 2017; ZHENG et al. 2017).

Conforme discutido anteriormente, o tamanho, a forma e o potencial zeta de NPs contribuem para o seu perfil farmacocinético. Nesse trabalho, NPs com potencial zeta negativo apresentaram efeito anti-angiogênico em modelo de MCA de embrião de galinha, sugerindo que as células endoteliais, principal alvo de ação de fármacos anti-angiogênicos (FOLKMAN, 2007) foram capazes de internalizar efetivamente as NPs, por mecanismos ainda não estabelecidos.

Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram com outros relatos da literatura sobre as propriedades anti-angiogênicas de nanopartículas de óxidos semicondutores (DIVYA et al. 2018; GURUNATHAN et al. 2009; KALISHWARALAL et al. 2011). Imai e cols. (2011) demonstraram efeito anti-angiogênico, de maneira dependente da concentração, de NPs de óxido de zinco, contudo os resultados não foram conclusivos visto que eles observaram também efeito citotóxico significativo do material em cultura de células da derme (IMAI et al. 2011).

Recentemente, Divya e cols. (2018) avaliaram as propriedades citotóxicas e anti-angiogênicas de nanopartículas de óxido de zinco. Eles demonstraram atividade citotóxica, em baixas concentrações, desse óxido contra a bactéria patogênica Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*, contra o fungo patogênico *Candida albicans* e contra células tumorais de hepatocarcinoma. Por fim, corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho, observaram que essas NPs também apresentam atividade anti-angiogênica no mesmo modelo experimental aqui utilizado, o ensaio de MCA (DIVYA et al. 2018).

Dessa maneira, os estudos relacionados às propriedades anti-angiogênicas devem ser acompanhados de ensaios de citotoxicidade do material, de maneira a se excluir a possibilidade de que o efeito anti-angiogênico seja correlacionado a efeito citotóxico. Nesse trabalho, os resultados do ensaio de angiogênese no modelo de MCA sugerem que o efeito anti-angiogênico apresentado pelas NPs testadas não está correlacionado com efeito

citotóxico, uma vez que não houve morte significativa dos embriões de galinha durante a realização dos experimentos.

Diante do exposto, demonstrou-se pela primeira vez que baixas doses de NPs desordenadas de  $ZnWO_4$  apresentam atividade anti-angiogênica em modelo de MCA, o que torna esse material promissor para futuras pesquisas envolvendo modelos animais de angiogênese e de tumores sólidos.

### 3.5. CONCLUSÃO PARCIAL

No presente trabalho, após a condução do preparo e avaliação da estabilidade de complexos radiomarcados de  $^{99m}\text{Tc-ZnWO}_4$ , foi demonstrado que NPs de tungstato de zinco originam complexos estáveis com tecnécio 99 metaestável, em solução fisiológica (NaCl 0,9% p/V) e em plasma de camundongo. Os estudos de biodistribuição revelaram intensa captação das nanopartículas pelo fígado, baço e pulmão, órgãos ricos em células fagocitárias que constituem a primeira linha de defesa do organismo contra substâncias estranhas. Os estudos em animais também revelaram importante participação renal na eliminação dessas NPs da circulação, provavelmente devido ao seu reduzido tamanho médio. Como consequência da rápida eliminação das NPs pelos rins, baço, fígado e pulmões foi demonstrado o tempo de meia vida bifásico para esse material, com a primeira fase rápida e a segunda fase lenta. Os resultados do ensaio de biodistribuição em animais com tumor revelaram excelente captação das NPs pelo tecido tumoral, a partir de 1h de administração endovenosa, os níveis do material no tumor superam os níveis plasmáticos, com pico de concentração após 24h.

Além disso, demonstrou-se pela primeira vez que baixas doses de NPs desordenadas de  $\text{ZnWO}_4$  apresentaram afinidade por vasos sanguíneos, com atividade anti-angiogênica, ou seja, essas NPs poderiam concentrar-se eficazmente nos capilares tumorais facilitando a ação de outras drogas e permitindo de maneira simultânea, ao tratamento, o diagnóstico de imagem de tumores sólidos.

## CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente trabalho demonstrou a obtenção de nanopartículas de tungstato de zinco com estrutura monoclinica e grupos espaciais P2/c, através do método hidrotermal assistido por micro-ondas abaixo de 150°C, com novas propriedades físicas e biológicas. Demonstrou-se pela primeira vez a emissão fotoluminescente de nanopartículas de ZnWO<sub>4</sub> na região amarelo-vermelho do espectro eletromagnético, provavelmente devido ao seu estado de ordem-desordem estrutural. Esse estudo demonstrou também que nanopartículas desordenadas de ZnWO<sub>4</sub> apresentam atividade anti-angiogênica e ausência de citotoxicidade para células normais, sugerindo que o efeito anti-angiogênico seja seletivo.

Adicionalmente, o presente trabalho demonstrou a capacidade de bioacumulação das nanopartículas de tungstato de zinco no tumor de Ehrlich induzido em camundongos Balb/C. Em conjunto, esses resultados apoiam a hipótese de que nanopartículas de tungstato de zinco são importantes candidatas para aplicações em sistemas multifuncionais para teranóstico do câncer.

## TRABALHOS FUTUROS

Como trabalhos futuros, propõe-se:

- 1) A realização de síntese de nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  através do método hidrotermal assistido por micro-ondas utilizando-se outros solventes polares com maiores valores de tangente de perda, tais como etilenoglicol, com o objetivo de reduzir o tempo e a temperatura de síntese do material;
- 2) A realização do ensaio de espectroscopia de absorção de raios X perto da estrutura da borda (XANES) para confirmar a existência de vacâncias de oxigênio e dos níveis intermediários de energia dentro do “band gap” nas nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  obtidas nesse trabalho;
- 3) A continuação dos ensaios de viabilidade celular de nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  em células normais HEK, com o objetivo de determinar a  $\text{IC}_{50}$  desse material;
- 4) Ensaio de viabilidade celular de nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  em outras linhagens de células normais;
- 5) A realização de ensaios de viabilidade celular de nanopartículas de  $\text{ZnWO}_4$  em linhagens de células tumorais.

## REFERÊNCIAS

- Aiello, L. P. et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. **The New England Journal of Medicine**, v. 331, p. 1480-1487, 1994.
- Anderson, C. J.; Welch, M. J. Radiometal-Labeled Agents (Non-Technetium) for Diagnostic Imaging. **Chemical Reviews**. v. 99, n. 9, p. 2219-2234, 1999.
- Anicete-Santos, M. et al. The Role of Short-Range Disorder in BaWO<sub>4</sub> Crystals in the Intense Green Photoluminescence. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, p. 12180–12186, 2011.
- Araújo, E. B. A utilização do elemento tecnécio-99m no diagnóstico de patologias e disfunções dos seres vivos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. n. 6, p. 31-35, 2005.
- Armstrong, A. F.; Valliant, J. F. Differences between the macroscopic and tracer level chemistry of rhenium and technetium: contrasting cage isomerisation behaviour of Re(I) and Assis, M.; et al. Towards the scale-up of the formation of nanoparticles on  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> with bactericidal properties by femtosecond laser irradiation. **Scientific Reports**. v. 8, n. 1884, 2018.
- ATCC**. Product Sheet 293 [HEK-293] (ATCC® CRL1573™). Virgínia: American Type Culture Collection. Disponível em: [www.atcc.org](http://www.atcc.org). Acesso em: 20 de outubro de 2018.
- Ausprunk, D. H.; Knighton, D. R.; Folkman, J. Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: A structural and autoradiographic study. **Developmental Biology**, v. 38, n. 2, p. 237-248, 1974.
- Barbosa, M. V. et al. Comparative study of firstderivate spectrophotometry and high performance liquid chromatography methods for quantification of paclitaxel in liposomal formulation. **Journal of Brazilian Chemical Society**. v. 26, n. 7, p. 1338–1343, 2015.
- Barreiro, E. J.; Fraga, C. A. M. **Química Medicinal: As Razões Moleculares da Ação dos Fármacos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed Ltda, 2015.
- Barui, A. K. et al. Zinc oxide nanoflowers make new blood vessels. **Nanoscale**. V. 4, p. 7861-7869, 2012.
- Basiev, T. T. et al. Spontaneous Raman spectroscopy of tungstate and molybdate crystals for Raman lasers. **Optical Materials**, v. 15, p. 205-216, 2000.
- BD FACSVerse**. Apostila do operador. São Paulo: BD Biosciences, 2011.
- Beik, J.; et al. Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: from fundamental principles to advanced applications. **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 205-221, 2016.

Bertrand, N. et al. Mechanistic understanding of in vivo protein corona formation on polymeric nanoparticles and impact on pharmacokinetics. **Nature Communications**, v. 8, n. 777, p. 1-8, 2017.

Bilecka, I.; Niederberger, M. Microwave chemistry for inorganic nanomaterials synthesis. **Nanoscale**, v. 2, n. 8, p. 1269–1528, ago. 2010.

Blanchard, Y.; Galati, G.; Genderen, P. The Cavity Magnetron: Not Just a British Invention. **IEEE Antennas and Propagation Magazine**, v. 55, n. 5, p. 244-254, out. 2013.

Bonanni, M. et al. Conversion of Colloidal ZnO–WO<sub>3</sub> Heteroaggregates into Strongly Blue Luminescing ZnWO<sub>4</sub> Xerogels and Films. **Chemistry of Materials**, v. 10, n. 1, p. 304-310, 1998.

Born, P. J.; Robertson, D. S.; Smith, P. W. The preparation and scintillation properties of zinc tungstate single crystals. **Journal of Luminescence**, v. 24/25, p. 131—136, 1981.

Botden, Th. P. J.; Kröger, F. A. Energy transfer in tungstates and molybdates activated with samarium. **Physica XV**, n. 8-9, p. 747-768, set. 1949.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed., v. 2. Brasília: ANVISA, 2010. 546 p.

BRASIL. Ministério da Saúde / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2015. 122 p.

Brice, J. C.; Whiffin, P. A. C. Solute striae in pulled crystals of zinc tungstate. **British Journal of Applied Physics**, v. 18, n. 5, p. 581-586. 1967.

Brik, M. G.; Nagirnyi, V.; Kirm, M. Ab-initio studies of the electronic and optical properties of ZnWO<sub>4</sub> and CdWO<sub>4</sub> single crystals. **Materials Chemistry and Physics**, v. 134, p. 1113-1120, 2012.

Burt, H. M.; et al. Controlled delivery of taxol from microspheres composed of a blend of ethylene-vinyl acetate copolymer and poly (d,l-lactic acid). **Cancer Letters**, v. 88, p. 73-79, 1995.

Buxton, I. L. O. Farmacocinética e farmacodinâmica: a dinâmica da absorção, distribuição, ação e eliminação dos fármacos. In: Editor: Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L.. Tradução: Cosendey, C. H. A. et al. **Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Porto Alegre: AMGH, 2010. cap. 1.

Byrappa, K.; Yoshimura, M. **Handbook of hydrothermal technology: a technology for crystal growth and materials processing**. [S. 1]: William Andrew, 2001.

Cabral, A. C.; et al. Photoluminescence properties of praseodymium doped cerium oxide nanocrystals. **Ceramics International**, v. 40, n. 3, p. 4445–4453, abr. 2014.

Callister Jr, W. D.; Rethwisch, D. G. **Materials Science and Engineering: An Introduction**. 8 th. John Wiley & Sons, Inc. 2010.

- Campos, A. B. et al. Mechanisms behind blue, green, and red photoluminescence emissions in CaWO<sub>4</sub> and CaMoO<sub>4</sub> powders. **Applied Physics Letters**, v. 91, p. 051923-1 - 051923-3, 2007.
- Canham, L. T. Silicon quantum wire array fabrication by electrochemical and chemical dissolution of wafers. **Applied Physics Letters**, v. 57, p. 1046-1048, 1990.
- Capeletti, L. B. et al. Tailored Silica-Antibiotic Nanoparticles: Overcoming Bacterial Resistance with Low Cytotoxicity. **Langmuir**. v. 30, n. 25, p. 7456-7464, 2014.
- Carmeliet, P. Blood vessels and nerves: common signals, pathways and disease. **Nature**, v. 4, n. 9, p. 710-20, 2003.
- Casals, E. et al. Physical stability of liposomes bearing hemostatic activity. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 125, p. 139–146, 2003.
- Cavalcante, L. S.; et al. Cluster coordination and photoluminescence properties of  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> Microcrystals. **Inorganic Chemistry**, v. 51, p. 10675-10687, 2012.
- Cavalcante, L.S. et al. A combined theoretical and experimental study of electronic structure and optical properties of b-ZnMoO<sub>4</sub> microcrystals. **Polyhedron**, v. 54, p. 13–25, 2013.
- Chabner, B. C.; et al. Agentes antineoplásicos. In: Editor: Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L.. Tradução: Cosendey, C. H. A. et al. **Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Porto Alegre: AMGH, 2010. cap. 51.
- Chen, D. et al. Low-temperature synthesis of metal tungstates nanocrystallites in ethylene glycol. **Materials Research Bulletin**. v. 38, p. 1783–1789, 2003.
- Chen, G. et al. Improved red emission by codoping Lip in ZnWO<sub>4</sub>:Eu<sup>3+</sup> phosphors. **Journal of Molecular Structure**. v. 1128, p. 1-4, 2017.
- Chen, S-J. et al. Fabrication of nanocrystalline ZnWO<sub>4</sub> with different morphologies and sizes via hydrothermal route. **Chemical Physics Letters**. v. 375, p. 185–190, 2003.
- Choi, H.S. et al. Renal clearance of quantum dots. **Nature Biotechnology**. v. 25, p. 1165–1170, 2007.
- Choi, J. et al. Targetable gold nanorods for epithelial cancer therapy guided by near-IR absorption imaging. **Small**. v. 8, n. 5, p. 746-53, 2012.
- Conway, E.; Collen, D.; Carmeliet, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. **Cardiovascular research**. v. 49, p. 507-521, 2001.
- Cullity, B. D. **Elements of X ray diffraction**. 2. th. Phillipines: Addison-Wesley Publishing Company, Inc. 1978. 569 p.
- Czupryna, J.; Tsourkas, A. Suicide gene delivery by calcium phosphate nanoparticles: a novel method of targeted therapy for gastric cancer. **Cancer Biology and Therapy**. v. 5, n. 12, p. 1691–1692, 2006.

- Da Paz, M. C. et al. Anti-CEA loaded maghemite nanoparticles as a theragnostic device for colorectal cancer. **International Journal of Nanomedicine**. v. 7; p. 5271-5282, 2012.
- Dai, R. C. et al. Characterizations, structure and optical properties of ZnWO<sub>4</sub>:Eu nanorods under high temperature. **Surface and interface analysis**. v. 46, p. 1151-1155, 2014.
- Danielsen, P. H. Et al. Endothelial cell activation, oxidative stress and inflammation induced by a panel of metal-based nanomaterials. **Nanotoxicology** (Early Online). p. 1–12, 2014.
- Daturi, M. et al. Vibrational and XRD study of the system CdWO<sub>4</sub>–CdMoO<sub>4</sub>. **The Journal of Physical Chemistry B**. v. 101, n. 22, p. 4358–4369, 1997.
- De Assis, D.N. et al. Release profiles and morphological characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy of <sup>99m</sup>Tc-technetium-fluconazole nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 349, n. 1–2, p. 152-160, fev. 2008.
- De Barros, A. L. B. et al. Emerging role of radiolabeled nanoparticles as an effective diagnostic technique. **EJNMMI Research**. v. 2, n. 39, p. 1-15, 2012.
- De Barros, A. L. B. et al. Synthesis, characterization, and biodistribution studies of <sup>99m</sup>Tc-labeled SBA-16 mesoporous silica nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**. v. 56, p. 181–188, 2015.
- De Santana, Y. V. B.; et al. Silver molybdate and silver tungstate nanocomposites with enhanced photoluminescence. **Nanomaterials and Nanotechnology**. v. 4, n. 22, p. 1-10, jul. 2014.
- Dedavid, B. A.; Gomes, C. I.; Machado, G. **Microscopia eletrônica de varredura** **microscopia eletrônica de varredura**: Aplicações e preparação de amostras. Porto Alegre: Edipucrs, 2007. 60 p.
- Ding Y. et al. The performance of thiol-terminated PEG-paclitaxel-conjugated gold nanoparticles. **Biomaterials**. v. 34, n. 38, p. 10217-10227, 2013.
- Divya, M. et al. Biopolymer gelatin-coated zinc oxide nanoparticles showed high antibacterial, antibiofilm and anti-angiogenic activity. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**. v. 178, p. 211-218, 2018.
- Dodd, A. et al. Mechanochemical synthesis of nanoparticulate ZnO-ZnWO<sub>4</sub> powders and their photocatalytic activity. **Journal of the European Ceramic Society**. v. 29, n. 1, p. 139-144, 2009.
- Dong, K. et al. Biocompatible and high-performance amino acids capped MnWO<sub>4</sub> nanocasting as a novel non-lanthanide contrast agent for X-ray computed tomography and T1-weighted magnetic resonance imaging. **Nanoscale**. V. 6, p. 2211-2217, 2014.
- Dubey, P. et al. Perturbation of cellular mechanistic system by silver nanoparticle toxicity: Cytotoxic, genotoxic and epigenetic potentials. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 221, p. 4–21, 2015.

Dudley, G. B.; Richert, R.; Stiegman, A. E. On the existence of and mechanism for microwave specific reaction rate enhancement. **Chemical Science**. v. 6, p. 2144-2152, 2015.

Dutta, D. P.; Raval, P. Effect of transition metal ion (Cr<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup>) doping on the

Ede, S. R. et al. Bio-molecule Assisted Aggregation of ZnWO<sub>4</sub> Nanoparticles (NPs) into Chain-like Assemblies: Material for High Performance Supercapacitor and as Catalyst for Benzyl Alcohol Oxidation. **Inorganic Chemistry**. v. 54, p. 3851–3863, 2015.

Elgrabli, D. Et al. Biodistribution and Clearance of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles in Rats after Intravenous Injection. **PLoS ONE**. v. 10, n. 4, p. 1-13, 2015.

Ernsting, M. J.; et al. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles. **Journal of Controlled Release**. v. 172, n. 3, p. 782-794, dez. 2013.

Fang C. et al. Functionalization of iron oxide magnetic nanoparticles with targeting ligands: their physicochemical properties and in vivo behavior. **Nanomedicine (Lond)**. V. 5, n. 9, p. 1357-1369, 2010.

Faria, D. L. A.; Santos, L. G. C.; Gonçalves, N. S. Uma demonstraco sobre o espalhamento inelstico de luz: repetindo o experimento de Raman. **Química Nova**. v. 20, n. 3, p. 319-323, 1997.

Foggi, C.C. et al. Synthesis and evaluation of  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> as novel antifungal agent. **Chemical Physics Letters**. v. 674, p. 125–129, 2017.

Folkman, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? **Nature Reviews. Drug Discovery**. v. 6, n. 4, p. 273-86, abr. 2007.

Folkman, J. et al. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 133, p. 275, 1971a.

Folkman, J. **Harrison's textbook of internal medicine**. 15th. Ed. Braunwald, E. et al. McGraw-Hill, New York, 2001.

Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **The New England Journal of Medicine**. v. 285, n. 21, p. 1182-1186, 1971b.

Folkman, J.; Cole, P.; Zimmerman, S. Tumor behavior in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. **Annals of Surgery**. v. 164, n. 3, p. 491-502, set. 1966.

Folkman, J.; Haudenschild, C. C.; Zetter, B. R. Long-term culture of capillary endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A**. v. 76, n. 10, p. 5217-5221, 1979.

Folkman, J.; Klagsbrun, M. Angiogenic Factors. **Science**. v. 235, p. 442-447, jan. 1987.

Folkman, J.; Long, D. Jr.; Becker F. F. Growth and metastasis of tumor in organ culture. **Cancer**. v. 16, p. 453-467, abr. 1963.

Fomichev, V. V.; Kondratov, O. I. Vibrational spectra of compounds with the wolframite structure. **Spectrochimica Acta**. v. 50A, n. 6, p. 1113-1120, 1994.

Fu, H.; et al. Photocatalytic activities of a novel ZnWO<sub>4</sub> catalyst prepared by a hydrothermal process. **Applied Catalysis A: General**. v. 306, p. 58–67, 2006.

Garadkar, K.M. et al. A facile synthesis of ZnWO<sub>4</sub> nanoparticles by microwave assisted technique and its application in photocatalysis. **Materials Research Bulletin**. v. 48, p. 1105–1109, 2013.

Gedye, R. et al. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. **Tetrahedron Letters**. v. 27, n. 3, p. 279-282, 1986.

Ghalamfarsa, G. et al. Anti-angiogenic effects of CD73-specific siRNA-loaded nanoparticles in breast cancer-bearing mice. **Journal of Cellular Physiology**. v. 233, n. 10, p. 7165-7177, 2018.

Giesecke, J. **Modern Infectious Disease Epidemiology**. 2. ed. London: Arnold, 2002

Giguere, R. J.; Bray, T. L.; Duncan, M. S. Application of comercial microwave ovens to organic synthesis. **Tetrahedron Letters**. v. 27, n. 41, p. 4945-4948, 1986.

Gonzalez, F. J.; Tukey, R. H. Metabolismo dos fármacos. In: Editor: Brunton, L. L.; Lazo, J. S.; Parker, K. L. Tradução: Cosendey, C. H. A. et al. **Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Porto Alegre: AMGH, 2010. cap. 3.

Gordon, R.T.; Hines, J.R.; Gordon, D. Intracellular hyperthermia a biophysical approach to cancer treatment via intracellular temperature and biophysical alterations. **Medical Hypotheses**. v. 5, p. 83-102, 1979.

Gospodarowicz, D.; et al. Clonal growth of bovine vascular endothelial cells: fibroblast growth factor as a survival agent. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 73, n. 11, p. 4120–4124, nov. 1976.

Gref, R.; et al. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. **Science**. v. 263, p. 1600–1603, 1994.

Guinier, A. Diffraction by an imperfect crystal lattice. **X-Ray Diffraction**. New York: Dover Publications, cap. 6, p.151-184, 1994.

Guo J. et al. Aptamer-functionalized PEG-PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery. **Biomaterials**. v. 32, n. 31, p. 8010-8020, 2011.

Gurunathan, S.; et al. Antiangiogenic properties of silver nanoparticles. **Biomaterials**. n. 30, p. 6341–6350, 2009.

Hanahan, D.; Weinberg, R. The hallmarks of cancer. **Cell**. v. 100, p. 57-70, 2000.

He, G.; et al. Synthesis, characterization and optical properties of nanostructured ZnWO<sub>4</sub>. **Materials Science in Semiconductor Processing**. v. 41, p. 404–410, 2016.

Helmus, M. N.; Gibbons, D. F.; Cebon, D. Biocompatibility: Meeting a Key Functional Requirement of Next-Generation Medical Devices. **Toxicologic Pathology**. v. 36, p. 70-80, 2008.

Hertig, A. T. Angiogenesis in the early human chorion and in the primary placenta of the macaque monkey. **Contributions to Embryology**. v. 25, p. 37–81, 1935.

Hoeben, A. et al. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. **Pharmacological Reviews**. v. 56, n. 4, p. 549–580, 2004.

Huang, G.; Zhang, C.; Zhu, Y. ZnWO<sub>4</sub> photocatalyst with high activity for degradation of organic contaminants. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 432, p. 269–276, 2007.

Huang, Y. et al. Hierarchical porous ZnWO<sub>4</sub> microspheres synthesized by ultrasonics spray pyrolysis: Characterization, mechanistic and photocatalytic NO<sub>x</sub> removal studies. **Applied Catalysis A: General**. v. 515, p. 170–178, 2016.

Imai, K.; et al. Effects of cell viability and *in vitro* angiogenesis with nanostructured zinc oxide. **Nano Biomedicine**. v. 3, n. 1, p. 237-241, 2011.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **World Cancer Report 2014**. Edited by BERNARD W. STEWART and CHRISTOPHER P. WILD. Lyon, 2014.

ISO 10993-5. **Biological evaluation of medical devices** - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 3 th. Geneva: ISO, 2009. 42 p.

Jaffe, E. A.; et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 52, p. 2745-2756, nov. 1973.

Jin, S.; Ye, K. Nanoparticle-mediated drug delivery and gene therapy. **Biotechnology Progress**. v. 23, p. 32–41, 2007.

Johnston, H. J.; et al. Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO<sub>2</sub> particulates: the contribution of physicochemical characteristics. **Particle and Fibre Toxicology**. v. 6, n. 33, p. 1-27, 2009.

Jones, P. F.; Sleeman, B. D. Angiogenesis—understanding the mathematical challenge. **Angiogenesis**. v. 9, p. 127–138, 2006.

Jung, S. et al Theragnostic pH-sensitive gold nanoparticles for the selective surface enhanced Raman scattering and photothermal cancer therapy. **Analytical Chemistry**. v. 85, n. 16, p. 7674-7681, 2013.

Jurisson, S.; Cutler, C.; Smith, S. V. Radiometal complexes: characterization and relevant in vitro studies. **The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**. V. 52, n. 3, p. 222-234, 2008.

Kalinko, A.; Kuzmin, A. Raman and photoluminescence spectroscopy of zinc tungstate powders. **Journal of Luminescence**. 129: 1144–1147, 2009.

Kalinko, A.; Kuzmin, A. Static and dynamic structure of ZnWO<sub>4</sub> nanoparticles. **Journal of Non Crystalline Solids**. v. 357, p. 2595–2599, 2011.

Kalishwaralal, K. et al. Gold nanoparticles inhibit vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability via Src dependent pathway in retinal endothelial cells. **Angiogenesis**. v. 14, p. 409–410, 2011.

Kalishwaralal, K. et al. Silver nanoparticles inhibit VEGF induced cell proliferation and migration in bovine retinal endothelial cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, p. 51–57, 2009.

Kapse-Mistry, S. et al. Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells. **Frontiers in Pharmacology**. V. 5, n. 159, p. 1-22, 2014.

Kaufmann, S. H. E. Paul Ehrlich: founder of chemotherapy. **Nature Review Drug Discovery**. v. 7, n. 5, p. 373, 2008.

Ke, J. et al. Significantly enhanced visible light photocatalytic activity and surface plasmon resonance mechanism of Ag/AgCl/ZnWO<sub>4</sub> composite. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**. v. 395, p. 276–282, 2014.

Khawar, I. A.; Kim, J. H.; Kuh, H. J. Improving drug delivery to solid tumors: priming the tumor microenvironment. **Journal of Controlled Release**. v. 201, p. 78-89, 2015.

Kim, M. G. et al. Synergistic anti-tumor effects of bevacizumab and tumor targeted polymerized VEGF siRNA nanoparticles. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 1-7, 2017.

Kim, S. M.; Faix, P. H.; Schnitzer, J. E. Overcoming key biological barriers to cancer drug delivery and efficacy. **Journal of Controlled Release**. v. 267, p. 15-30, 2017.

Klagsbrun, M.; Knighton, D.; Folkman, J. Tumor angiogenesis activity in cells grown in tissue culture. **Cancer Research**. v. 36, n. 1, p. 110-114, jan. 1976.

Kloprogge, J. T. et al. Microwave-assisted and characterization of divalent metal tungstate nanocrystalline minerals: ferberite, hübnerite, sanmartinite, scheelite and stolzite. **Materials Chemistry and Physics**. v. 88, p. 438-443, 2004.

Knoll, A. et al. A comparison of two controlled-release delivery systems for the delivery of amiloride to control angiogenesis. **Microvascular Research**. v. 58, p. 1-9, 1999.

Kolluru, L. P. et al. Formulation development of albumin based theragnostic nanoparticles as a potential delivery system for tumor targeting. **Journal of Drug Targeting**. v. 21, n. 1, p. 77-86, 2013.

Komarneni, S.; Li, Q. H.; Roy, R. Microwave-hydrothermal processing for synthesis of layered and network phosphates. **Journal Materials Chemistry**. v. 4, p. 1903-1906, 1994.

Komarneni, S.; Pidugu, R.; Li, Q. H.; Roy, R. Microwave-hydrothermal processing of metal powders. **Journal of Materials Research**. v. 10, p. 1687-1692, 1995.

Komarneni, S.; Roy, R.; Li, Q. H. Microwave-hydrothermal synthesis of ceramic powders. **Materials Research Bulletin**. v. 27, p. 1393-1405, 1992.

Kossatz, S. et al. Efficient treatment of breast cancer xenografts with multifunctionalized iron oxide nanoparticles combining magnetic hyperthermia and anti-cancer drug delivery. **Breast Cancer Research**. V. 17, n. 66, p. 1-17, 2015.

Kröger, F. A. Inorganic Crystal Phosphors. **Ergebnisse der Exakten Naturwissenschaften**, p. 61-144, 1956.

Kröger, F. A. Luminescence of solid solutions of the system  $\text{CaMoO}_4\text{-PbMoO}_4$  and of some other systems. **Philips Research Reports**. v. 2, p. 183-189, 1947a.

Kröger, F. A. Photoluminescence in the quaternary system  $\text{MgWO}_4\text{-ZnWO}_4\text{-MgMoO}_4\text{-ZnMoO}_4$ . **Philips Research Reports**. v. 2, p. 177-182, 1947b.

Kröger, F. A. The role of imperfection chemistry in the characterization of materials. **Materials Research Bulletin**. v. 2, p. 203-216, 1967.

Kröger, F. A. The temperature dependence of the fluorescence of tungstates and molybdates in relation to the perfection of the lattice. **Philips Research Reports**. v. 2, p. 340-348, 1947c.

Kröger, F. A.; Urbach, F. Some Aspects of the Luminescence of Solids. **Physics Today**. v. 1, n. 7, p. 24, 1948.

Kröger, F. A.; Vink, H. J. Relations between the concentrations of imperfections in solids. **Journal Physics and Chemistry of Solids (Pergamon Press)**. v. 5. p. 208-223, 1958.

Kumar, R. D.; Andou, Y.; Karuppuchamy, S. Microwave-assisted synthesis of  $\text{Zn-WO}_3$  and  $\text{ZnWO}_4$  for pseudocapacitor applications. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**. v. 92, p. 94-99, fev. 2016.

Kunjachan, S. et al. Nanoparticle mediated tumor vascular disruption: a novel strategy in radiation therapy. **Nano Letters**. p. 1-26, set. 2015.

Kwon, K. C. et al. Superparamagnetic Gold Nanoparticles Synthesized on Protein Particle Scaffolds for Cancer Theragnosis. **Advanced Materials**. v. 29, n. 1701146, p. 1-9, 2017.

Lago, V.D. et al. Size-selective silver nanoparticles: future of biomedical devices with enhanced bactericidal properties. **Journal of Materials Chemistry**. v. 21, p. 12267-12273, 2011.

Lamprecht, A.; et al. Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization-emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 184, p. 97-105, 1999.

Lee, S-J. Functionalized Magnetic PLGA Nanospheres for Targetin and Bioimaging of Breast Cancer. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v. 18, p. 1542-1547, 2018.

- Leite, E. R. et al. Amorphous Lead Titanate: a New Wide-band Gap Semiconductor with Photoluminescence at Room Temperature. **Advanced Materials For Optics And Electronics**. v. 10, n. 6, p. 235-240, 2000.
- Li, C. et al. Enhancement of gas-sensing abilities in p-type ZnWO<sub>4</sub> by local modification of Pt nanoparticles. **Analytica Chimica Acta**. v. 927, p. 107-116, 2016.
- Li, H. et al. Multifunctional Aptamer-Silver Conjugates as Theragnostic Agents for Specific Cancer Cell Therapy and Fluorescence-Enhanced Cell Imaging. **Analytical Chemistry**. v. 87, n. 7, p. 3736–3745, 2015.
- Li, M-M. et al. Biodistribution and toxicity assessment of intratumorally injected arginine–glycine–aspartic acid peptide conjugated to CdSe/ZnS quantum dots in mice bearing pancreatic neoplasm. **Chemico-Biological Interactions**. v. 291, p. 103–110, 2018.
- Li, S.; Huang, L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**. v. 5, p. 496–504, 2008.
- Li, W-J. et al. Growth mechanism and growth habit of oxide crystals. **Journal of Crystal Growth**. v. 203, p. 186-196, 1999.
- Lin, C. et al. Anti-tumor activity of self-charged (Eu,Ca):WO<sub>3</sub> and Eu:CaWO<sub>4</sub> nanoparticles. **Bulletin of Materials Science**. v. 35, n. 5, p. 767–772, 2012.
- Lin, S.; et al. Fabrication and photocatalysis of mesoporous ZnWO<sub>4</sub> with PAMAM as a template. **Materials Research Bulletin**. v. 44, p. 1102–1105, 2009.
- Liu, D.; Mori, A.; Huang, L. Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1104, n. 1, p. 95-101, 1992.
- Liu, Z. et al. A facile microwave-hydrothermal method to fabricate B doped ZnWO<sub>4</sub> nanorods with high crystalline and highly efficient photocatalytic activity. **Materials Research Bulletin**. v. 94, p. 298–306, 2017.
- Longo, E. et al. Toward an understanding of the growth of Ag filaments on  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> and their photoluminescent properties: a combined experimental and theoretical study. **The Journal of Physical Chemistry C**. v. 118, p. 1229–1239, 2014.
- Longo, V. M. et al. Strong violet-blue light photoluminescence emission at room temperature in SrZrO<sub>3</sub>: joint experimental and theoretical study. **Acta Materialia**. v. 56, n. 10, p. 2191-2201, 2008.
- Longo, V. M. et al. Understanding the origin of photoluminescence in disordered Ca<sub>0.60</sub>Sr<sub>0.40</sub>WO<sub>4</sub>: An experimental and first-principles study. **Chemical Physics**. v. 334, p. 180–188, 2007.
- Longo, V. M.; et al. Potentiated electron transference in  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> microcrystals with Ag nanofilaments as microbial agent. **The Journal of Physical Chemistry A**. v. 118, p. 5769–5778, 2014.

Lugrin, J. et al. The role of oxidative stress during inflammatory processes. **Biological Chemistry**. v. 395, n. 2, p. 203-30, 2014.

Maczka, M. et al. Lattice dynamics and temperature-dependent Raman and infrared studies of multiferroic  $\text{Mn}_{0.85}\text{Co}_{0.15}\text{WO}_4$  and  $\text{Mn}_{0.97}\text{Fe}_{0.03}\text{WO}_4$  crystals. **Physical Review B**. v. 83, p. 174439-1 - 174439-14, 2011.

Maeda, H. et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **Journal of Controlled Release**. v. 65, p.271–284, 2000.

Maeda, H.; Tsukigawa, K.; Fang, J. A Retrospective 30 Years After Discovery of the Enhanced Permeability and Retention Effect of Solid Tumors: Next-Generation Chemotherapeutics and Photodynamic Therapy—Problems, Solutions, and Prospects. **Microcirculation**. v. 23, p. 173–182, 2016.

Mager, M. D.; LaPointe, V.; Stevens, M. M. Exploring and exploiting chemistry at the cell surface. **Nature Chemistry**.v. 3, p. 582-589, 2011.

Maier-Hauff, K. et al. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. **Journal of Neuro-Oncology**. v. 103, p. 317–324, 2011.

Majumder, P.; Bhunia, S.; Chaudhuri, A. A lipid-based cell penetrating nano-assembly for RNAi-mediated anti-angiogenic cancer therapy. **Chemical Communications (Cambridge, England)**. v. 54, n. 12, p. 1489-1492, 2018.

Mancheva, M.; Iordanova, R.; Dimitriev, Y. Mechanochemical synthesis of nanocrystalline  $\text{ZnWO}_4$  at room temperature. **Journal of Alloys and Compounds**. v. 509, n. 1, p. 15-20, jan. 2011.

Marangoni, V.S.; Cancino-Bernardi, J.;Zucolotto, V. Synthesis, Physico-Chemical Properties, and Biomedical Applications of Gold Nanorods—A Review. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v. 12, p. 1136–1158, 2016.

Marques, F. L. N.; Okamoto, M. R. Y.; Buchpiguel, C. A. Alguns Aspectos Sobre Geradores E Radiofármacos De Tecnécio-99m E Seus Controles De Qualidade. **Radiologia Brasileira**. v. 34, n. 4, p. 233–239, 2001.

Matsumura, Y.; Maeda, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. **Cancer Research**. v. 46, p. 6387-6392, 1986.

Mazzo, T.M. **Propriedade fotoluminescente dos materiais  $\text{CaTiO}_3$  e  $\text{Ca}_{1-x}\text{Eu}_x\text{TiO}_3$** . Tese. Araraquara, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 2011.

Moghimi, S. M.; Hunter, A. C. Capture of stealth nanoparticles by the body's defences. **Critical Review in Therapeutics Drug Carrier Systems**. v. 18, n. 6, p. 527-50, 2001.

- Monteiro, L. O. F. et al. Paclitaxel-loaded folate-coated long circulating and pH-sensitive liposomes as a potential drug delivery system: A biodistribution study. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 97, p. 489–495, 2018.
- Monteiro, L. O. F. et al. Technetium-99m radiolabeled paclitaxel as an imaging probe for breast cancer in vivo. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 89, p. 146–151, 2017.
- Moura, F. et al. Intense photoluminescence emission at room temperature in calcium copper titanate powders. **Ceramics International**. v. 39, p. 3499–3506, 2013.
- Nagayama, S. et al. Time-dependent changes in opsonin amount associated on nanoparticles alter their hepatic uptake characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 342, n. 1-2, p. 215-21, 2007.
- Najafi-Hajivar, S. et al. Overview on experimental models of interactions between nanoparticles and the immune system. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 83, p. 1365–1378, 2016.
- Nakamoto, K. **Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds**. 6 th. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2009. 424 p.
- Nel, A. Implementation of alternative test strategies for the safety assessment of engineered nanomaterials. **Journal of Internal Medicine**, v. 274, n. 6, p. 561–577, 2013.
- Nikolaenko, T. N.; Hizhnyi, Y. A.; Nedilko, S. G. Excited states of the luminescence centers in tungstate crystals. **Journal of Luminescence**. v. 128, p. 807–810, 2008.
- Oda, C. M. R. et al. Synthesis, characterization and radiolabeling of polymeric nano-micelles as a platform for tumor delivering. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 89, p. 268-275, 2017.
- Oi, T.; Takagi, K.; Fukazawa, T. Scintillation study of ZnWO<sub>4</sub> single crystals. **Applied Physics Letters**. v. 36, p. 278-279, 1980.
- Olerile, L. D. et al. Near-infrared mediated quantum dots and paclitaxel co-loaded nanostructured lipid carriers for cancer theragnostic. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 150, p. 121–130, 2017.
- Orhan, E. Et al. Conditions giving rise to intense visible room temperature photoluminescence in SrWO<sub>4</sub> thin films: the role of disorder. **Chemical Physics**. v. 312, p. 1–9, 2005a.
- Orhan, E. et al. Towards an insight on the photoluminescence of disordered CaWO<sub>4</sub> from a joint experimental and theoretical analysis. **Journal of Solid State Chemistry**. v. 178, p. 1284–1291, 2005b.
- Otrock, Z. K.; et al. Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. **Blood Cells, Molecules & Diseases**. v. 39, n. 2, p. 212-220, set.-out. 2007.

Owens, D. E.; Peppas, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 307, n. 1, p. 93-102, 2006.

Papagiannopoulou, D. Technetium-99m radiochemistry for pharmaceutical applications. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**. v. 60, n. 11, p. 502-520, 2017.

Parhi, P.; Karthik, T.N.; Manivannan, V. Synthesis and characterization of metal tungstates by novel solid-state metathetic approach. **Journal of Alloys and Compounds**. v. 465, p. 380–386, 2008.

Park, G.E.; Webster, T. J. A review of nanotechnology for the development of better orthopedic implants. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v. 1, p. 18–29, 2005.

Patra, H. K.; Turner, A. P.F. The potential legacy of cancer nanotechnology: cellular selection. **Trends in Biotechnology**. v. 32, n. 1, p. 21-31, 2014.

Peer, D. et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**. v. 2, n. 12, p. 751-60, 2007.

Pereira, P. F. S. et al. ZnWO<sub>4</sub> nanocrystals: synthesis, morphology, photoluminescence and photocatalytic Properties. **Physical Chemistry Chemical Physics**. v. 20, p. 1923—1937, 2018.

Perreux, L.; Loupy, A. A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium and mechanistic considerations. **Tetrahedron**. v. 57, n. 588, p. 9199-9223, 2001.

Perugini, P.; et al. Effect of nanoparticle encapsulation on the photostability of the sunscreen agent, 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 246, p. 37–45, 2002.

Phani, A. R.; et al. Structural characterization of bulk ZnWO<sub>4</sub> prepared by solid state method. **Journal of Materials Science**. v. 35, p. 4879 -4883, 2000.

Phillips, W. T. Delivery of gamma-imaging agents by liposomes. **Advanced drug delivery reviews**, v. 37, p. 13-32, 1999.

photocatalytic properties of ZnWO<sub>4</sub> nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**. v. 357, p. 193-200, 2018.

Pinatti, I. M.; et al. CaTiO<sub>3</sub> and Ca<sub>1-3x</sub>Sm<sub>x</sub>TiO<sub>3</sub>: Photoluminescence and morphology as a result of hydrothermal microwave methodology. **Ceramics International**. v. 42, p. 1352–1360, 2016.

Pisarevskii, Y. V.; et al. Elastic and Acoustic Properties of ZnWO<sub>4</sub> Single Crystal. **Physica Status Solidi A**. v.107, p. 161-164, 1988.

Pont, I. et al. Anti-angiogenic drug loaded liposomes: Nanotherapy for early atherosclerotic lesions in mice. **PLoS One**. v. 13, n. 1, p. e0190540 (1-11), 2018.

Pontes, F. M.; et al. The role of network modifiers in the creation of photoluminescence in CaTiO<sub>3</sub>. **Materials Chemistry and Physics**. v. 78, n. 1, 227-233, 2003.

Portney, N. G.; Ozkan, M. Nano-oncology: drug delivery, imaging, and sensing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 384, p. 620–630, 2006.

Potente, M.; Gerhardt, H.; Carmeliet, P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. **Cell**. v. 146, n. 6, p. 873-887, set. 2011.

Powder Diffract. File, **JCPDS International Centre Diffracton**. Data, PA 19073-3273, USA, 2001.

Prow, T.; et al. Nanoparticle tethered biosensors for autoregulated gene therapy in hyperoxic endothelium. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. v. 2, n. 4, p. 276, 2006.

Pullar, R. C.; Farrah, S.; Alford, N. M. MgWO<sub>4</sub>, ZnWO<sub>4</sub>, NiWO<sub>4</sub> and CoWO<sub>4</sub> microwave dielectric ceramics. **Journal of the European Ceramic Society**. v. 27, p. 1059 -1063, 2007.

Rahimi-Nasrabadi, M.; et al. Electrosynthesis and characterization of zinc tungstate nanoparticles. **Journal of Molecular Structure**. v. 1047, p. 31–36, 2013.

Rao, L. et al. In-situ growth of zinc tungstate nanorods on graphene for enhanced photocatalytic performance. **Materials Research Bulletin**. v. 57, p. 41–46, 2014.

Rissau, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**. v. 386, n. 6626, p. 671-674, abr. 1997.

Roca, R.A. et al. Facet-dependent photocatalytic and antibacterial properties of  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> crystals: combining experimental data and theoretical insights. **Catalysis Science & Technology**. v. 5, p. 4091–4107, 2015.

Rocha, L. S. R.; et al. Novel ozone gas sensor based on ZnO nanostructures grown by the microwave-assisted hydrothermal route. **Ceramics International**. v. 42, p. 4539–4545, 2016.

Roduner, E. **Nanosopic materials: Size-dependent phenomena and growth principles**. 2. th. Cambridge, The Royal Society of Chemistry, 2014. 439 p.

Santos, C. J. et al. Antiangiogenic evaluation of ZnWO<sub>4</sub> nanoparticles synthesised through microwave-assisted hydrothermal method. **Journal of Drug Targeting**. v. 26, n. 9, p. 806-817. 2018.

Satapathy, S. R. et al. Metallic gold and bioactive quinacrine hybrid nanoparticles inhibit oral cancer stem cell and angiogenesis by deregulating inflammatory cytokines in p53 dependent manner. **Nanomedicine**. v. 14, n. 3, p. 883-896, 2018.

Satchi-Fainaro, R.; et al. Inhibition of vessel permeability by TNP-470 and its polymer conjugate, caplostatin. **Cancer Cell**. v. 7, n. 3, p. 251-261, abr. 2005.

Schofield, P. F.; Knight, K. S.; Cressey, G. Neutron powder diffraction study of the scintillator material ZnWO<sub>4</sub>. **Journal Of Materials Science**. v. 31, p. 2873-2877, 1996.

Schofield, P. F.; Redfern, S. A. T. Ferroelastic phase transition in the sanmartinite ( $\text{ZnWO}_4$ ) – cuproscheelite ( $\text{CuWO}_4$ ) solid solution. **Journal of Physics Condensed Matter**. v. 4, p. 375-388, 1992.

Sebaugh, J. L. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. **Pharmaceutical Statistics**. v. 10, n. 2, p. 128-34, 2011.

Segal, D. **Chemical synthesis of advanced ceramic materials**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.

Selvamani, M. et al.  $\text{Ag}@\text{Ag}_8\text{W}_4\text{O}_{16}$  nanoroasted rice beads with photocatalytic, antibacterial and anticancer activity. **Materials Science and Engineering: C**. v. 60, p. 109-118, mar. 2016.

Sengul, H.; Theis, T. L.; Ghosh, S. Toward Sustainable Nanoproducts An Overview of Nanomanufacturing Methods. **Journal of Industrial Ecology**. v. 12, n. 3, p. 329-359. 2008.

Seo, H. et al. Hyperpolarized Porous Silicon Nanoparticles: Potential Theragnostic Material for  $^{29}\text{Si}$  Magnetic Resonance Imaging. **Chemphyschem: a European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry**. v. 19, n. 17, p. 2143-2147, 2018.

Shapira, A. et al. Nanomedicine for targeted cancer therapy: towards the overcoming of drug resistance. **Drug Resistance Update**. V. 14, n. 3, p. 150-63. 2011.

Shi, J.; et al. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. **Nature Reviews Cancer**. p.1-18, 2016.

Shriver, D. F. et al. **Química inorgânica**. Tradução Roberto de Barros Faria et al. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008. 848 p.

Shubayev, V. I.; Pisanic, T. R.; Jin, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 61, n. 6, p. 467–477, 2009.

Sigmund, W.; Maneeratana, V.; Hsu, A-H (Eds.). Powder characterization. In: RIEDEL, R.; CHEN, I-W. **Ceramics science and technology**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co., 2012. p. 339-368.

Silva, L. F.; et al. Acetone gas sensor based on  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$  nanorods obtained via a microwave-assisted hydrothermal route. **Journal of Alloys and Compounds**. v. 683, p. 186-190, 2016.

Siriwong, P. et al. Hydrothermal synthesis, characterization and optical properties of wolframita  $\text{ZnWO}_4$  nanorods. **CrysEngComm**. v. 13, p. 1564-1569, 2011.

Skoog, D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Ed. Thomson, 2005. 1124p.

Smith, J. E. et al. Aptamer-Conjugated Nanoparticles for the Collection and Detection of Multiple Cancer Cells. **Analytical Chemistry**. V. 79, n. 8, p. 3075-3082, 2007.

Smith, W. F.; Hashemi, J. **Foundations of Materials Science and Engineering**. 5. th. New York: Mc-Graw Hill, 2009. 1088 p.

Soares, D. C. F. et al. Liposomes radiolabeled with  $^{159}\text{Gd}$ -DTPA-BMA: Preparation, physicochemical characterization, release profile and in vitro cytotoxic evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 42, p. 462–469, 2011.

Song, X. C.; et al. Photocatalytic activities of Cd-doped  $\text{ZnWO}_4$  nanorods prepared by a hydrothermal process. **Journal of Hazardous Materials**. v. 179, p. 1122–1127, 2010.

Souza, A. E. et al. Photoluminescence of barium-calcium titanates obtained by the microwave-assisted hydrothermal method (MAH). **Chemical Physics Letters**. v. 488, n. 54, 2010.

Armstrong, A. F.; Valliant, J.F. Differences between the macroscopic and tracer level chemistry of rhenium and technetium: contrasting cage isomerisation behaviour of  $\text{Re(I)}$  and  $\text{Tc(I)}$  carborane complexes. **Dalton Transactions**. v. 39, p. 8128–8131, 2010.

THE INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. IUPAC periodic table of the elements. Durham, 2016.

Tian, F. et al. A targeted nanoplatform co-delivering chemotherapeutic and antiangiogenic drugs as a tool to reverse multidrug resistance in breast cancer. **Acta Biomaterialia**. v. 75, p. 398-412, 2018.

Tobío, M.; et al. Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration. **Pharmaceutical Research**. v. 15, p. 270–275, 1998.

Tony, P. et al. Toxicidade e eficiência do dimetilsulfóxido (DMSO) no congelamento de células madin-darby bovine kidney (MDBK). **Science And Animal Health**. v. 3, n.2, p. 159-168, jul/dez 2015.

Ulrich, A.S. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicle. **Bioscience Reports**. v. 22, p. 129–150, 2002.

**USP 36-NF 34**. The United States Pharmacopoeia National Formulary, United States Pharmacopoeial Convention Inc., Rockville, 2016.

Uthaman, S.; Huh, K. M.; Park, I-K. Tumor microenvironment-responsive nanoparticles for cancer theragnostic applications. **Biomaterials Research**. v. 22, n. 22, p. 1-11, 2018.

Van Minh, N. et al. Structural and optical properties of  $\text{ZnWO}_4:\text{Er}^{3+}$  Crystals. **Journal of Spectroscopy**. 2013, p. 1-5.

Vargas, A. et al. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 59, n. 11, p. 1162–1176, set. 2007.

Wen, F-S. et al. Hydrothermal synthesis and photoluminescent properties of  $\text{ZnWO}_4$  and  $\text{Eu}^{3+}$ -doped  $\text{ZnWO}_4$ . **Materials Letters**. v. 55, p. 152–157, jul-2002.

Williams, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**. v. 29, n. 20, p. 2941-2953, jul. 2008.

Wojciechowska, C. et al. 2014. Oxidative Stress Markers and C-Reactive Protein Are Related to Severity of Heart Failure in Patients with Dilated Cardiomyopathy. **Mediators of Inflammation**. v. 2014, p. 10-10, 2014.

Wood, D. L.; Tauc, J. Weak Absorption Tails in Amorphous Semiconductors. **Physical Review B**. v. 5, n. 8, p. 3144-3151, 1972.

Wu, C. et al. Single Wavelength Light-Mediated, Synergistic Bimodal Cancer Photoablation and Amplified Photothermal Performance by Graphene/Gold Nanostar/Photosensitizer Theranostics. **Acta Biomaterialia**. v. 15, n. 53, p. 631-642, 2017.

Xue, W. et al. Effects of core size and PEG coating layer of iron oxide nanoparticles on the distribution and metabolism in mice. **International Journal of Nanomedicine**. v. 13, p. 5719-5731, 2018.

Yamase, T.; Fujita, H.; Fukushima, K. Medical Chemistry of Polyoxometalates. Part 1. Potent Antitumor Activity of Polyoxomolybdates on Animal Transplantable Tumors and Human Cancer Xenograft. **Inorganica Chimica Acta**. v. 151, p. 15-18, 1988.

Yan, B.; Lei, F. Molten salt synthesis, characterization and luminescence of  $\text{ZnWO}_4:\text{Eu}^{3+}$  nanophosphors. **Journal of Alloys and Compounds**. v. 507, p. 460-464, 2010.

Yan, J. et al. Development of facile drug delivery platform of ranibizumab fabricated PLGA-PEGylated magnetic nanoparticles for age-related macular degeneration therapy. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**. v. 183, p. 133-136, 2018.

Yang, L.; et al. Size Dependent Biodistribution and Toxicokinetics of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles in Mice. **Nanoscale**. v. 7, n. 2, p. 625-636, 2015.

Yang, T. et al. Liposome formulation of paclitaxel with enhanced solubility and stability. **Drug Delivery**. v. 14, n. 5, p. 301-308, 2007.

Yang, Y. et al. Toxicity and biodistribution of aqueous synthesized ZnS and ZnO quantum dots in mice. **Nanotoxicology**. v. 8, n. 1, p. 107-116, 2014.

Yoo, D. et al. Theranostic Magnetic Nanoparticles. **Accounts Of Chemical Research**. v. 44, n. 10, p. 863-874, 2011.

You, L. et al. Humidity sensing properties of nanocrystalline  $\text{ZnWO}_4$  with porous structures. **Sensors and Actuators B**. v. 161, p. 799-804, 2012.

Yu, C.; Yu, J. C. Sonochemical fabrication, characterization and photocatalytic properties of  $\text{Ag}/\text{ZnWO}_4$  nanorod catalyst. **Materials Science and Engineering: B**. v. 164, n. 1, p. 16-22, ago. 2009.

Yu, M.; Zheng, J. Clearance Pathways and Tumor Targeting of Imaging Nanoparticles. **ACS Nano**. v. 9, n. 7, p. 6655-6674, 2015.

Yu, S-H. et al. General synthesis of single-crystal tungstate nanorods/nanowires: a facile, low-temperature solution approach. **Advanced Functional Materials**. v. 13, n. 8, p. 639–647, ago. 2003.

Yuan, F. et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: Molecular size dependence and cutoff size. **Cancer Research**. v. 55, p. 3752-3756, set. 1995.

Zhai, Y. et al. Fabrication and Luminescent properties of  $\text{ZnWO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$  white light-emitting phosphors. **Journal of Luminescence**. v. 172, p. 161–167, 2016.

Zhang, J. et al. pH-sensitive polymeric nanoparticles for co-delivery of doxorubicin and curcumin to treat cancer via enhanced pro-apoptotic and antiangiogenic activities. **Acta Biomaterialia**. V. 58, p. 349–364, 2017.

Zhao, J. et al. Zwitterionic stealth peptide-protected gold nanoparticles enable long circulation without the accelerated blood clearance phenomenon. **Biomaterials Science**. v. 6, n. 1, p. 200-206, 2017.

Zheng T. et al. Tumor-targeting templated silica nanoparticles as a dual-drug delivery system for anti-angiogenic ovarian cancer therapy. **Experimental and Therapeutic Medicine**. v. 14, n. 3, p. 2162-2170, 2017.

Zheng, J. C.; et al. Nanoscale disorder and local electronic properties of  $\text{CaCu}_3\text{Ti}_4\text{O}_{12}$ : an integrated study of electron, neutron, and x-ray diffraction, x-ray absorption fine structure, and first-principles calculations. **Physical Review B**. v. 81, n. 14, p. 1-19, 2010.

Zhu, L. et al. Chitosan-coated magnetic nanoparticles as carriers of 5-fluorouracil: preparation, characterization and cytotoxicity studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**.v. 68, n. 1, p. 1-6, 2009.

Ziessman, H. A.; O'Malley, J. P.; Thrall, J. H. **Nuclear Medicine: The requisites**. 4. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2014.

## ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Nanopartículas de tungstato, radiomarcadas com tecnécio-99m, para aplicação em tumores", protocolo do CEUA: 376/2016 sob a responsabilidade de Andre Luis Branco de Barros que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 27/03/2017.

Vigência do Projeto (requerida pelo pesquisador)	30/03/2017 a 15/03/2020
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	4
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	CEBIO - UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	14
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	CEBIO - UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	42
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	CEBIO - UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	14
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	CEBIO - UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	42
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	feminino
Origem	CEBIO - UFMG
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	14
Peso/Idade	25g / 8(semanas)