

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**ELBERTH MANFRON SCHIEFER**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DE OURO NO  
SENSORIAMENTO DE TOXINAS URÊMICAS POR MEIO DE TÉCNICAS DE  
ESPECTROSCOPIA ÓTICA E APLICAÇÃO DO MODELO PIX2PIX NO ENSAIO  
DE MIGRAÇÃO CELULAR**

**TESE**

**CURITIBA**

**2023**

**ELBERTH MANFRON SCHIEFER**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DE OURO NO  
SENSORIAMENTO DE TOXINAS URÊMICAS POR MEIO DE TÉCNICAS DE  
ESPECTROSCOPIA ÓTICA E APLICAÇÃO DO MODELO PIX2PIX NO ENSAIO  
DE MIGRAÇÃO CELULAR**

**Evaluation of the role of silver and gold nanoparticles in the sensing of uremic  
toxins through optical spectroscopy techniques and application of the pix2pix  
model in the cell migration assay.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e Informática Industrial (CPGEI) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) como requisito à obtenção do título de "Doutor em Ciências" - Área de concentração: Fotônica em Engenharia.

Orientador: Prof. Dr. José Luis Fabris.  
Coorientadora: Prof.(a) Dr.(a) Andrea Stingenhen

**CURITIBA**

**2023**



Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Campus Curitiba



ELBERTH MANFRON SCHIEFER

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E DE OURO NO SENSORIAMENTO DE TOXINAS URÊMICAS POR MEIO DE TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA ÓTICA E APLICAÇÃO DO MODELO PIX2PIX NO ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR**

Trabalho de pesquisa de doutorado apresentado como requisito para obtenção do título de Doutor Em Ciências da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Fotônica Em Engenharia.

Data de aprovação: 31 de Março de 2023

Dr. Jose Luis Fabris, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dr. Eduardo Fontana, Doutorado - Universidade Federal de Pernambuco (Ufpe)

Dr. Felype De Carvalho Barreto, Doutorado - Universidade Federal do Paraná (Ufpr)

Dra. Marcela Mohallem Oliveira, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Marcia Muller, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 31/03/2023.

## **AGRADECIMENTOS**

Este trabalho só foi possível de ser realizado devido ao esforço contínuo dos Professores Doutores que me acompanharam durante este período. Dentre eles, os Professores Doutores José Luis Fabris, Andréa Emília Marques Stingham, Lucas Hermann Negri, Marcia Muller e Wesley Maurício de Souza. Da mesma maneira, meus colegas Lays de Carvalho Seixas Costa e Regiane Stafim da Cunha foram indispensáveis para a conclusão deste trabalho.

À minha segunda metade, Andressa Flores Santos, por estar ao meu lado em todos os e-mails, dores, sofrimentos e alegrias advindas deste capítulo da minha vida.

Aos meus pais Eduard Schiefer e Marcelia Manfron e ao casal Oldemar Alves Santos e Claudia Flores Santos que tanto me apoiaram emocionalmente neste percurso.

À UTFPR e à UFPR que me serviram de casa pelos últimos 10 anos.

Ao governo do Brasil que me permitiu cursar tanto o Mestrado quanto o Doutorado por meio de bolsas de pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Turn your wounds into wisdom.  
Oprah Winfrey

## RESUMO

SCHIEFER, Elberth Manfron. **Avaliação do papel de nanopartículas de prata e de ouro no sensoriamento de toxinas urêmicas por meio de técnicas de espectroscopia ótica e aplicação do modelo pix2pix no ensaio de migração celular**. 2023. 97 f. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica e Informática Industrial) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2023.

Este trabalho propõe um sensor colorimétrico baseado em nanopartículas metálicas para quantificação de toxinas urêmicas ligadas a proteínas (PBUTs), assim como a aplicação do modelo pix2pix no aprimoramento do ensaio de migração celular. Na doença renal crônica (CKD) os rins perdem de maneira parcial ou total a capacidade de remoção de toxinas urêmicas (UTs) da circulação sanguínea, que comumente seriam excretados pela urina, resultando em uma maior concentração destes compostos no sangue. Esta condição se chama uremia e está fortemente associada a diversos efeitos deletérios no organismo, dentre eles as doenças cardiovasculares (DCV), principal causa de morte dos pacientes acometidos pela doença. A migração celular também pode ser afetada pela uremia. A fim de compreender e avaliar estes efeitos, se faz necessário monitorar e quantificar as concentrações de UTs em meios biológicos, assim como avaliar a capacidade de adesão e migração celular. Foram realizados experimentos de produção, caracterização e fotoconversão de nanopartículas, que permitiram observar que a relação da Ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) e o tamanho médio das NPs quase-esféricas produzidas nas condições testadas não corroboraram com alguns artigos encontrados na literatura. O tamanho médio das nanopartículas de prata (AgNPs) e de ouro (AuNPs) próximo aos primeiros 20 min de ablação a laser pulsado em líquido (PLAL) diminuiu apesar do desvio da LSPR para o vermelho, sendo acompanhado pelo acréscimo da temperatura da solução. Com base nesses ensaios foi desenvolvido um sensor com AgNPs capaz de detectar concentrações urêmicas e normais de PBUTs, como o indoxil sulfato (IS) e p-cresil sulfato (PCS) com o uso de técnicas de espectroscopia ótica. A resposta do sensor a interferentes como a ureia e creatinina também foi avaliada e se mostrou reduzida quando comparada com a resposta do sensor frente as PBUTs, estando dentro do erro do controle mesmo após exposição ao peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Para o melhoramento do ensaio de migração celular foi aplicado o modelo pix2pix, uma rede neural capaz de reduzir o viés humano na análise do experimento, a qual automatizou o processo de análise, e se mostrou eficiente na minimização ou eliminação do viés da análise manual.

**Palavras-chave:** Nanopartículas; Sensoriamento; Ressonância plasmônica de superfície localizada; Colorimetria; Toxinas urêmicas.

## ABSTRACT

SCHIEFER, Elberth Manfron. **Evaluation of the role of silver and gold nanoparticles in the sensing of uremic toxins through optical spectroscopy techniques and application of the pix2pix model in the cell migration assay.** 2023. 97 p. Thesis (Doctorate in Electrical Engineering and Industrial Informatics) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2023.

This work proposes a colorimetric sensor based on metallic nanoparticles for quantification of protein-bound uremic toxins (PBUTs), as well as the application of the pix2pix model in the improvement of the cell migration assay. In chronic kidney disease (CKD), the kidneys partially or completely lose their ability to remove uremic toxins (UTs) from the bloodstream, which would normally be excreted through the urine, resulting in a higher concentration of these compounds in the blood. This condition is called uremia and is strongly associated with several deleterious effects in the body, among them cardiovascular disease (CVD), the leading cause of death in patients affected by the disease. Cell migration can also be affected by uremia. In order to understand and evaluate these effects, it is necessary to monitor and quantify the concentrations of TUs in biological media, as well as to evaluate the capacity of cell adhesion and migration. Experiments of production, characterization and photoconversion of nanoparticles were performed, which allowed the observation that the ratio of localized surface plasmon resonance (LSPR) and the average size of the quasi-spherical NPs produced under the tested conditions did not corroborate with some articles found in the literature. The average size of the silver nanoparticles (AgNPs) and gold nanoparticles (AuNPs) near the first 20 min of pulsed laser ablation in liquid (PLAL) diminished although the LSPR redshifted, which was followed by the increase of the solution temperature. Based on these assays, a AgNPs sensor capable of detecting uremic and normal concentrations of PBUTs, such as indoxyl sulfate (IS) and p-cresyl sulfate (PCS) was developed using optical spectroscopy techniques. The sensor response to interferents such as urea and creatinine was also evaluated and was shown to be reduced when compared to the sensor response to PBUTs, being within the control error even after exposure to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). To improve the cell migration assay, the pix2pix model was applied, a neural network capable of reducing human bias in the analysis of the experiment, which automated the analysis process, and proved efficient in minimizing or eliminating the bias of manual analysis.

**Keywords:** Nanoparticles; Sensing; Localized surface plasmon resonance; Colorimetry; Uremic toxins.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Valores de  $\sigma_{ext}$  obtidos para AgNPs (a) e para AuNPs (b) de raios variando de 2 a 12 nm de acordo com a Equação 6. ....25
- Figura 2 - Valores de  $\sigma_{ext}$  para o caso *core@shell* de NPs de 10 nm de raio com capeamentos de citrato de sódio com espessuras de 0 (de acordo com as Equações 6 e 16, *core*), 3, 6, 9 e 12 nm (de acordo com as Equações 19 e 20, *core* e *shell*) para a prata (a) e para o ouro (b). ....28
- Figura 3 - Instrumentação utilizada no processo de ablação a laser (PLAL) no Laboratório de Laser (LabLaser) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. ....37
- Figura 4 - Instrumentação utilizada no processo de obtenção dos espectros de extinção das soluções coloidais de nanopartículas de prata e ouro no Laboratório de Laser (LabLaser) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. ....38
- Figura 5 - Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL JEM 1200EX-II do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná. Equipamento utilizado para fotografar e aferir o tamanho e formato de nanopartículas de prata. ....39
- Figura 6 - Equipamento de espalhamento dinâmico de luz (Nano DLS) do Laboratório de Biopolímeros (BIOPOL) da Universidade Federal do Paraná, utilizado para aferir o tamanho médio das nanopartículas de prata e ouro. ....39
- Figura 7 - Equipamento (Stabino Microtrac) para aferição de pH e potencial zeta das soluções coloidais de nanopartículas de prata e ouro. ....40
- Figura 8 - Características do hardware. (a) Irradiâncias dos LEDs. (b) Temperatura e umidade relativa no interior da câmara. ....41
- Figura 9 - Demonstração do funcionamento do sensor baseado na oxidação de Cit-AgNPs. ....44
- Figura 10 - Etapas do algoritmo desenvolvido para obter o conjunto de dados verdade a partir de imagens de entrada brutas. Essas etapas incluem redimensionamento, desfoque gaussiano, ajustes automáticos de brilho e contraste, limite adaptável e método de detecção de bordas Canny. ....46

Figura 11 - Efeitos da alteração dos valores das variáveis em cada uma das 7 etapas do algoritmo na imagem de saída e na área ocupada calculada da imagem. .....	47
Figura 12 - Treinando um pix2pix para mapear a imagem de entrada para a imagem em preto e branco.....	48
Figura 13 - LSPR (a) posição do pico, (b) densidade óptica máxima do pico, (c) temperaturas do ambiente e da solução, (d) tamanho médio das Cit-AgNPs aferido por DLS (DLSd), (e) potencial Zeta e pH e (f) estratificação das cores das soluções coloidais. Notas: As linhas representam ajustes logísticos dos dados. *P < 0.05 e **P < 0.01. ....	52
Figura 14 - Resultados de MET e correlações de Pearson para 6, 10, 13, 16 e 20 min de PLAL.....	54
Figura 15 - Matriz de correlação de Pearson para tempos de exposição ao PLAL superior a 23 min, dadas as correlações na faixa de cores conforme apresentado na barra de cores (lado direito).....	55
Figura 16 - LSPR (a) posição do pico, (b) densidade óptica máxima do pico, (c) temperaturas do ambiente e da solução, (d) tamanho médio das Cit-AuNPs aferido por DLS (DLSd), (e) potencial Zeta e pH e (f) estratificação das cores das soluções coloidais. ....	57
Figura 17 - Matrizes de correlação de Pearson de (a) 6, 10, 13, 16, 20 e 23 min de PLAL e de (b) 26, 30, 33, 36 e 40 min de PLAL fornecidas na faixa de cores conforme apresentado na barra de cores (lado direito) para AgNPs.....	59
Figura 18 - Análises MET de duas alíquotas de uma única solução coloidal ablada submetida a LIPS.. ....	60
Figura 19 - Seis amostras de soluções coloidais (T3 – T8) avaliadas em 24, 48 e 72 h de exposição ao aparelho.....	61
Figura 20 - Imagens MET de AgNPs submetidas ao LIPS com as cores das soluções abaixo delas (a) R/G = 1,06, R/B = 1,33 (T3, 0,00 mM, 48 h), (b) R/G = 1,10, R/B = 1,27 (T7, 0,00 mM, 72 h), (c) R/G = 0,99, R/B = 0,99 (T7, 1,71 mM, 24 h), e (d) R/G = 1,32, R/B = 1,34 (T8, 0,57 mM, 24 h). ....	62
Figura 21 - Mapa de calor da razão de cor para $\alpha$ , $\beta$ , $\mu$ , $\nu$ e $\xi$ (desvio percentual de $\lambda$ , FW HM, wG/wL, A e OD, respectivamente.....	64

Figura 22 - LSPR de Cit-AgNPs obtidas com uma taxa de aumento de temperatura de $(0,02 \pm 0,01) \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ .....	66
Figura 23 - OD a 405 nm de acordo com a concentração de $\text{H}_2\text{O}_2$ para ambos Cit-AgNPs + BSA com e sem IS 236 mg/L, Cit-AgNPs com IS 236 mg/L, e a diferença entre Cit-AgNPs + BSA com e sem IS (valor absoluto). .....	68
Figura 24 - Curva de resposta do sensor dada em termos de razão OD (antes e depois da inserção de 40% (v/v) de $\text{H}_2\text{O}_2$ (0,35%)) em função da concentração de PBUTs em amostras Cit-AgNPs + BSA 0,36%.....	69
Figura 25 - Representação esquemática do sensoriamento de toxinas urêmicas ligadas a proteína com o uso de nanopartículas de prata (AgNPs).....	71
Figura 26 - Concentrações de metabólitos e seu efeito no sensor de acordo com o tempo de exposição ao peróxido de hidrogênio. ....	74
Figura 27 - Desvio médio das saídas GT de todo o conjunto de dados para as imagens do (a) conjunto de dados de treinamento e (b) conjunto de dados de teste processado pelos modelos. ....	76
Figura 28 - Imagens processadas pelo e90 que apresentaram diferenças médias superiores a 10% quando comparadas com saídas do GT. ....	77
Figura 29 - Erro médio das 120 áreas ocupadas resultantes do processamento de e90 para o conjunto de dados de teste invertido e girado.. ....	78
Figura 30 - Média e desvio padrão da média da diferença de peso do Eppendorf vazio e com a presença do pellet de AgNPs para AgNPs produzidas com 20 e 30 min de PLAL. ....	79
Figura 31 - Média e desvio padrão da média da migração celular analisada pelo modelo pix2pix para 24, 48 e 72h. ....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estadiamento da doença renal crônica (CKD). .....	30
Tabela 2 - Características de sensores colorimétricos baseados em AgNPs encontrados na literatura. ....	32
Tabela 3 - Concentrações de toxinas urêmicas <i>ex vivo</i> como descritas por (EUTOX, 2023). ....	44
Tabela 4 - Tratamentos usados no ensaio de migração celular. ....	49
Tabela 5 - Relação de sensibilidade do sensor com o tempo de exposição ao PLAL. Valores obtidos a partir da Figura 7c. ....	70
Tabela 6 - Sensibilidades ( $\delta$ ) de sensores para PBUTs obtidas da literatura. ....	72
Tabela 7 - Características metrológicas do sensor. ....	73
Tabela 8 - Relação de ODs entre compostos e CTRL. ....	74
Tabela 9 - Resposta linear da relação de ODs entre 2 e 10 min. ....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

AgNP	Acrônimo do inglês para <i>Silver Nanoparticle</i>
AuNP	Acrônimo do inglês para <i>Gold Nanoparticle</i>
BSA	Acrônimo do inglês para <i>Bovine Serum Albumin</i>
Cit-AgNPs	Nanopartículas de prata capeadas com citrato de trissódio
Cit-AuNPs	Nanopartículas de ouro capeadas com citrato de trissódio
CID	Acrônimo do inglês para <i>Chemical Interface Damping</i>
CKD	Acrônimo do Inglês para <i>Chronic Kidney Disease</i>
DHT11	Acrônimo do inglês para <i>Digital Humidity and Temperature Sensor 11</i>
DLS	Acrônimo do Inglês para <i>Dynamic Light Scattering</i>
FWHM	Acrônimo do Inglês para <i>Full Width at Half Maximum</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HPLC	Acrônimo do inglês para <i>High-performance Liquid Chromatography</i>
IS	Indoxil sulfato
LED	Acrônimo do inglês para <i>Light-Emitting Diode</i>
LIPS	Acrônimo do inglês para <i>Low-Intensity Plasmon-Mediated Synthesis</i>
LoD	Acrônimo do inglês para <i>Limit of Detection</i>
LoQ	Acrônimo do inglês para <i>Limit of Quantification</i>
LSPR	Acrônimo do inglês para <i>Localized Surface Plasmon Resonance</i>
METd	Diâmetro Médio aferido por Microscopia Eletrônica de Transmissão
MS	Acrônimo do inglês para <i>Mass Spectrometry</i>
Nd:YAG	Acrônimo do inglês para <i>Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet</i>
NP	Nanopartícula
NPBUT	Toxinas urêmicas não ligadas a proteínas
OD	Acrônimo do inglês para <i>Relative Optical Density</i>
PBUT	Acrônimo do inglês para <i>Protein-bound Uremic Toxin</i>
PCS	p-Cresil sulfato
PLAL	Acrônimo do inglês para <i>Pulsed Laser Ablation in Liquids</i>
SERS	Acrônimo do inglês para <i>Surface-enhanced Raman Scattering</i>
SPA	Acrônimo do inglês para <i>Surface Plasmon Absorbance</i>
SPR	Acrônimo do inglês para <i>Surface Plasmon Resonance</i>
UT	Acrônimo do inglês para <i>Uremic Toxin</i>
UV-Vis	Ultravioleta e Visível

PS	Acrônimo do inglês para Photo-mediated Synthesis
NPRs	Nanoprismas
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão

## LISTA DE SÍMBOLOS

A	Área
B	Azul
D	Diâmetro [mm]
F	Razão f - Razão da variação entre o grupo para a variação dentro do grupo
G	Verde
L	Ordem multipolar
P	Significância
R	Vermelho
S	Sinal
$\mathcal{R}$	Correlação de Pearson
$R^2$	Coeficiente de determinação
$r$	Raio
$\psi_L$	Função esférica de Riccati
$\eta_L$	Função esférica de Bessel
$\sigma_{esp}$	Seção reta de espalhamento
$\sigma_{ext}$	Seção reta de extinção
$\sigma_{abs}$	Seção reta de absorção
K	Vetor de onda incidente
$k$	Número de onda
$k_e$	Coeficiente de extinção
$n$	Índice de refração complexo da esfera
$n_e$	Número de elétrons
$n_m$	Índice de refração real da esfera
$\lambda$	Comprimento de onda
$\xi$	Sensibilidade
I	Posição do pico
wG	Largura Gaussiana
wL	Largura Lorentziana

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
1.1	OBJETIVO GERAL.....	17
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
1.3	ESTRUTURA DO DOCUMENTO.....	18
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
2.1	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS .....	19
2.2	FOTOCONVERSÃO DE NPs.....	19
2.3	CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS.....	21
2.4	CARACTERÍSTICAS DE Au E Ag.....	22
2.5	ABSORÇÃO DE PLASMON DE SUPERFÍCIE (SPA).....	22
2.5.1	Modelo de Mie .....	23
2.5.2	Fatores diversos que influenciam a SPA.....	25
2.5.3	Modelo de Mie para NPs esféricas tipo <i>core@shell</i> .....	26
2.5.4	Sensoriamento a partir da SPA .....	28
2.6	ESPALHAMENTO RAMAN REALÇADO POR SUPERFÍCIE (SERS) ...	29
2.7	A DOENÇA RENAL CRÔNICA (CKD) .....	30
2.7.1	Sensoriamento de toxinas urêmicas (UTs).....	31
2.7.2	Toxinas urêmicas e as células endoteliais .....	33
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>37</b>
3.1	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NPs.....	37
3.2	FOTOCONVERSÃO DE NPs.....	40
3.2.1	Análise dos impactos das características intrínsecas da amostra no processo de fotoconversão .....	42
3.3	SENSORIAMENTO COLORIMÉTRICO DE UTs COM USO DE AgNPs .....	42
3.4	APLICAÇÃO DO MODELO PIX2PIX NO ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	45
3.4.1	Conjunto de dados .....	45
3.4.2	Conjunto de dados verdade .....	45
3.4.3	Pix2pix.....	48

<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
4.1	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NPs.....	51
4.1.1	Produção e caracterização de AgNPs.....	51
4.1.2	Produção e caracterização de AuNPs.....	56
4.2	FOTOCONVERSÃO DE NPs.....	60
4.2.1	Repetibilidade do aparelho.....	60
4.2.2	Avaliação de múltiplas amostras submetidas ao aparelho.....	61
4.3	SENSORIAMENTO COLORIMÉTRICO DE UTs COM USO DE AgNPs .....	65
4.4	APLICAÇÃO DO MODELO PIX2PIX NO ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	75
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>6</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>PUBLICAÇÕES .....</b>	<b>84</b>
7.1	ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS E ANAIS DE CONGRESSOS.....	84
7.2	ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS E ANAIS DE CONGRESSOS - PARCERIAS.....	84
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Entre as funções básicas dos rins, está a excreção de toxinas metabólicas que devem ser eliminadas do corpo (CLARK *et al.*, 2019). Pacientes com doença renal crônica (CKD), caracterizada pela perda progressiva da função renal, sofrem de acúmulo destas toxinas na corrente sanguínea, condição conhecida como uremia (VANHOLDER, 2003, AMABILE *et al.*, 2011, MACIEL *et al.*, 2018). A uremia está relacionada a diversas patologias como desnutrição, anemia, atrofia dérmica, dislipidemia, acidose metabólica, processo inflamatório e doenças cardiovasculares (GO *et al.*, 2004, VANHOLDER *et al.*, 2005, VANHOLDER; LAECKE; GLORIEUX, 2008). Atualmente, já foram identificados mais de 150 compostos urêmicos que estão relacionados a esses efeitos deletérios como, por exemplo, indoxil sulfato, p-cresilsulfato, ácido indolacético e hipurato (VANHOLDER *et al.*, 2003; VANHOLDER *et al.*, 2005), sendo denominados de toxinas urêmicas (UTs).

Métodos para quantificar UTs, como indoxil sulfato (IS) e p-cresil sulfato (PCS) de soro requerem, por exemplo, espectrômetros de massa ou sistemas de cromatografia líquida de alta pressão (SMET *et al.*, 1998, LIN *et al.*, 2019). Apesar de precisos e exatos, esses métodos não são custo-efetivos, exigindo a utilização de equipamentos específicos. Além disso, requerem procedimentos, há muito descritos na literatura, para um adequado isolamento e purificação de certas moléculas (SCHIEFER *et al.*, 2021, ELLINGER; PRUTZ, 1903, EUA, 1984).

Nanopartículas (NPs) vem sendo utilizadas como uma alternativa no sensoriamento de biomoléculas, o que indica a possibilidade de uso para o sensoriamento e quantificação de UTs. Estas NPs são partículas com tamanhos variando de 1 a 100 nm (tamanho próximo às macromoléculas biológicas, como enzimas e receptores) que apresentam também alterações de propriedades de acordo com seu diâmetro. NPs podem ser usadas como sondas quando cobertas com peptídeos, anticorpos e/ou ácidos nucleicos para detectar alterações moleculares relacionadas a processos patológicos. NPs metálicas possuem amplo campo de aplicação que inclui o monitoramento de células *in vitro* e exames de imagens *in vivo* (NAVAS-MORENO *et al.*, 2017).

Elementos do grupo IB (CAS) ou, como definido recentemente, o Grupo 11 (IUPAC) são um grupo de metais de transição que incluem cobre (Cu), prata (Ag) e

ouro (Au) (LIPSHUTZ; YAMAMOTO, 2008). Metais deste grupo são comumente utilizados na produção de NPs devido à sua baixa reatividade e à sua alta estabilidade como, no caso do ouro, ou devido ao uso de passivantes (TAURAN *et al.*, 2013). A principal característica que leva alguns materiais a assumirem papéis predominantes nesta área de estudo, principalmente as NPs de Au (AuNPs) e as NPs de Ag (AgNPs), é a absorção de plasmon de superfície (SPA), que tem uma seção transversal de extinção de  $10^5$  a  $10^6$  vezes maior que os cromóforos moleculares comuns e também é mais intensa que a de outras partículas de metais, devido ao fraco acoplamento às transições interbandas. A frequência do SPA tanto de AuNPs quanto de AgNPs pode ser ajustada do visível ao infravermelho próximo, quando agindo na forma, tamanho ou montagem das nanopartículas (AMENDOLA, 2008).

Ainda na CKD, há um aumento no risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) devido a diversos fatores, sendo um deles a disfunção endotelial. O endotélio vascular é o revestimento celular interno de artérias, veias e capilares e sofre devido a exposição às UTs. Um dos modos de avaliar os efeitos desta exposição é a análise da capacidade de migração das células endoteliais. Esta avaliação é feita por meio do ensaio *in vitro* de migração celular, conhecido como *wound healing* ou ensaio de cicatrização de feridas. Esse ensaio é amplamente utilizado em pesquisas na área, porém apresenta limitações quanto a obtenção de resultados rápidos e fidedignos, principalmente, devido ao viés humano que está presente na avaliação dos resultados obtidos.

Uma alternativa para otimização deste ensaio é o uso de redes neurais e redes adversárias geradoras (GANs) como, por exemplo, o modelo pix2pix, que faz uso da inteligência artificial (IA) para obtenção e análise de resultados. Ainda são escassos os trabalhos que otimizam ensaios laboratoriais fazendo o uso de IA (ISOLA *et al.*, 2017).

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Nesse sentido, este trabalho propõe desenvolver um sensor colorimétrico baseado em NPs metálicas para quantificar IS e PCS, reduzindo custos e complexidade de análise, assim como aplicar o modelo pix2pix no ensaio de migração celular, o tornando eficiente e fidedigno.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir e caracterizar nanopartículas de prata (AgNPs) e ouro (AuNPs) para realização do sensoriamento;
- Foto converter nanopartículas de prata (AgNPs) a fim de avaliar a interferência do tamanho e formato das NPs nas características da solução coloidal;
- Desenvolver o sensor colorimétrico de toxinas urêmicas (UTs) com o uso de AgNPs;
- Aplicar o modelo pix2pix no ensaio de migração celular.

## 1.3 ESTRUTURA DO DOCUMENTO

O presente trabalho utiliza a seguinte estrutura: revisão de literatura, onde são descritos os conceitos básicos utilizados para descrever os problemas e soluções referentes a temática proposta e também são discutidos trabalhos anteriores realizados na área; metodologia, onde material, métodos e laboratórios utilizados para a realização da produção, caracterização e fotoconversão de nanopartículas (NPs) e sensoriamento de toxinas urêmicas foram descritos, assim como os equipamentos necessários para a utilização do modelo pix2pix; resultados e discussão, neste item são apresentados os resultados da produção, caracterização e fotoconversão de NPs, o esquema de sensoriamento de toxinas urêmicas baseado em NPs, e os resultados da aplicação do modelo pix2pix no ensaio de migração celular, tanto para a etapa de treinamento quanto para a etapa de teste; conclusão, são apresentadas as conclusões do presente do trabalho com base nos itens descritos anteriormente; o trabalho é finalizado com os itens de perspectivas futuras e publicações, onde são citados possíveis desenvolvimentos futuros e publicações advindas do doutorado.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS

Para sintetizar NPs metálicas, existem basicamente três rotas principais, a rota biológica (por exemplo, com o uso de compostos bioativos (AMINI, 2019), a química e a física. As rotas se separam em dois grandes grupos conhecidos como *top-down* e *bottom-up*, onde a primeira parte da substância pura que é fracionada até que suas partes possuam tamanhos nanométricos e a segunda parte dos constituintes da substância para formá-la como um todo já em tamanho nanométrico (IQBAL *et al.*, 2012). Contudo, uma técnica *top-down* com resultados reprodutíveis e que faz uso de um aparato relativamente simples é conhecida como ablação a laser em líquidos. Esta técnica foi desenvolvida em 1993 (NEDDERSEN *et al.*, 1993) e é utilizada até hoje em diversos materiais com uma ampla variedade de solventes (AMENDOLA; MENEGHETTI, 2009).

A ablação a laser também pode ser realizada com laser pulsado e então a técnica passa a ser chamada de ablação a laser pulsado em líquido (PLAL), a qual é baseada na fragmentação do alvo submerso no solvente induzida pelo laser e é caracterizada pela emissão visível de plasma e pela produção de ondas de choque e de bolhas de cavitação. Com o colapso da bolha, as NPs, que são produzidas durante a fase de resfriamento do plasma, podem se difundir no líquido circundante e formar uma solução coloidal (DELL'AGLIO *et al.*, 2015) de NPs quase-esféricas.

Algumas variáveis que podem alterar a solução coloidal final na PLAL são a potência, o comprimento de onda, duração do pulso e o tempo de exposição ao laser, a temperatura ambiente e, claro, o passivante e o solvente. Um substrato (agente surfactante ou capeador) amplamente utilizado para NPs é o citrato de trissódio, um sal que, quando em solução, provê íons negativamente carregados que se ligam às NPs e tendem a impedir o processo de agregação destas (NANOMETAL, 2018).

### 2.2 FOTOCONVERSÃO DE NPs

A primeira prova experimental de fotoconversão (PS) mudando a forma de NPs foi descrita pela primeira vez em 1983 com intensidade de luz incidente de  $1 \text{ W/cm}^2$  (CHEN; OSGOOD, 2003). A PS guiada por um único comprimento de onda levou à

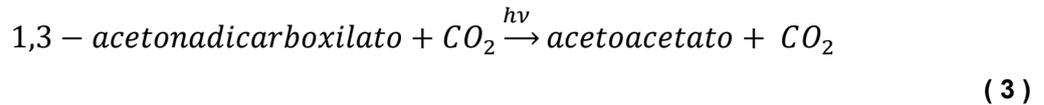
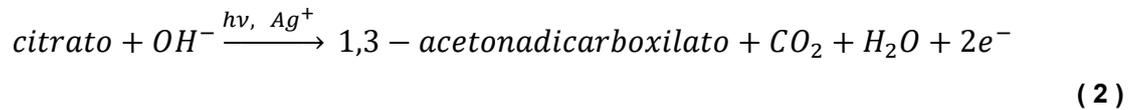
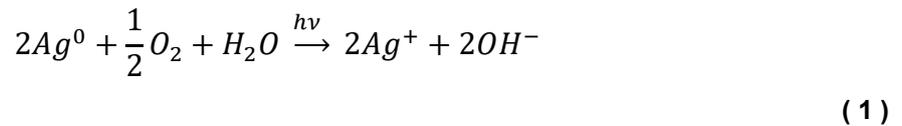
síntese de dois tamanhos diferentes - denominados tipos 1 e 2 - de NPs. No entanto, em 2003, houve evidências de que a incidência de feixe duplo definido em diferentes comprimentos de onda - uma excitação na posição de pico LSPR (aproximadamente 400 nm para nanopartículas de prata de cerca de 10 nm) e ambos os feixes com potência aproximada de 200 mW induziram a produção de nanoprismas (NPRs) pequenos e de tamanho único (tipo 1) (JIN *et al.*, 2003).

A síntese de NPs esféricas em NPR por meio de menores potências de incidência de luz verde (tão baixo quanto 10mW) levou 96 h a 37°C até 185 h a 25°C. A exposição de soluções coloidais de NPs a um único comprimento de onda, mesmo com menor potência, produz múltiplos picos de LSPRs, indicando mais de uma distribuição de forma ou tamanho (BASTYS *et al.*, 2006).

A variação do pH na solução coloidal de NPs controla a taxa de reação do PS, altera a aglomeração e, conseqüentemente, altera a morfologia das NPs resultantes. A taxa de consumo de  $\text{Ag}^+$  ocorre mais rapidamente em pHs mais básicos (ZHANG; LANGILLE; MIRKIN, 2006), enquanto a variação do pH leva a PS a formar diferentes formas de NPs (LANGILLE; PERSONICK; MIRKIN, 2013). Uma vez que pHs mais altos resultam em superfície mais carregada negativamente de NPR, há um interrompimento da agregação de NPR tipo 2 por repulsão elétrica (XUE; MIRKIN, 2007).

A PS é baseada principalmente no consumo de um agente surfactante, como o citrato de sódio, e na agregação de nanopartículas. O citrato não só permite que a solução seja estabilizada, mas também atua como um agente de redução de  $\text{Ag}^+$  (STAMPLECOSKIE; SKAIANO, 2012) - uma etapa necessária para reações mediadas por plasmon. Há também evidências sólidas de que o oxigênio, em solução coloidal de NPs, pode dissolver sementes de NP (sementes plasmônicas) e gerar  $\text{Ag}^+$  e  $\text{OH}^-$ , aumentando significativamente o pH da solução (XUE *et al.*, 2008).

A PS é guiada por várias equações químicas envolvendo prata, citrato, oxigênio e água. Átomos de prata em contato com oxigênio e água produzem íons de prata carregados positivamente e hidróxido (Equação 1); citrato e hidróxido, produzem 1,3-acetonedicarboxilato, dióxido de carbono, água e elétrons livres (Equação 2) (XUE *et al.*, 2008, WU *et al.*, 2008), 1,3-acetonedicarboxilato e dióxido de carbono degradam em aceto acetato e dióxido de carbono (Equação 3) (XUE *et al.*, 2008), e íons de prata carregados positivamente e elétrons livres, liberam os átomos de prata (Equação 4) (XUE *et al.*, 2008, WU *et al.*, 2008).



Tomando as Equações 1-4 em consideração, a influência de prótons e concentrações de oxigênio na PS é claramente notável. Como  $Ag^0$  e  $H_2O$  são abundantes na solução coloidal, a inserção de oxigênio acelera a Equação 1 taxa, enquanto um aumento da densidade de prótons irá interagir rapidamente com  $OH^-$  e com  $e^-$  e reduzir as taxas dos processos químicos descritos nas Equações 2 e 4; corroborando os resultados encontrados na literatura (XUE *et al.*, 2008, ZHANG *et al.*, 2010, LANGILLE; ZHANG; MIRKIN, 2011, XUE; MIRKIN, 2007).

### 2.3 CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS

A técnica de referência para investigação de NPs metálicas é a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (DANIEL; ASTRUC, 2004), a qual permite medidas precisas de tamanho médio das partículas e de distribuição de tamanho destas partículas. O espalhamento de luz dinâmico (DLS) só pode prover informações sobre a distribuição média de tamanhos de NPs na solução coloidal, mas pode ser utilizado juntamente com espectroscopia Zeta para determinar a carga superficial média das partículas no meio (potencial Zeta), provendo assim dados mais robustos.

Graças à SPA e às transições interbandas de aglomerados de metais, a espectrometria UV-Vis-NIR de absorção é de particular interesse para determinar o tamanho, a forma e a composição de NPs de maneira custo-efetiva (AMENDOLA, 2008), já o estudo de ligantes nas superfícies destes metais pode ser realizada com espectrometria Raman (DANIEL; ASTRUC, 2004).

## 2.4 CARACTERÍSTICAS DE Au E Ag

Tanto Ag quanto Au são conhecidos por serem inertes, especialmente o ouro por não ser gravemente afetado por  $O_2$  e por resistir fortemente a fortes agentes oxidantes ou ambientes ácidos (GREENWOOD; EARNSHAW, 1997).

Um fenômeno que ocorre nas NPs constituídas por estes metais é chamado de plasmon – banda de absorção de poláriton devido às oscilações coerentes dos elétrons da banda de condução  $6S^1$  para o Au e  $5S^1$  para a Ag na presença de ondas eletromagnéticas ressonantes (KREIBIG; VOLLMER, 1995). O movimento dos elétrons em relação às suas posições de equilíbrio (plasmon) produz campos elétricos fortes na superfície destes metais. Assim, estes materiais se caracterizam como sendo excelentes conversores de energia eletromagnética em calor (BURDA *et al.*, 2005).

## 2.5 ABSORÇÃO DE PLASMON DE SUPERFÍCIE (SPA)

Plasmons são oscilações coletivas dos elétrons que estão presentes no volume e na superfície dos materiais condutores (MAIER *et al.*, 2006), tal como em metais do Grupo 11. Neste caso, a absorção interbandas ocorre de  $5d$  para  $6s/6p$  para Au e de  $4d$  para  $5s/5p$  para Ag (KELLY *et al.*, 2003) e a SPA irá depender não só do tamanho destas nanopartículas, mas também do seu formato, da distância média que as separa e do meio em que estão envoltas (AMENDOLA, 2008). Em caso de incidência de uma onda eletromagnética externa ao sistema, quando satisfeitas as condições necessárias, ocorre o fenômeno denominado de ressonância de plasmon de superfície (SPR), uma oscilação coletiva dos elétrons da banda de condução que estão em ressonância com o campo eletromagnético incidente, produzindo elétrons plasmônicos energéticos (LI; ZHANG, 2017). Oscilações de densidade de carga confinadas que, quando excitadas, levam a um realce (ou intensificação) dos campos eletromagnéticos locais, assim como a SPR, mas em materiais nanométricos, recebe o nome de ressonância de plasmon de superfície localizado (LSPR) (HUTTER; FENDLER, 2004).

### 2.5.1 Modelo de Mie

O modelo de Mie faz uso da eletrodinâmica clássica para descrever a seção transversal de extinção de NPs de metais nobres, podendo assim resolver o problema da difração da luz para uma única esfera (MIE, 1908).

As expressões para as seções transversais de espalhamento ( $\sigma_{esp}$ ), extinção ( $\sigma_{ext}$ ) e absorção ( $\sigma_{abs}$ ) para uma única esfera de raio  $r$  são (KREIBIG; VOLLMER, 1995).

$$\sigma_{esp} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L + 1)(|a_L|^2 + |b_L|^2) \quad (5)$$

$$\sigma_{abs} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L + 1)Re[a_L + b_L] \quad (6)$$

$$\sigma_{ext} = \sigma_{abs} + \sigma_{esp} \quad (7)$$

onde  $k$  é o número de onda dado por  $k^2 = \omega^2 \epsilon \mu$ ,  $\omega = 2\pi\nu$ ,  $\nu$  a frequência da onda no meio,  $\epsilon$  a permissividade complexa,  $\mu$  a permeabilidade,

$$a_L = \frac{m \psi_L(mx) \cdot \psi'_L(x) - \psi'_L(mx) \cdot \psi_L(x)}{m \psi_L(mx) \cdot \eta'_L(x) - \psi'_L(mx) \cdot \eta_L(x)} \quad (8)$$

e

$$b_L = \frac{\psi_L(mx) \cdot \psi'_L(x) - m \psi'_L(mx) \cdot \psi_L(x)}{\psi_L(mx) \cdot \eta'_L(x) - m \psi'_L(mx) \cdot \eta_L(x)} \quad (9)$$

onde  $x$  é o parâmetro de tamanho dado por  $2\pi n_{particula} r / \lambda$ ,  $r$  o raio da partícula,  $\lambda$  o comprimento de onda incidente,  $m$  o índice relativo de refração (vide  $m = n_{particula} / n_{meio}$ ),  $\psi_L$  é a função esférica de Riccati e  $\eta_L$  é a função esférica de Bessel.  $L$  indica a ordem multipolar.

Contudo, para os casos em que  $r \ll \lambda$  (partículas muito pequenas), então  $|x| \ll 1$ , reduzindo a equação (6) para

$$\sigma_{ext} = \frac{9\omega\varepsilon_m^{\frac{3}{2}}V}{c} \frac{\varepsilon_2(\omega)}{[\varepsilon_1(\omega) + 2\varepsilon_m]^2 + \varepsilon_2(\omega)^2} \quad (10)$$

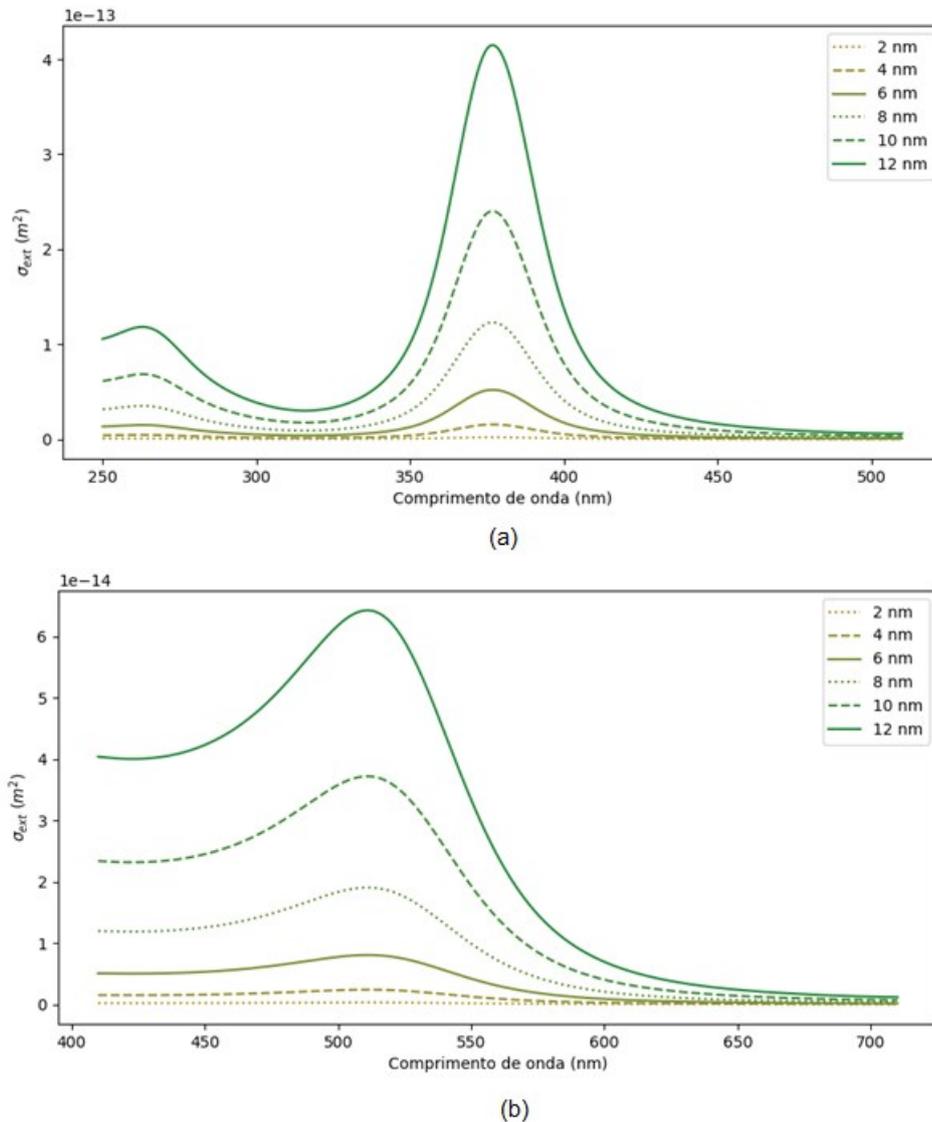
onde

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_1(\omega) + i\varepsilon_2(\omega), \quad (11)$$

$V$  o volume da esfera,  $\varepsilon_m$  a constante dielétrica real do meio,  $\varepsilon(\omega)$  a constante dielétrica da esfera, sendo  $\varepsilon_1$  a parte real e  $\varepsilon_2$  a parte imaginária. O valor de  $\varepsilon_1$  pode ser obtido por  $\varepsilon_1 = n^2 - k_e^2$  e  $\varepsilon_2$  pode ser dado por  $\varepsilon_2 = 2nk_e$ , onde  $k_e$  é o coeficiente de extinção.

Da Equação 10, é possível obter  $\sigma_{ext}$  para AgNPs (Figura 1a) e AuNPs (Figura 1b) para os raios 2, 4, 6, 8, 10 e 12 nm para efeitos meramente ilustrativos. Foram utilizados os seguintes valores para esta ilustração:  $c = 3 \times 10^8$  m/s,  $\varepsilon_m = 1.33$  e os valores de  $k_e$  e  $n$  foram adquiridos de (JOHNSON; CHRISTY, 1972).

**Figura 1 - Valores de  $\sigma_{ext}$  obtidos para AgNPs (a) e para AuNPs (b) de raios variando de 2 a 12 nm de acordo com a Equação 10.**



Fonte: O autor.

### 2.5.2 Fatores diversos que influenciam a SPA

Existem vários fatores que podem influenciar a SPA de nanopartículas, incluindo o tamanho da nanopartícula (MIE, 1908; LI *et al.*, 2008), a forma da nanopartícula (GUSTAFSON *et al.*, 1999; BAFFOU *et al.*, 2010), a composição da casca (LIN *et al.*, 2007; SCHATZ *et al.*, 2001), a composição do meio (LIN *et al.*, 2007; SCHATZ *et al.*, 2001), o tamanho da banda proibida (KREIBIG; VOLLMER, 1995) e o tamanho da banda de condução. (KREIBIG; VOLLMER, 1995)

O tamanho da nanopartícula é um fator crucial para o deslocamento do pico da LSPR, pois quanto menor a nanopartícula, maior concentração de campos elétricos na superfície e o pico da LSPR sofre um desvio para o azul. (MIE, 1908; LI *et al.*, 2008).

Além disso, a forma da nanopartícula também é importante, nanopartículas esféricas apresentam menor desvio para o vermelho do que as nanopartículas com formas anisotrópicas, como as formas de bastões (GUSTAFSON *et al.*, 1999; BAFFOU *et al.*, 2010).

A presença de uma casca em volta da nanopartícula metálica pode aumentar o SPA devido à interação entre a casca e a superfície da nanopartícula (LIN *et al.*, 2007; SCHATZ *et al.*, 2001). A natureza do meio em que a nanopartícula está imersa, como a concentração de outras espécies químicas ou o pH, também pode influenciar o desvio para o vermelho (LIN *et al.*, 2007; SCHATZ *et al.*, 2001).

As nanopartículas metálicas com banda proibida maior e banda de condução maior tendem a apresentar maior desvio para o vermelho devido à maior concentração de estados excitados próximos a essas bandas. Isso ocorre porque a banda proibida maior permite que mais estados excitados estejam disponíveis para interagir com a radiação incidente, o que resulta em um desvio para o vermelho maior (KREIBIG; VOLLMER, 1995).

Um exemplo de estudo que investigou o SPA em nanopartículas de prata é o trabalho de Li *et al.* (2008) no qual os autores estudaram como o tamanho da nanopartícula afeta o desvio para o vermelho utilizando nanopartículas de prata esféricas com diâmetros variando de 10 a 40 nm. Os resultados mostraram que o desvio para o vermelho aumentou com o aumento do tamanho da nanopartícula, consistente com as previsões teóricas baseadas na teoria de Mie (LI *et al.*, 2008).

Outro exemplo é o trabalho de Lin *et al.* (2007) no qual os autores estudaram o efeito da composição da casca em nanopartículas de prata revestidas com diferentes ligantes orgânicos. Eles descobriram que a presença de uma casca orgânica aumentou o desvio para o vermelho devido à interação entre a casca e a superfície da nanopartícula (LIN *et al.*, 2007).

### 2.5.3 Modelo de Mie para NPs esféricas tipo *core@shell*

O modelo de Mie pode ser aplicado para o caso de esferas constituídas por um núcleo (*core*) e uma casca (*shell*) e para o caso de uma esfera com uma única casca na aproximação dipolar,  $\sigma_{ext}$  pode ser dado por (KREIBIG; VOLLMER, 1995).

$$\sigma_{ext} = 4\pi k \cdot Im(\alpha) \quad (12)$$

onde  $\sigma_{ext}$  é proporcional à parte imaginária da polarizabilidade ( $\alpha$ ) da NP,  $K$  o vetor de onda e

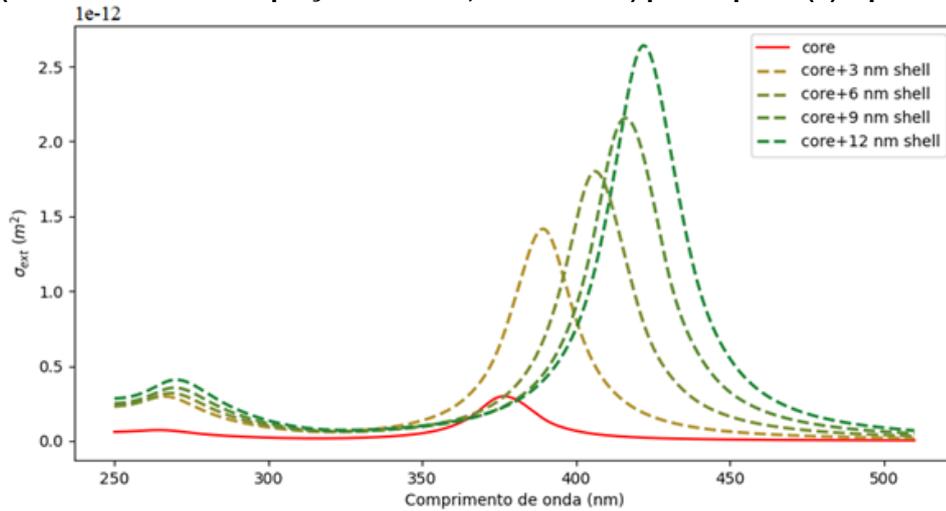
$$\alpha = \frac{4\pi}{3} \cdot (r + d)^3 \varepsilon_0 \cdot \frac{(\varepsilon_c - \varepsilon_m) \cdot (\varepsilon + 2\varepsilon_c) + \left(\frac{r}{r+d}\right)^3 \cdot (\varepsilon - \varepsilon_c) \cdot (\varepsilon_m + 2\varepsilon_c)}{(\varepsilon_c + 2\varepsilon_m) \cdot (\varepsilon + 2\varepsilon_c) + \left(\frac{r}{r+d}\right)^3 \cdot (\varepsilon - \varepsilon_c) \cdot (2\varepsilon_c - \varepsilon_m)} \quad (13)$$

em que  $r$  é o raio do núcleo,  $d$  é a espessura da casca, e  $\varepsilon$ ,  $\varepsilon_c$ ,  $\varepsilon_0$  e  $\varepsilon_m$  são as constantes dielétricas do núcleo, da casca, do vácuo e do meio, respectivamente.

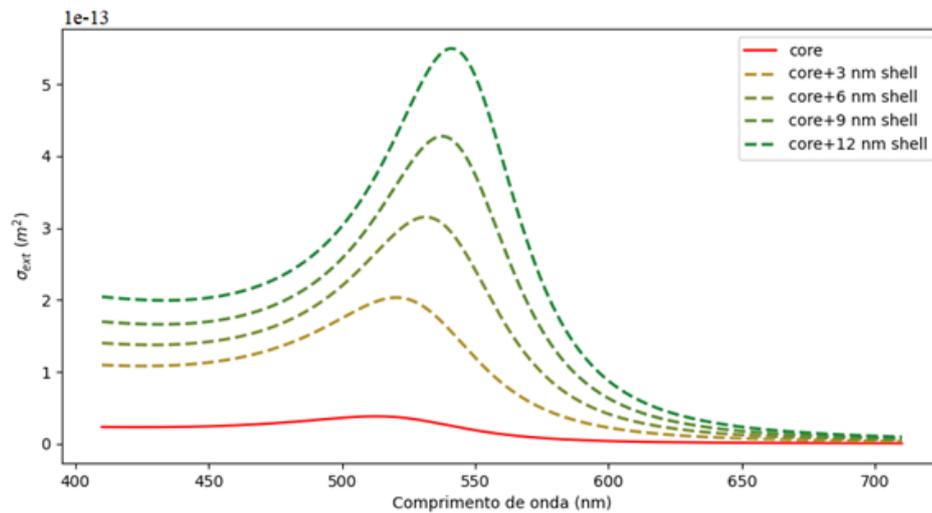
Para uma NP com 10 nm de raio,  $\sigma_{ext}$  se comporta conforme o demonstrado na Figura 2, de onde é possível observar efeitos similares no deslocamento do pico para o vermelho em ambos os casos (AgNPs e AuNPs). Para esta simulação, foram utilizados os valores de  $c = 3 \times 10^8$  m/s,  $\varepsilon = 1.58$ ,  $\varepsilon_0 = 8.85 \times 10^{-12}$ ,  $\varepsilon_m = 1.33$  e os valores de  $k$  e  $n$  foram adquiridos de (JOHNSON; CHRISTY, 1972), do qual  $\varepsilon_c$  foi calculado.

Pode-se então afirmar que, a partir do espectro de extinção, não seria possível definir o tamanho médio de uma nanopartícula desconhecida por meio do desvio do pico da LSPR para o vermelho ou pelo aumento da intensidade da mesma, sendo que a alteração da espessura do capeamento e da carga da nanopartícula influenciam diretamente nestes mesmos aspectos da LSPR (vide itens 2.4.1-2.4.3).

**Figura 2 - Valores de  $\sigma_{\text{ext}}$  para o caso *core@shell* de NPs de 10 nm de raio com capeamentos de citrato de sódio com espessuras de 0 (de acordo com as Equações 10 e 11, *core*), 3, 6, 9 e 12 nm (de acordo com as Equações 12 e 13, *core* e *shell*) para a prata (a) e para o ouro (b).**



(a)



(b)

Fonte: O autor.

#### 2.5.4 Sensoriamento a partir da SPA

Uma solução coloidal de AgNPs quase-esféricas de aproximadamente 10 nm apresenta uma coloração amarelada devido à sua SPA e esta coloração pode ser alterada pelo tamanho, forma e agente surfactante (relação *core@shell*) das NPs e pelo solvente da solução coloidal (GONZÁLEZ *et al.*, 2014). O fenômeno ligado à agregação das NPs está, por exemplo, associado à ligação de surfactantes (ou agentes de capeamento) às moléculas alvo, e quando estas são anexadas a um grande número de NPs através do surfactante, um dos possíveis resultados é a agregação das NPs, causando o deslocamento da SPA e permitindo o sensoriamento

destas moléculas alvo (HUNG *et al.*, 2010). Estes sensores que, muitas vezes fazendo uso de AuNPs e AgNPs, utilizam comprimentos de onda na faixa do visível, são classificados como sensores colorimétricos.

Sensores colorimétricos à base de NPs para a aferição de UTs estão sendo desenvolvidos como, por exemplo, um sensor colorimétrico à base de uma solução coloidal de AuNPs para a detecção de creatinina (DU *et al.*, 2016). Neste caso, a solução avermelhada de AuNPs de aproximadamente 13 nm se torna azulada na presença de íons de prata, adenosina e creatinina.

## 2.6 ESPALHAMENTO RAMAN REALÇADO POR SUPERFÍCIE (SERS)

O espalhamento inelástico decorrente de uma radiação incidente que interage com os modos rotacionais e vibracionais da matéria é denominado espalhamento Raman (RAMAN; KRISHNAN, 1928). Este espalhamento pode ser causado pelo fornecimento de energia ao sistema, espalhando assim um conjunto de fótons de maior comprimento de onda (Stokes) ou no caso em que as moléculas já estejam excitadas de antemão, o espalhamento é dado por um conjunto de fótons de menor comprimento de onda (Anti-Stokes).

O espalhamento Raman possui uma relação sinal-ruído muito baixa, mas este sinal pode ser intensificado por um campo eletromagnético intenso, tal como acontece nos arredores das NPs quando existe uma radiação incidente, excitando a LSPR destas. Esta intensificação é chamada de Espalhamento Raman realçado por superfície (SERS, do inglês *Surface-enhanced Raman Scattering*) e é capaz de ampliar o sinal Raman em até 14 ou 15 ordens de magnitude (ROELLI *et al.*, 2015; STROBBIA *et al.*, 2015).

Sensores baseados no efeito SERS também já foram desenvolvidos, detectando, por exemplo, ácido úrico, ureia e creatinina (UTs solúveis em água) e p-cresol (PBUT) com o uso de AgNPs em nano folhas feitas de óxido de grafeno modificado (JUANG *et al.*, 2019). Outrora, o efeito SERS também já foi descrito no tratamento da CKD, como no desenvolvimento de um rim artificial aprimorado por AuNPs sob a incidência de diodos emissores de luz (LEDs), reduzindo o estresse oxidativo, a expressão de fibronectina e a resposta inflamatória induzidos pela diálise (CHEN *et al.*, 2016).

## 2.7 A DOENÇA RENAL CRÔNICA (CKD)

Os rins desempenham um papel fisiológico fundamental para a vida, tem como uma de suas funções realizar a filtração do sangue e excreção de compostos urêmicos por meio da urina, o que contribui diretamente para a manutenção da homeostase corporal (BARRETO *et al.*, 2014; MAHOMED, 1877).

A CKD é uma patologia que acomete os rins e pode ser definida como a perda parcial ou total da função renal, levando a uma redução da taxa de filtração e excreção de compostos urêmicos e, portanto, levando ao acúmulo destes compostos no organismo, este quadro é conhecido como uremia e causa diversos danos ao indivíduo (VANHOLDER, 2003, 2005, 2008), como processos inflamatórios e doenças cardiovasculares (VANHOLDER *et al.*, 2003; AMABILE *et al.*, 2011; MACIEL *et al.*, 2018).

De acordo com a National Kidney Foundation (NKF, 2012), a CKD é uma doença progressiva, que pode ser categorizada de acordo com presença de lesão renal por tempo igual ou superior a três meses, acompanhada por anormalidades estruturais ou funcionais dos rins, com ou sem redução na taxa de filtração glomerular (TFG). O néfron é considerado a principal unidade funcional dos rins, no qual os glomérulos estão presentes e ocorre a filtração do sangue, e considerando a TFG classifica-se a progressão da CKD por estágios (Tabela 1).

**Tabela 1 - Estadiamento da doença renal crônica (CKD).**

<b>Estágio</b>	<b>Taxa de filtração glomerular (TFG) (ml/min/1,73 m<sup>2</sup>)</b>	<b>Descrição</b>
G1	≥90	Normal ou alta
G2	60-89	Ligeiramente reduzida
G3a	45-59	Ligeiramente ou moderadamente reduzida
G3b	30-44	Moderadamente ou severamente reduzida
G4	15-29	Severamente reduzida
G5	<15	Falência renal

**Fonte: Adaptado de NFK, 2012.**

A prevalência mundial de CKD em 2016 variou de 11 a 13 % (HILL *et al.*, 2016). Aproximadamente 37 milhões de pessoas somente nos Estados Unidos da América (EUA) apresentam esta patologia (EUA, 2021). No Brasil, dos anos de 2009 a 2018, dados apontam mais de 133 mil pacientes em tratamento dialítico e mais de 29 mil aguardando em fila de espera para transplante renal. A faixa etária com maior

acometimento por CKD e que está realizando diálise é a entre 45 e 64 anos. A taxa de mortalidade anual de pacientes em diálise está em torno de 20 % (NEVES *et al.*, 2020).

O tratamento de pacientes em estágio avançado da CKD (G5) (Tabela 1) consiste em terapias substitutivas da função renal, como a hemodiálise (HD), hemodiálise peritoneal e o transplante renal (STINGHEN *et al.*, 2010; NFK KDIGO, 2018). Porém, apesar dos avanços da tecnologia na área médica, algumas das toxinas urêmicas dificilmente são removidas por terapias renais substitutivas, como a hemodiálise, principalmente as UTs ligadas a proteínas (PBUTs). O IS e o PCS são considerados UTs de baixo peso molecular que se ligam às proteínas e promovem vários efeitos deletérios no organismo (VANHOLDER *et al.*, 2008; NIWA, 2010).

### 2.7.1 Sensoriamento de toxinas urêmicas (UTs)

Para que um composto seja considerado uma UT, ele deve ser (i) medido com precisão e identificado quimicamente, (ii) sua concentração deve ser maior que a concentração em indivíduos não urêmicos, (iii) sua concentração deve estar correlacionada com disfunções ou sintomas adversos; e (iv) sua atividade biológica deve ser comprovada *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo*, enquanto suas concentrações coincidem com as encontradas em fluidos corporais de pacientes urêmicos (BARRETO *et al.*, 2014; MAHOMED, 1877).

Além disso, as UTs podem ser classificadas de acordo com seu peso molecular em (i) pequenos compostos solúveis em água (peso molecular menor que 500 Dalton) que incluem creatinina e ureia, (ii) moléculas intermediárias (peso molecular superior a 500 Dalton), como peptídeos, e (iii) moléculas ligadas a proteínas (principalmente de peso molecular pequeno) que incluem indoxil sulfato (IS) e p-cresilsulfato (PCS) (VANHOLDER, 2003, BARRETO *et al.*, 2014). Toxinas urêmicas ligadas a proteínas (PBUTs) se ligam principalmente à albumina por meio de ligações não covalentes, resultando de pontes salinas, eletrostáticas e forças de van der Waals (DEVINE *et al.*, 2014).

Desde 1984, as UTs são detectadas e quantificadas por várias tecnologias, dentre elas, a espectrometria de massa (MS) (SCHROOTS *et al.*, 1984; NIWA, 1986; VANHOLDER; RINGOIR, 1992). O uso desta técnica na detecção e quantificação de UTs é amplamente conhecida e aprovada pela comunidade científica (NIWA, 1997;

NIWA, 2011). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também é utilizada para determinar a concentração de UTs, tal como o caso do p-cresol (SMET *et al.*, 1998).

A extração de UTs, tais como o IS e o PCS do soro de pacientes, é bem descrita na literatura (ELLINGER; PRUTZ, 1903; SMET *et al.*, 1998; LIN *et al.*, 2019), mas a quantificação destes compostos requer, por exemplo, espectrômetros de massa ou sistemas de HPLC que podem ser dispendiosos para o caso da quantificação por MS e HPLC, respectivamente. Neste sentido, as NPs podem oferecer uma solução de baixo custo e com desempenho satisfatório do ponto de vista metrológico para a quantificação destas moléculas por intermédio de técnicas colorimétricas.

Por outro lado, AgNPs já têm sido utilizadas no desenvolvimento de sensores colorimétricos, tal como para detecção de resíduos perigosos (WU *et al.*, 2018), dentre outras (WU *et al.*, 2015, SUNG *et al.*, 2013, DEWANGAN *et al.*, 2019). Esses estudos forneceram alta seletividade para seus alvos, com estabilidade da amostra e limites de detecção (LoDs) relativamente baixos e os dados estão resumidos na Tabela 2.

**Tabela 2 - Características de sensores colorimétricos baseados em AgNPs encontrados na literatura.**

Referência	Tamanho médio das AgNPs	Materiais extras adicionados (ou surfactantes)	Moléculas alvo	R <sup>2</sup>	LOD (mg/L)
JUANG <i>et al.</i> , 2019	-	Nano folhas de grafeno	Creatinina	0,98	0,7
			Ácido úrico	0,93	4,2
			Ureia	0,99	0,6
			p-Cresol	0,95	1,1
WU <i>et al.</i> , 2018	-	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> magnético	Cartap	0,99	0,01
WU <i>et al.</i> , 2015	15 nm	Piro fosfato de sódio e hidroxipropilmetilcelulose	Cu <sup>2+</sup>	0,99	0,0001
			Mn <sup>2+</sup>	0,99	0,001
SUNG <i>et al.</i> , 2013	30 nm 40 nm (nanoprismas)	Glutathiona	Co <sup>2+</sup>	0,99	-
			Cu <sup>2+</sup>	0,99	-
DEWANGAN <i>et al.</i> , 2019	13-15 nm	Colesterol oxidase	Colesterol	0,99	0,000005

Fonte: Adaptado de SCHIEFER *et al.*, 2021.

Os efeitos deletérios que a presença destas toxinas na corrente sanguínea pode trazer para o organismo são bem descritos na literatura, o desfecho clínico para os pacientes tende a ser o indesejado, como o desenvolvimento de comorbidades como, doenças cardiovasculares e até mesmo a morte (NASEEM, 2005; MARTENS

*et al.*, 2016; KRÜGER-GENGE *et al.*, 2019). Frente a isso, se faz necessário o estudo de técnicas que permitam uma avaliação rápida e precisa da presença destas UTs em meios biológicos a fim de otimizar o tratamento e possivelmente interferir positivamente no desfecho clínico dos pacientes acometidos pela doença.

### 2.7.2 Toxinas urêmicas e as células endoteliais

Na CKD há um aumento no risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, grande parte deste aumento se deve a disfunção endotelial, que é causada pela presença de UTs em elevada concentração no sangue. O endotélio vascular, é uma monocamada formada por células endoteliais que constitui o revestimento celular interno de artérias, veias e capilares e, portanto, está em contato direto com os componentes e células do sangue (MARTENS *et al.*, 2016; KRÜGER-GENGE *et al.*, 2019).

O endotélio vascular é um órgão dinâmico e funcionalmente complexo, modulando múltiplos processos biológicos, incluindo tônus vascular e permeabilidade, respostas inflamatórias, trombose e angiogênese. A disfunção endotelial é uma ameaça para a integridade do sistema vascular, e é fundamental para a patogênese da aterosclerose e de doenças cardiovasculares (MARTENS *et al.*, 2016; KRÜGER-GENGE *et al.*, 2019).

Um dos possíveis mecanismos que levam a disfunção endotelial é a redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), que é uma marca registrada da CKD, sendo este distúrbio quase universal em pacientes que atingem a fase mais avançada da CKD, a falência renal (ROUMELIOTS *et al.*, 2020). O NO produzido pelo endotélio tem função vasodilatadora, quando reduzido pode levar a perda da homeostase e tônus vascular (NASEEM, 2005; MARTENS *et al.*, 2016; KRÜGER-GENGE *et al.*, 2019). Estudos também confirmaram que o NO desempenha um papel importante na adesão e migração celular. Foi demonstrado que a liberação de NO aumenta a migração celular e diminui a adesão celular em alguns tipos de células e, inversamente, reduz a migração celular e aumenta a adesão celular em outros tipos de células (JADESKI *et al.*, 2000; LAHIRI *et al.*, 2009; MESQUITA *et al.*, 2022).

O endotélio vascular também possui a capacidade de regular o transporte de líquidos e solutos no sangue para a parede do vaso sanguíneo e uma perturbação neste trânsito, causada por uma lesão endotelial, pode levar o desenvolvimento de

patologias associadas. Uma melhor compreensão desse fenômeno de causa-efeito requer o reconhecimento dos mecanismos de migração celular que mantêm a homeostase do tecido (PAWAR; EDGAR, 2012). A migração celular ocorre devido a motilidade que as células apresentam e este processo é essencial para a vida e o desenvolvimento. A capacidade das células de migrar depende de muitos fatores como, por exemplo, seu fenótipo e nas propriedades do microambiente ao redor. A literatura define a migração celular como um fenômeno extremamente complexo (PAWAR; EDGAR, 2012; MERINO-CASALLO *et al.*, 2022).

Os principais processos fisiológicos dos organismos multicelulares dependem da migração celular, desde o desenvolvimento embrionário até a formação óssea mais específica e a angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos). A capacidade das células de migrar também é crítica durante a reparação dos tecidos e as respostas inflamatórias e imunológicas. Mas a migração celular também está associada ao desenvolvimento de doenças, incluindo algumas das principais causas de morte, como a metástase cancerígena. Uma compreensão abrangente deste processo biológico é, portanto, essencial. A migração celular é geralmente estudada para linhagens de células epiteliais, endoteliais e de fibroblastos, assim como células cancerígenas, (PAWAR; EDGAR, 2012; MONSUUR *et al.*, 2016; MERINO-CASALLO *et al.*, 2022) devido ao seu potencial de aderência.

#### 2.7.2.1 Análise da migração celular

Uma das maneiras de avaliar os efeitos da CKD e, por consequência, das UTs sobre a capacidade de migração das células endoteliais é por meio do ensaio *in vitro* conhecido como *wound healing* ou ensaio de cicatrização de feridas. Os ensaios *in vitro* são excelentes abordagens para extrapolar para situações *in vivo* e estudar o comportamento de células vivas (PIJUAN *et al.*, 2019).

O ensaio de cicatrização de feridas é um dos métodos mais antigos desenvolvidos para estudar a migração celular *in vitro*. Este método é baseado na observação da migração celular em uma "ferida" que é criada em uma monocamada de células. Esta observação é realizada com auxílio de um microscópio ótico e ao longo do tempo, são realizadas fotos da ferida, a fim de acompanhar o seu fechamento. Posteriormente, estas fotos são analisadas para averiguar o processo de "cicatrização. Este ensaio mimetiza em certa medida a migração das células na cicatrização de feridas. Com exemplo, temos o reparo tecidual de vasos sanguíneos

após um corte, as células endoteliais tendem a migrar para a área lesionada a fim de fechar a ferida, o wound healing permite a análise desse processo de maneira laboratorial e controlada (RODRIGUEZ *et al.*, 2005; JONKMAN *et al.*, 2014; PIJUAN *et al.*, 2019).

A cicatrização de feridas é um processo complexo do corpo, que envolve diferentes populações de células e da matriz extracelular. O processo de cicatrização ocorre em quatro etapas: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação tecidual. A migração ocorre como uma resposta celular ao estímulo de uma lesão, envolvendo queratinócitos, fibroblastos, macrófagos, plaquetas e células endoteliais. Esses tipos celulares retêm e mantêm a cura por meio de vários fatores de crescimento e citocinas (GUO; DIPIETRO, 2010, VELNAR; GRADISNIK, 2018); além disso, oxigenação, estresse, infecções, hormônios, idade, diabetes, medicamentos e obesidade também podem interferir nesse processo (RODRIGUES *et al.*, 2019).

Apesar de muito utilizado por pesquisadores o ensaio de wound healing apresenta algumas limitações como, por exemplo, a obtenção dos dados finais por meio da análise das imagens das células é comumente realizada manualmente (DE IESO; PEI, 2018), o que, além de ser demorado, leva à subjetividade e, ocasionalmente, a erros de interpretação dos dados (JOHNSTON *et al.*, 2014). No entanto, com o avanço de ferramentas da informática, como o advento das redes adversárias geradoras (GANs), a geração de imagens e a tradução imagem-a-imagem evoluíram bastante (GOODFELLOW *et al.*, 2020). Um exemplo de software de tradução imagem-a-imagem é o método pix2pix, que já demonstrou sua ampla aplicabilidade (ISOLA *et al.*, 2017).

As GANs são baseadas em um modelo gerador destinado a criar imagens sintéticas e em um modelo discriminador que classifica as imagens como falsas (imagens criadas pelo gerador) ou reais (imagens de entrada). Enquanto o discriminador é atualizado diretamente para melhor classificar as imagens, o gerador é atualizado de acordo com o discriminador, visando enganar melhor o discriminador (GOODFELLOW *et al.*, 2020). Um caso especial de GANs são os GANs condicionais (ou cGANs), onde o gerador é condicionado a uma entrada (MIRZA; OSINDERO, 2014). No caso do modelo pix2pix (um tipo de cGAN), o gerador é condicionado a uma imagem de entrada e é baseado em uma arquitetura “U-Net”, e o discriminador é baseado em um classificador convolucional “PatchGAN” (ISOLA *et al.*, 2017).

Sendo assim, com a evolução e criação de novas e mais efetivas ferramentas da informática, se mostra necessário o estudo e aperfeiçoamento de ensaios bem estabelecidos como o wound healing, que apresenta limitações, contribuindo assim para uma maior exatidão nos resultados obtidos por meio deste ensaio. Portanto, além da síntese, caracterização e fotoconversão de NPs e do sensoriamento de UTs, o presente trabalho teve como objetivo aplicar o modelo pix2pix no ensaio de migração celular.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NPs

A produção de AgNPs e AuNPs quase-esféricas por PLAL foi realizada no Laboratório de Laser (LabLaser) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (Figura 3) com um laser Nd:YAG pulsado a 532 nm (New Wave Tempest 20, EUA) em frequência de 10 Hz e energia de pulso de 17 mJ. O feixe de laser foi focado em uma placa de prata (Sigma-Aldrich, 99,0 % de pureza, espessura de 1 mm) ou em uma placa de ouro (Sigma-Aldrich, 99,0 % de pureza, espessura de 1 mm) no fundo de um béquer contendo 10 mL de uma solução aquosa de 1 mM de citrato de trissódio diidratado (Biotech, 99,0 %). Em uma tentativa de controlar as características morfológicas das NPs capeadas com citrato (Cit-AgNPs e Cit-AuNPs) produzidas por PLAL, foi adotada uma metodologia para investigar a influência da temperatura da solução (relacionada ao tempo de ablação) na distribuição de tamanho das nanopartículas sintetizadas.

**Figura 3 - Instrumentação utilizada no processo de ablação a laser (PLAL) no Laboratório de Laser (LabLaser) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.**

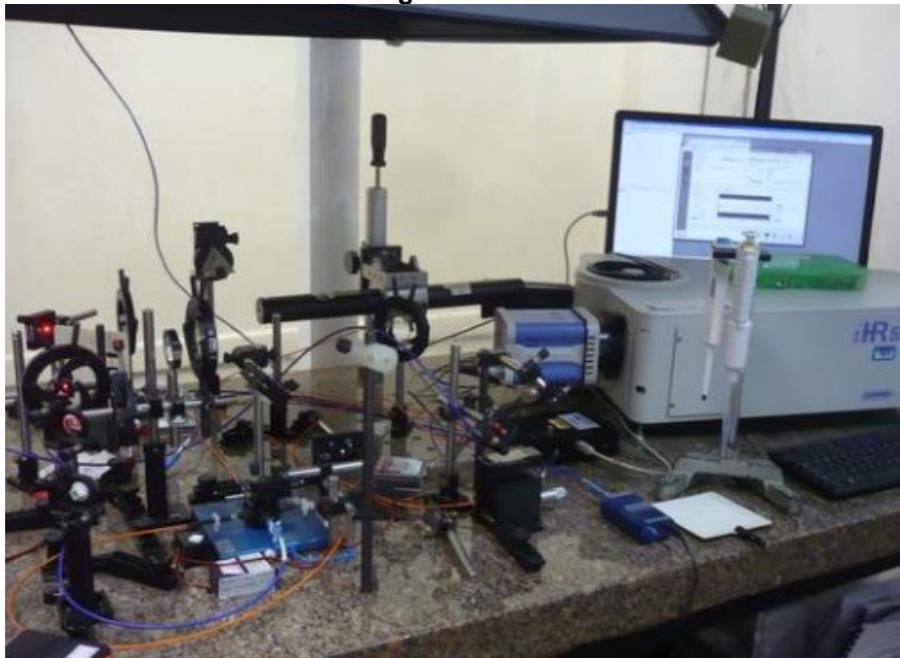


Fonte: Laboratório de Laser, 2023.

A temperatura da solução e a temperatura do ambiente foram monitoradas com termopares (resolução de  $\pm 0,1$  °C) durante a ablação com tempos de exposição variando até 40 min. A temperatura ambiente foi medida a 10 cm do béquer, enquanto a temperatura da solução foi medida a 2 cm do feixe do laser na solução. A aferição da temperatura também foi realizada no Laboratório de Laser (LabLaser) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Os espectros de extinção das soluções coloidais foram aferidos com um espectrômetro de fibra óptica UV-VIS (HR4000, Ocean Optics, resolução de 1,8 nm) acoplado a uma fonte de luz halógena de tungstênio (LS-1, Ocean Optics) no Laboratório de Laser (LabLaser) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (Figura 4). Cada espectro foi ajustado a uma distribuição Voigt para avaliar a densidade óptica (OD), posição do pico ( $\lambda$ ) da LSPR.

**Figura 4 - Instrumentação utilizada no processo de obtenção dos espectros de extinção das soluções coloidais de nanopartículas de prata e ouro no Laboratório de Laser (LabLaser) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.**



Fonte: Laboratório de Laser, 2023.

As NPs produzidas por PLAL foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM, JEOL JEM 1200EX-II, resolução de 0,5 nm) no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná (Figura 5), e seus tamanhos médios foram avaliados por espalhamento dinâmico de luz (NanoDLS, DLS,

Brookhaven Instruments, resolução de 10 %, tamanho detectável mínimo de 0,9 nm) a 90° (DLSd) no Laboratório de Biopolímeros (BIOPOL) da Universidade Federal do Paraná no departamento de química (Figura 6).

**Figura 5 - Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL JEM 1200EX-II do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná. Equipamento utilizado para fotografar e aferir o tamanho e formato de nanopartículas de prata.**



Fonte: Centro de microscopia eletrônica, 2023.

**Figura 6 - Equipamento de espalhamento dinâmico de luz (Nano DLS) do Laboratório de Biopolímeros (BIOPOL) da Universidade Federal do Paraná, utilizado para aferir o tamanho médio das nanopartículas de prata e ouro.**



Fonte: Laboratório de Biopolímeros, 2023.

O potencial Zeta e o pH foram medidos por um analisador de titulação de carga de partículas (Stabino Microtrac, Alemanha) no Laboratório de Biopolímeros (BIOPOL) da Universidade Federal do Paraná no departamento de química (Figura 7), enquanto as cores das soluções foram obtidas por estratificação de cores RGB (vermelho (R), verde (G) e azul (B)) a partir de imagens de cubetas adquiridas com uma câmera de smartphone de 12 mega pixels (Motorola MotoG5plus, Schaumburg, EUA).

**Figura 7 - Equipamento (Stabino Microtrac) para aferição de pH e potencial Zeta das soluções coloidais de nanopartículas de prata e ouro.**



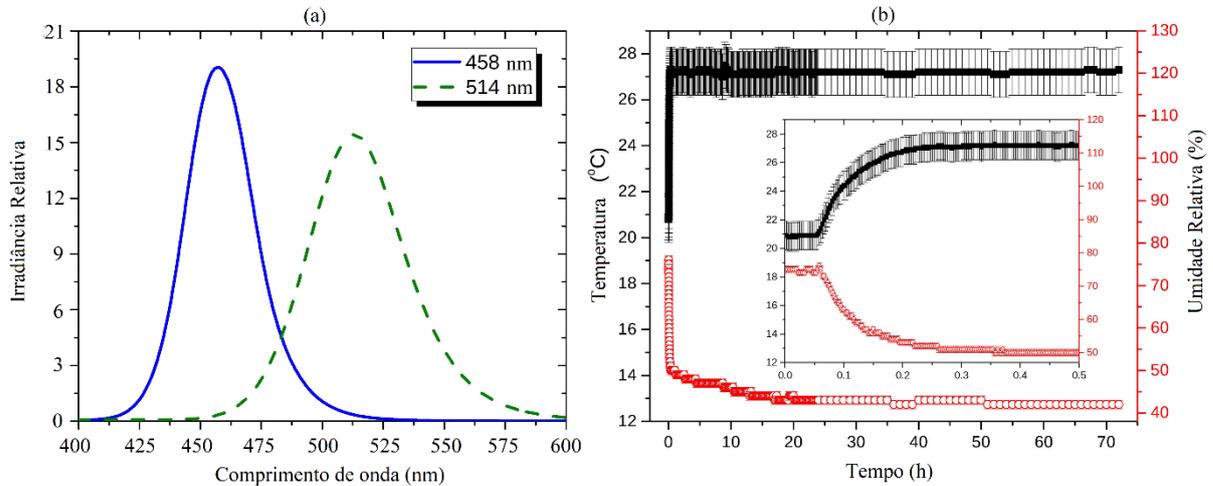
Fonte: Laboratório de Biopolímeros, 2023.

A correlação entre as características das amostras e das LSPRs foi realizada através da correlação de Pearson com Python, onde o coeficiente de correlação é dado por  $\mathcal{R}$  e sua significância, por  $P$ . Um teste ANOVA com post-hoc Dunnet foi realizado a fim de verificar diferenças significativas entre a média de tamanhos das NPs mensuradas por DLS em relação ao primeiro tamanho médio avaliado.

### 3.2 FOTOCONVERSÃO DE NPs

Para a fotoconversão de nanopartículas foi desenvolvido o aparelho de peróxido de hidrogênio (LIPS), o qual conta com duas fitas comerciais de diodos de emissão de luz (LEDs) de baixa intensidade: uma composta por LEDs azuis (faixa centrada em 458 nm e FWHM de 33 nm) e outra composta por LEDs verdes (faixa centrada em 514 nm e FWHM de 47 nm), Figura 8a.

**Figura 8 Características do hardware. (a) Irradiâncias dos LEDs. (b) Temperatura e umidade relativa no interior da câmara.**



Fonte: O autor.

Essas fitas são enroladas formando um cilindro. As fitas azul e verde tinham 1 metro de comprimento, contendo LEDs de baixa intensidade (potência individual de 10 mW) separados por 5 cm. A irradiância relativa de LEDs individuais e espectros de extinção foram medidos por um espectrômetro de fibra óptica UV-VIS (HR4000, Ocean Optics, resolução de 1,8 nm) acoplado a uma fonte de luz halógena de tungstênio (LS-1, Ocean Optics).

Um sistema de refrigeração também foi construído neste hardware, visando controlar a temperatura, enquanto a umidade relativa se apresentou constante ao longo dos experimentos. A temperatura e a umidade relativa foram medidas a cada 10 s até 30 min, a cada 500 s até 24 h, e a cada 1 h até 72 h por um sensor de umidade e temperatura DHT11 (OSEPP Eletronics, resolução de temperatura e umidade relativa de 1 °C e 1%, respectivamente) são mostrados na Figura 3b. Uma estagnação de temperatura e umidade relativa foi observada em  $(27,18 \pm 0,06)$  °C e  $(44,6 \pm 0,2)$  % após 0,5 h, respectivamente (Figura 8b).

A geometria do aparelho permite a fotoconversão simultânea de um conjunto de amostras sob igual condições de irradiância de luz, temperatura e umidade relativa. O número de amostras é definido pelo raio do cilindro formado pelas fitas de LED enroladas.

### 3.2.1 Análise dos impactos das características intrínsecas da amostra no processo de fotoconversão

A fim de monitorar a evolução de parâmetros distintos na fotoconversão de forma promovida pela técnica LIPS proposta, foi utilizado um lote de seis soluções coloidais ligeiramente diferentes de nanopartículas de prata abladas a laser (T3, T4, T5, T6, T7 e T8) produzidas nas condições citadas anteriormente. Cada solução coloidal resultou em quatro alíquotas de 1 mL cada, contendo concentrações de 0,00, 0,57, 1,14 e 1,71 mM de peróxido de hidrogênio. As alíquotas, preparadas em cubetas de 2,5 mL, foram então inseridas no aparelho LIPS e expostas às luzes dos LEDs por até 72 h.

Cada amostra de espectro de solução coloidal primária (adquirida do espectrômetro HR4000 acima mencionado) foi ajustada a uma distribuição Voigt pela ferramenta de ajuste de pico múltiplo no software OriginPro 2016, avaliando a densidade óptica LSPR (OD), posição do pico ( $\lambda$ ), área integrada do pico (A), largura total na metade do máximo (FWHM) e larguras Gaussianas ( $w_G$ ) e de Lorentz ( $w_L$ ).

As imagens das nanopartículas presentes nas alíquotas das soluções submetidas ao aparelho foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM, JEOL JEM 1200EX-II, resolução de 0,5 nm). As cores de cada alíquota foram obtidas por estratificação de cores RGB a partir de imagens de cubetas adquiridas com uma câmera de smartphone de 12 mega pixels (Motorola MotoG5plus, Schaumburg, EUA). A correlação de Pearson apresentando a correlação ( $\mathcal{R}$ ) e a significância (P) foi realizada utilizando a linguagem Python.

### 3.3 SENSORIAMENTO COLORIMÉTRICO DE UTs COM USO DE AgNPs

A produção de AgNPs quase-esféricas capeadas com 0,1 mM de citrato de trissódio diidratado foi realizada de acordo com o item 3.1.

BSA (Sigma-Aldrich) foi adicionada (em proporções de 4%, 0,4% e 0,04%) às Cit-AgNPs (solução aquosa 0,1 mM de citrato trissódico diidratado (Biotec, 99,0%)) logo após o PLAL para auxiliar a ligação entre UTs e NPs. Buscando avaliar o efeito da adição de IS (Sigma-Aldrich) às nanopartículas, os espectros de UV-Vis de BSA, IS e Cit-AgNPs, antes e depois da adição de BSA e BSA + IS foram comparados.

Para identificar a ligação das Cit-AgNPs e BSA, a espectroscopia Raman foi conduzida em Cit-AgNPs com e sem a adição de BSA e com BSA em pó. Um

espectrômetro Raman (HR-TEC-X2 StellarNet, resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , faixa de deslocamento Raman de  $200 - 3900\text{ cm}^{-1}$ ) excitado por um laser de semiconductor de modo único estabilizado de espectro centrado em  $638\text{ nm}$  com  $50\text{ mW}$  (StellarNet, Lab-LS-638) acoplado com um microscópio CX31 com uma objetiva de  $10\times$  foi usado para medidas de Raman e SERS. As linhas de base foram corrigidas aplicando um método de suavização de mínimos quadrados assimétricos.

O peróxido de hidrogênio em contato com Cit-AgNPs reage para formar nanopartículas menores através do mecanismo de carga-descarga de elétrons (DEWANGAN *et al.*, 2019; HE; GARG; WAITE, 2012). No entanto, a presença de diferentes ligantes altera a dissolução oxidativa das nanopartículas de prata pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  (SIGG; LINDAUER, 2015). A oxidação das Cit-AgNPs por  $\text{H}_2\text{O}_2$  é potencializada devido à presença de PBUT na solução, que induz a desvinculação do BSA das Cit-AgNPs (HE; GARG; WAITE, 2012). A fim de investigar o papel do IS na oxidação de NPs, espectros de UV-Vis de Cit-AgNPs + BSA  $0,4\%$  e Cit-AgNPs + BSA  $0,4\%$  + IS  $236\text{ mg/L}$  contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  (35% PA, NEON, Brasil) foram aferidas nas concentrações de 20, 30, 40, 50 e 60% (v/v) de uma solução de  $0,35\%$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Para a calibração do sensor, as amostras contendo IS e PCS foram preparadas adicionando  $100\text{ }\mu\text{L}$  de uma solução de toxina urêmica (IS ou PCS) a  $900\text{ }\mu\text{L}$  de Cit-AgNPs + BSA  $0,4\%$ . Soluções com concentrações de toxina urêmica de 0, 0,5, 1, 5, 10, 15, 30, 50, 75 e  $100\text{ mg/L}$  foram utilizadas, resultando em amostras com concentração de BSA de  $0,36\%$  e concentrações de toxinas urêmicas uma ordem de magnitude menor que a solução original. Esse procedimento produz amostras com concentrações de toxinas urêmicas na faixa de ambientes normais e urêmicos.

As faixas de detecção para IS e PCS foram determinadas de acordo com as concentrações normais e urêmicas livres e totais (EUTOX, 2023), resumidas na Tabela 3. A proporção de concentração urêmica para concentração média normal é mais de 7 vezes maior para IS livre e mais de 68 vezes maior para IS total. Para o PCS, essa proporção é mais de 32 vezes maior para o PCS livre e mais de 12 vezes maior para o PCS total.

**Tabela 3 - Concentrações de toxinas urêmicas *ex vivo* como descritas por (EUTOX, 2023).**

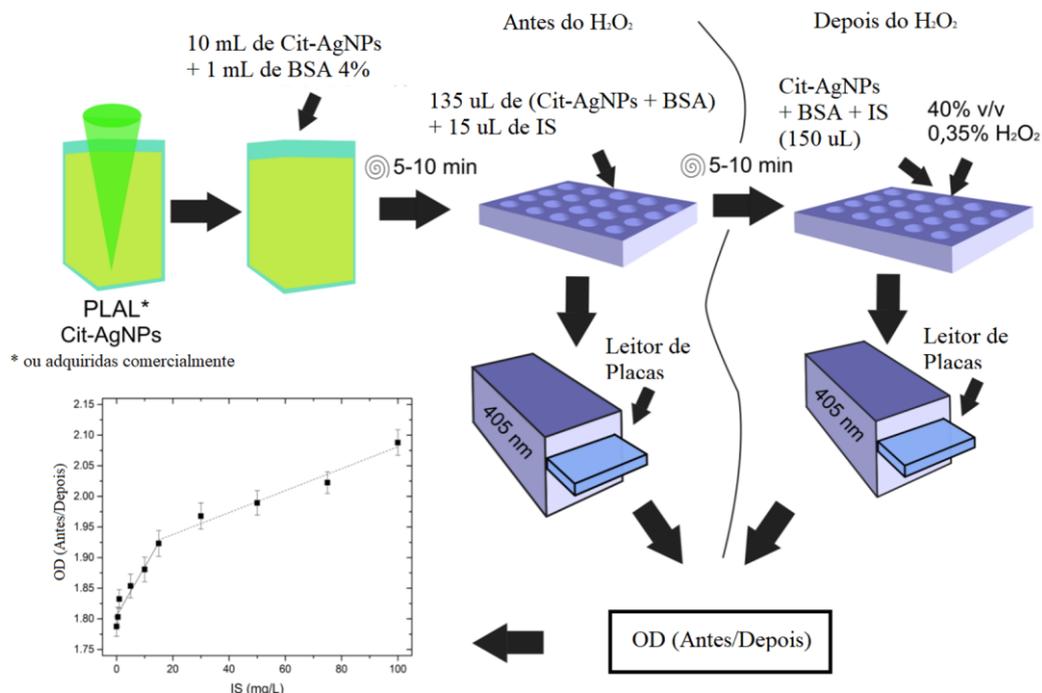
PBUT (livre ou total)	Normal (mg/L)	Urêmica (mg/L)
IS livre	0,53 ± 0,29	3,83 ± 2,46
IS total	0,54 ± 4,00	37,07 ± 26,50
PCS livre	0,08 ± 0,09	2,60 ± 5,10
PCS total	1,87 ± 2,31	23,00 ± 16,90

Fonte: Adaptado de SCHIEFER *et al.*, 2021.

As absorvâncias, antes e após a inserção de 40% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,35%), foram medidas a 405 nm usando 150 µL de cada amostra em um leitor de placa de 96 poços (Kasuki DR-200BS-NM, WUXI HIWELL DIATEK INSTRUMENTS CO. LTD., China, resolução de 0,001 OD). Um diagrama esquemático mostrando as etapas para uma medição de amostra é apresentado na Figura 9.

**Figura 9 - Demonstração do funcionamento do sensor baseado na oxidação de Cit-AgNPs.**

Primeiramente Cit-AgNPs são produzidas ou adquiridas comercialmente, são então submetidas à uma concentração de 0.36% de BSA por 5 a 10 min e então a UT é adicionada à solução coloidal em uma placa de leitura na razão 1:9, então a primeira leitura é realizada em 405 nm. Após 5 a 10 min da primeira leitura, uma solução de 40% v/v de uma solução de 0,35% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é inserida no poço que é então submetido a uma nova leitura em 405 nm. Por fim, a razão das densidades óticas das duas leituras indicará a concentração de PBUT inserida na placa.



Fonte: Adaptado de SCHIEFER *et al.*, 2021.

A fim de inferir o erro médio na preparação das amostras, foram medidas as absorvâncias para réplicas de amostras com as concentrações mais altas e mais baixas de IS.

As características metrológicas do sensor foram determinadas de acordo com (BIPM *et al.*, 2008). O limite de detecção (LoD) e o limite de quantificação (LoQ) foram calculados para  $P < 0,05$  como  $2S/\Delta N = 3$  e  $2S/\Delta N = 10$ , respectivamente, onde  $S$  é o sinal e  $\Delta N$  é o ruído do sinal em branco (DESIMONI; BRUNETTI, 2015).

Para determinar a resposta do sensor frente a uma concentração de PBUT, como o caso de IS (Sigma-Aldrich) e 2 UTs que não se ligam às proteínas (NPBUTs), como creatinina (INLAB) e ureia (Thermo Fisher Scientific), foi avaliada pelo sensor 2, 5, 8, e 10 min após a inserção de  $H_2O_2$ .

Para esta avaliação, pipetou-se 150  $\mu L$  de uma solução de Cit-AgNPs com BSA produzida por 20 min de PLAL e 15  $\mu L$  de água (CTRL). Foram adicionados creatinina (1 g/L) ou IS (250 mg/ L) ou ureia (20 g/L). A absorbância foi lida antes e após a inserção de  $H_2O_2$ , a partir da qual foi obtida a razão das densidades ópticas (DO).

### 3.4 APLICAÇÃO DO MODELO PIX2PIX NO ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

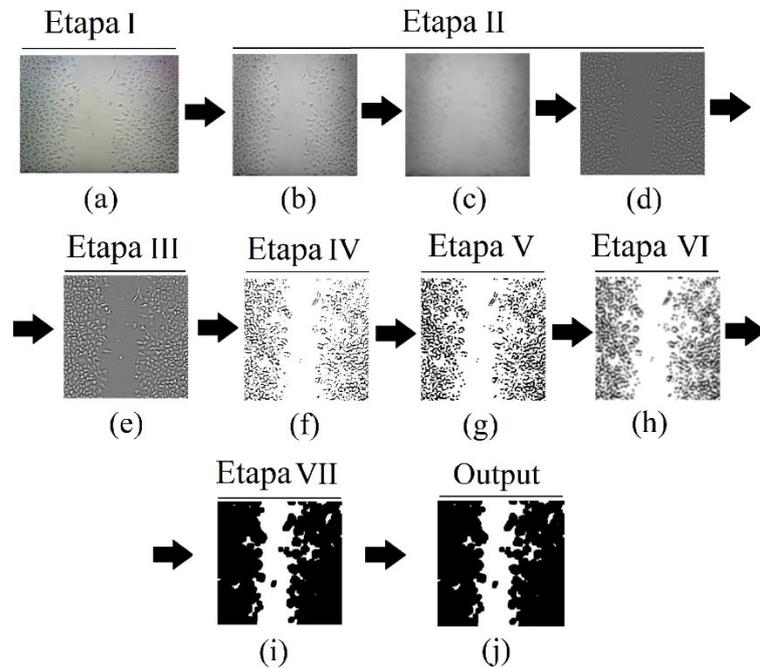
#### 3.4.1 Conjunto de dados

Este trabalho usa imagens de ensaios de cicatrização de feridas de um banco de dados contendo 341 imagens adquiridas por três pesquisadores de dois laboratórios independentes. As linhagens celulares foram cultivadas de acordo com (FAVRETTO *et al.*, 2021). Imagens de linhas de células endoteliais humanas EA.hy926 (ATCC®CRL2922, Manassas, VA, EUA) foram adquiridas com uma ocular digital DEM35 para microscópio (0,3 Mpixels, MiniSee Software, ampliação de 5 X, SCOPETEK, Hangzhou, China) com uma ampliação de microscópio de 4 X (microscópio invertido OPTIPHASE, Los Angeles, EUA). Um microscópio invertido AE2000 (MOTIC, Hong Kong, China) com uma ampliação de 40 X foi usado para obter imagens das linhagens celulares de adenocarcinoma MCF-7 (ATCCR®HTB-22) e MDA-MB-231 (ATCCR®HTB-26).

#### 3.4.2 Conjunto de dados verdade

Para obter as imagens de dados verdade, foi realizada uma sequência de operações de processamento de imagens, com etapas ilustradas na Figura 10. Dentro deste algoritmo, a largura real (RW, em mm) da área fotografada é utilizada como regulador de parâmetros (Etapa I).

**Figura 10 - Etapas do algoritmo desenvolvido para obter o conjunto de dados verdade a partir de imagens de entrada brutas. Essas etapas incluem redimensionamento, desfoque gaussiano, ajustes automáticos de brilho e contraste, limite adaptável e método de detecção de bordas Canny.**



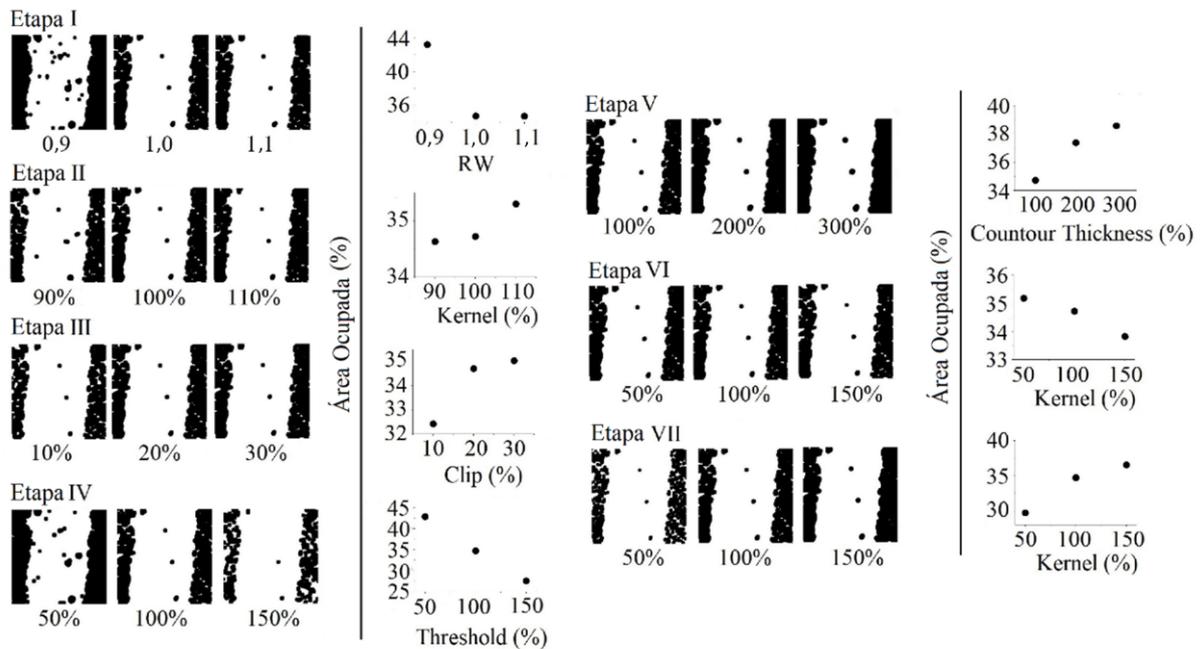
Fonte: Adaptado de SCHIEFER *et al.*, 2022.

A Figura 10a mostra a imagem original que está configurada para 1000 x 1000 pixels, e convertida para tons de cinza resultando na imagem da Figura 10b. Então, as distorções da luz de fundo são eliminadas subtraindo-se a imagem submetida a um desfoque gaussiano (Figura 10c) dela mesma (Figura 10b, Etapa II), resultando na imagem da Figura 10d. Uma correção automática de ajuste de brilho e contraste dada por um recorte do histograma da imagem (Figura 10e, Etapa III) é seguida por um limiar adaptativo (Figura 10f, Etapa IV) para eliminar detritos (pequenas partículas). Este limiar é utilizado como método de binarização para segmentar a imagem de acordo com um corte de intensidade de pixel, que transforma cada intensidade de pixel em 0 ou 100 % (preto e branco, respectivamente). O método de detecção de bordas de Canny (CANNY, 1986) é então usado para realçar as bordas das células, quando segue um método para desenhar contornos (Figura 10g, Etapa V). Este método de detecção de borda permite o aprimoramento da localização das células (Figura 10h e i) por um método de dupla etapa baseado na repetição de um borrão gaussiano seguido por um limiar (como o limiar descrito anteriormente), com grandes (Etapa VI) e pequenos tamanhos de kernel (Etapa VII), respectivamente. A etapa realizada da Figura 10g até a Figura 10h é baseada em um kernel grande que permite que as arestas detectadas se tornem homogêneas (sem pontos de inflexão), enquanto

a etapa realizada da Figura 10h para Figura 10i preenche a área total ocupada pelas células. Por fim, a imagem é redimensionada para 256 x 256 pixels (Figura 10j), a partir da qual é calculada a proporção de pixels brancos e pretos.

Cada uma das etapas mencionadas (I-VII) foi avaliada individualmente para uma imagem selecionada aleatoriamente a fim de verificar os efeitos de variáveis de cada função aplicada, conforme demonstrado na Figura 11.

**Figura 11 - Efeitos da alteração dos valores das variáveis em cada uma das 7 etapas do algoritmo na imagem de saída e na área ocupada calculada da imagem.**



Fonte: Adaptado de SCHIEFER *et al.*, 2022.

Na utilização desta sequência de operações de processamento de imagens, é possível definir uma única configuração de parâmetros (como valor de RW e tamanho do kernel) para um conjunto de imagens ou adaptar estes parâmetros para cada caso visando obter o melhor caso de saída. Assim, embora esse método tenha sido usado para eliminar resultados tendenciosos, esses parâmetros foram alterados em alguns casos para melhorar o conjunto de dados verdade.

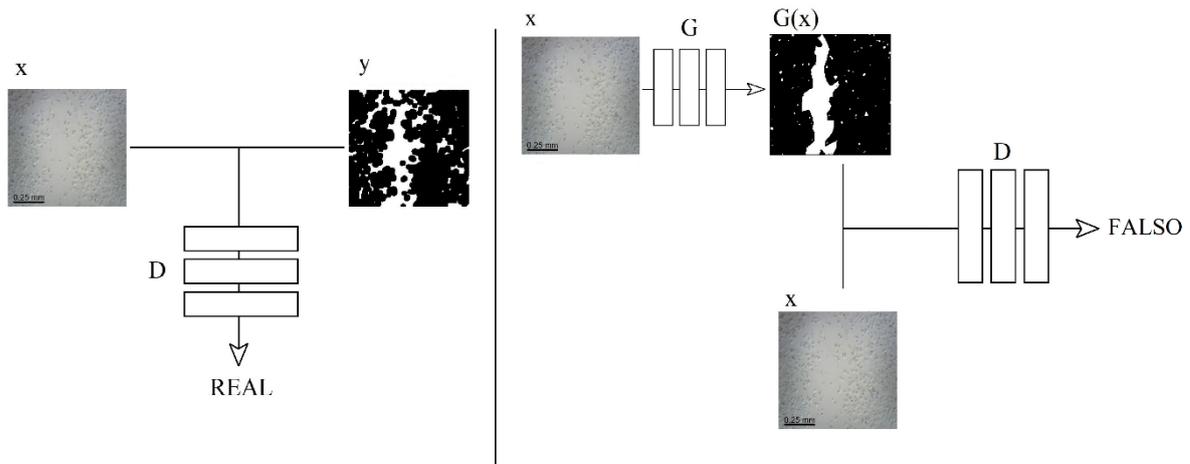
Pequenos ajustes nas variáveis, conforme indicado pela Figura 11, resultaram em variações de até 9% na Etapa I, 1% na Etapa II, 3% na Etapa III, 15% na Etapa IV, 4% na Etapa V, 1% na Etapa VI e 6% na Etapa VII. Um 15% na área detectada final ocupada por células, conforme indicado pelo gráfico da Figura 11 Etapa IV, indica o viés presente neste tipo de avaliação manual.

Como a entrada original e a saída esperada (verdade básica, GT) estão definidas, 400 imagens foram separadas em conjuntos de treinamento e teste usando 70% (280 imagens) e 30% (120 imagens) do número total de imagens, respectivamente.

### 3.4.3 Pix2pix

O modelo pix2pix, conforme descrito na introdução, é um GAN condicional, no qual o discriminador (D) aprende a discriminar entre combinações reais e falsas, enquanto o gerador (G) aprende a enganar D, conforme contextualizado ao aqui apresentado problema na Figura 12.

**Figura 12 - Treinando um pix2pix para mapear a imagem de entrada para a imagem em preto e branco. O discriminador indica que o dado verdade corresponde à saída correta da imagem de entrada original (esquerda). O gerador tenta enganar o discriminador criando uma imagem de saída falsa ( $G(x)$ ) enquanto o discriminador aprende a distinguir entre imagens de saída falsas e reais (direita).**



Fonte: Adaptado de SCHIEFER *et al.*, 2022.

O modelo pix2pix foi implementado com Keras usando o Tensorflow como *backend* (ABDELMOTAAL *et al.*, 2021) (com uso de GPU), no qual o treinamento foi realizado com o conjunto de dados de treinamento por 100 épocas, salvando o estado a cada 10 épocas para a avaliação do progresso. Para atingir esse objetivo, foi utilizado um computador com sistema operacional Windows 10 com 16 GB de RAM, CPU Intel® Core™ i7-7700HQ @ 2,80 GHz, processador baseado em x64 e NVIDIA GeForce GTX 1070. As áreas ocupadas adquiridas a partir do conjunto de dados verdade foram comparados com as áreas ocupadas obtidas a partir das imagens

emitidas pela rede desenvolvida. Os tempos de processamento entre a rede e o algoritmo de verdade também foram avaliados.

Para testar ainda mais os limites do modelo treinado, as imagens de teste de entrada foram giradas 90, 180 e 270°, enquanto eram invertidas horizontal e verticalmente, gerando 7 novas imagens por imagem original do conjunto de dados. Como as imagens de entrada não são quadradas, o processamento das imagens pelos modelos (que é baseado em imagens 256x256) pode ser avaliado pela comparação de imagens originais, giradas e invertidas, que devem apresentar áreas ocupadas idênticas.

Também foi realizado o ensaio de wound healing, utilizando células endoteliais submetidas a tratamento com as NPs, a fim de avaliar mais uma vez a capacidade do modelo na avaliação da migração celular. Para o ensaio, foram cultivadas células EA.hy926, células endoteliais humanas, em meio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Life Technologies, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS, Gibco, Grand Island, NE, EUA) e 10 mg / mL de penicilina / estreptomicina (Gibco, Grand Island, NE, EUA), mantida a 37 °C com 95% de umidade sob atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

O ensaio foi realizado em triplicata usando placas para cultivo celular de 12 poços, cada poço contendo 160.000 células EA.hy926 cultivadas até a formação da monocamada. As células foram submetidas a uma baixa concentração de SFB (1%) por 18 h em DMEM para reduzir a interferência da proliferação. Cada monocamada celular foi riscada em linha reta (0,5 mm, usando uma ponta de pipeta) para gerar a “ferida” e expostas aos tratamentos presentes na Tabela 4. A seguir foram incubadas por 24, 48 e 72 h a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

**Tabela 4 - Tratamentos usados no ensaio de migração celular. Nota: \* Produzidas com 20 min de PLAL. \*\* Produzidas com 40 min de PLAL. D 50% do volume de tratamento padrão.**

<b>Tratamento</b>	<b>Tratamento (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Meio de cultivo (<math>\mu</math>L)</b>
Cit	250	750
Cit-AgNPs 20*	250	750
Cit-AgNPs 40**	250	750
Cit-AuNPs 20*	250	750
Cit-AuNPs 40**	250	750
Cit-AgNPs 20* D	125	875
Cit-AuNPs 20* D	125	875

**Fonte: O autor.**

Para determinar a concentração de AgNPs nas soluções finais, 3 soluções aquosas contendo citrato e BSA, 3 soluções coloidais de Cit-AgNPs capeadas com

BSA produzidas por 20 min de PLAL, e 3 soluções coloidais de Cit-AgNPs capeadas com BSA produzidas por 20 min ou 30 min de PLAL foram obtidos.

Para testar o peso sólido presente em cada uma dessas soluções, primeiro, a agregação foi induzida pela adição de 500 mM de NaCl (99%, Sigma-Aldrich) (HUYNH; CHEN, 2011). Em seguida, 2 mL de cada solução foram inseridos em três tubos Eppendorf de 2 mL que foram previamente pesados em balança analítica (BEL, resolução de 0,0001 g), então submetidos à ultracentrifugação a 35.000 RCF (MCD-2000, HSIANGTAI) por 2 h (modificado de (MIDELET *et al.*, 2017)). O sobrenadante foi removido dos tubos, resultando em um tubo Eppendorf com um *pellet*. O tubo com o *pellet* foi pesado novamente e a ponderação inicial foi subtraída. Este procedimento foi realizado em triplicata para cada uma das 9 soluções finais. Os resultados foram submetidos a um teste ANOVA com post-hoc Dunnet para investigar diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre o controle e os tratamentos.

Cada poço foi fotografado com uma ocular digital DEM35 para microscópio (0,3 Mpixels, MiniSee Software, ampliação de 5 X, SCOPETEK, Hangzhou, China) com uma ampliação de microscópio 4 X (microscópio invertido OPTIPHASE, Los Angeles, EUA) em três diferentes localizações da ferida em 0, 24, 48 e 72 h, enquanto as células ainda estavam submersas no meio celular. Foi considerado 0 h o momento do risco.

As imagens foram analisadas com a rede neural para avaliação de migração celular descrita neste item. Os resultados foram submetidos a um teste ANOVA com post-hoc Dunnet para investigar diferenças estatisticamente significativas ( $P < 0,05$ ) entre o controle e os tratamentos.

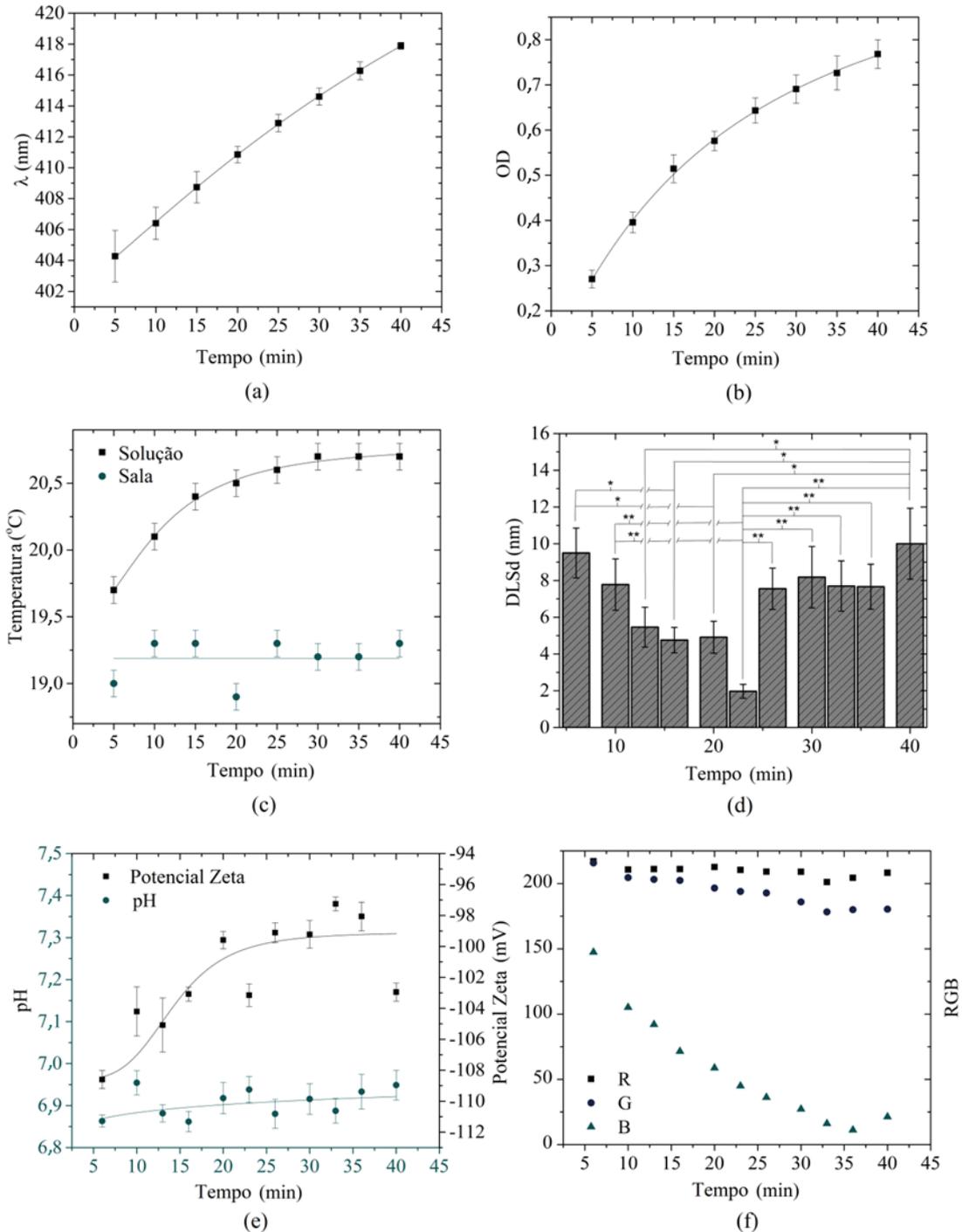
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NPs

#### 4.1.1 Produção e caracterização de AgNPs

Os parâmetros dos espectros de extinção para três coloides de Cit-AgNPs produzidos com 8 períodos diferentes de exposição ao PLAL (variando de 5 a 40 min) estão demonstrados na Figura 13a-c e com 11 períodos de exposição diferentes ao PLAL (5 a 40 min).

**Figura 13 - LSPR (a) posição do pico, (b) densidade óptica máxima do pico, (c) temperaturas do ambiente e da solução, (d) tamanho médio das Cit-AgNPs aferido por DLS (DLsD), (e) potencial Zeta e pH e (f) estratificação das cores das soluções coloidais. Notas: As linhas representam ajustes logísticos dos dados. \*P < 0.05 e \*\*P < 0.01.**



Fonte: Adaptado de SCHIEFER *et al.*, 2021.

Mesmo com a temperatura ambiente mantida em  $(19,2 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$  durante os 40 min, a temperatura da solução aumentou de  $19,7 ^\circ\text{C}$  para  $20,6 ^\circ\text{C}$  entre 15 e 25 min de PLAL, estabilizando em  $(20,6 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ .

Os tamanhos médios menores ( $P < 0.05$ ) estão presentes na faixa de 16 até 23 min de PLAL, apresentando seu menor valor em 23 min. De acordo com a literatura (BILLAUD *et al.*, 2007), com o aumento do tamanho médio das AgNPs, a LSPR experimenta um desvio para o vermelho (aumento de  $\lambda$ ) e um aumento da OD. Contudo, comparando os resultados da Figura 13a e Figura 13d, existe um indício de que as NPs estão reduzindo de tamanho médio até 23 min de PLAL enquanto  $\lambda$  aumenta e OD aumenta.

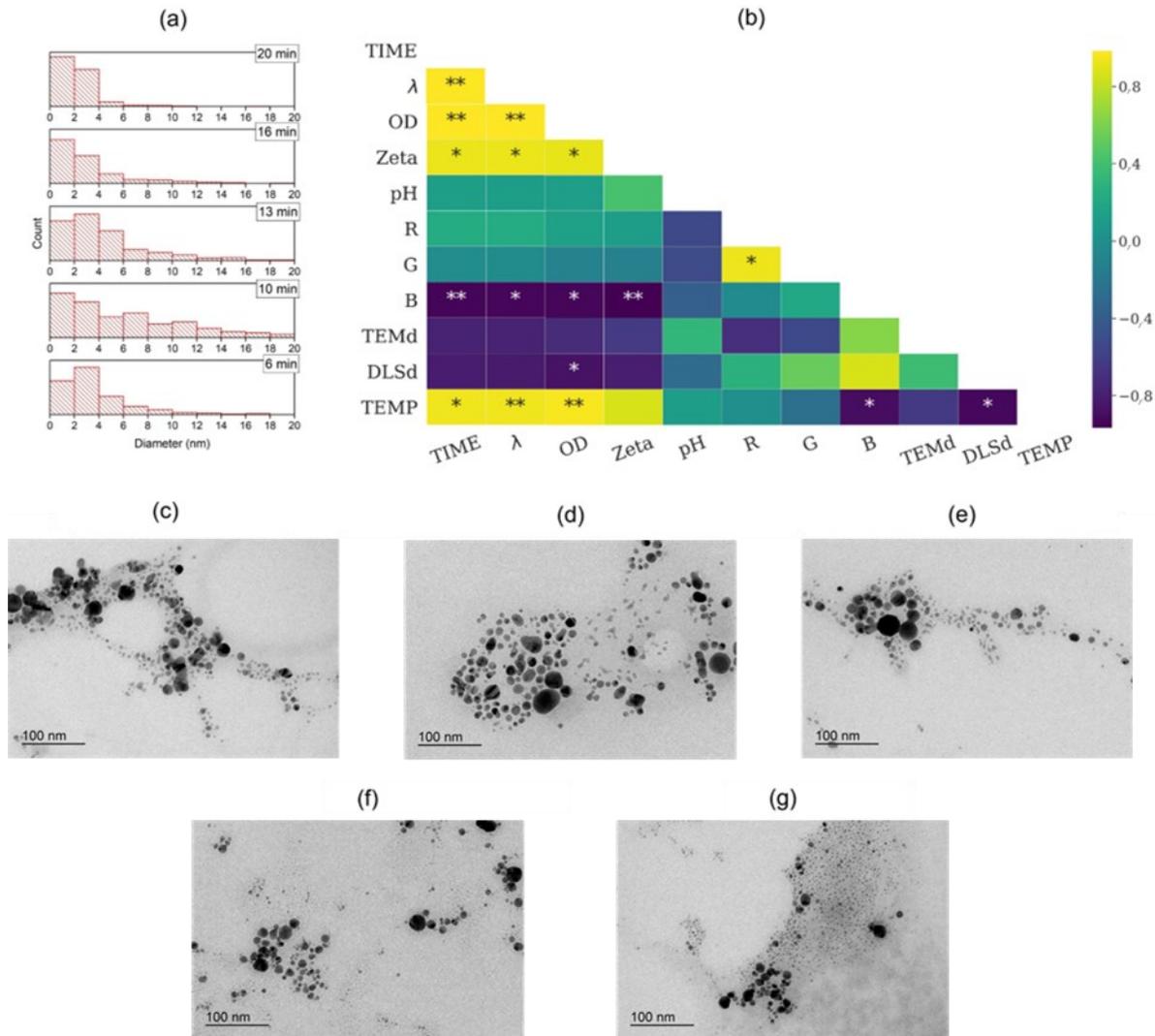
De acordo com a Figura 13e, houve um aumento do potencial Zeta também até 23 min de PLAL e uma diferença não significativa no valor do pH nestes tempos de exposição. A estabilização do potencial Zeta após os 23 min de exposição ao PLAL pode ser um indicativo de um limite após o qual novas NPs não são geradas, já que o potencial elétrico entre o fluido que permanece em contato com a NP e o fluido móvel não se altera significativamente e o tamanho médio de nanopartículas não é mais reduzido após este período de tempo.

A avaliação das cores das amostras está descrita na Figura 13f, onde é possível verificar que o valor de B decresce enquanto o tempo de exposição ao PLAL aumenta. A redução do valor de B indica que a solução se torna cada vez mais amarela, corroborando com a Figura 13a e Figura 13b.

Assim, é possível verificar, a partir da Figura 14, que o tamanho médio mínimo de Cit-AgNPs está localizado em 23 min, onde a taxa de aumento da temperatura é reduzida de  $(0,17 \pm 0,07) \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  para  $(0,02 \pm 0,01) \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ . Antes disso, o potencial Zeta aumenta e o DLSd diminui. Porém, após esse tempo, o potencial Zeta atinge um *plateau* e o DLSd aumenta.

As soluções de 6, 10, 13, 16 e 20 min de exposição à PLAL foram avaliadas por MET (ver Figura 14c-g), de onde é possível verificar que existe uma tendência de redução do tamanho médio das Cit-AgNPs e não existe uma alteração consistente no formato destas NPs.

**Figura 14 - Resultados de MET e correlações de Pearson para 6, 10, 13, 16 e 20 min de PLAL. (a) Histograma de tamanhos de Cit-AgNPs obtidas a partir de imagens de MET de 0 a 20 nm (NPs maiores foram identificadas, mas suas contagens são insignificantes quando comparadas com esta faixa de tamanho), (b) matriz de correlação de Pearson de 6, 10, 13, 16 e 20 min de PLAL fornecidos na faixa de cores conforme apresentado na barra de cores (lado direito). Imagens de MET de Cit-AgNPs em 6 (c), 10 (d), 13 (e), 16 (f) e 20 min (g) de exposição ao PLAL. Nota: Zeta representa o potencial Zeta, TIME o tempo de exposição ao PLAL e TEMP a temperatura média da solução. As características das LSPRs e os dados de temperatura média da solução foram adquiridos a partir dos ajustes apresentados na Figura 9. \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$ .**



Fonte: Adaptado de SCHIEFER *et al.*, 2021.

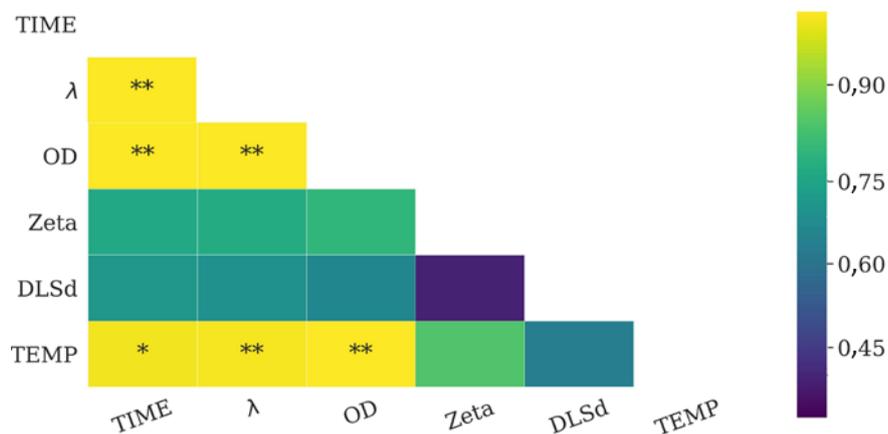
A partir das correlações de Pearson (Figura 14b), é possível verificar correlações positivas significativas ( $P < 0,05$ ) ( $\mathcal{R} > 0$ ) entre o tempo e  $\lambda$ , OD, potencial Zeta e temperatura da solução, enquanto uma correlação negativa significativa ( $P < 0,01$ ) ( $\mathcal{R} < 0$ ) entre o tempo e B é observada, estando de acordo com a Figura 8f. Embora o valor do tempo não esteja significativamente correlacionado com DLSd ou com TEMd, está significativamente ( $P < 0,05$ ) correlacionado positivamente ( $\mathcal{R} > 0$ )

com OD, que está significativamente ( $P < 0,05$ ) correlacionado negativamente ( $\mathcal{R} < 0$ ) com DLSd.

Uma vez que OD aumenta com o tempo e de acordo com as Figura 13d e f, é viável sugerir uma correlação negativa ( $\mathcal{R} < 0$ ) entre o tempo de exposição de PLAL e o DLSd nos 20 primeiros minutos de PLAL. Tanto a Figura 13a quanto a Figura 13a indicam uma distribuição de tamanho que tende a ficar ligeiramente mais estreita, bem como uma diminuição no tamanho médio de NPs.

Por outro lado, a Figura 15, que se refere ao tempo de ablação após 23 min, não demonstra correlação estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ) entre o DLSd e as demais variáveis, assim como o potencial Zeta não apresenta correlações significativas com as demais variáveis. Portanto, o tamanho médio das nanopartículas uma vez significativamente ( $P < 0,05$ ) correlacionado negativamente ( $\mathcal{R} < 0$ , não diretamente) com o tempo de ablação até 20 min, não está correlacionado (nem indiretamente) com o tempo de ablação após 23 min.

**Figura 15 - Matriz de correlação de Pearson para tempos de exposição ao PLAL superior a 23 min, dadas as correlações na faixa de cores conforme apresentado na barra de cores (lado direito). Nota: Zeta representa o potencial Zeta, TIME o tempo de exposição ao PLAL e TEMP a temperatura média da solução. As características das LSPRs e os dados de temperatura média da solução foram adquiridos a partir dos ajustes apresentados na Figura 9. \* $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$ .**



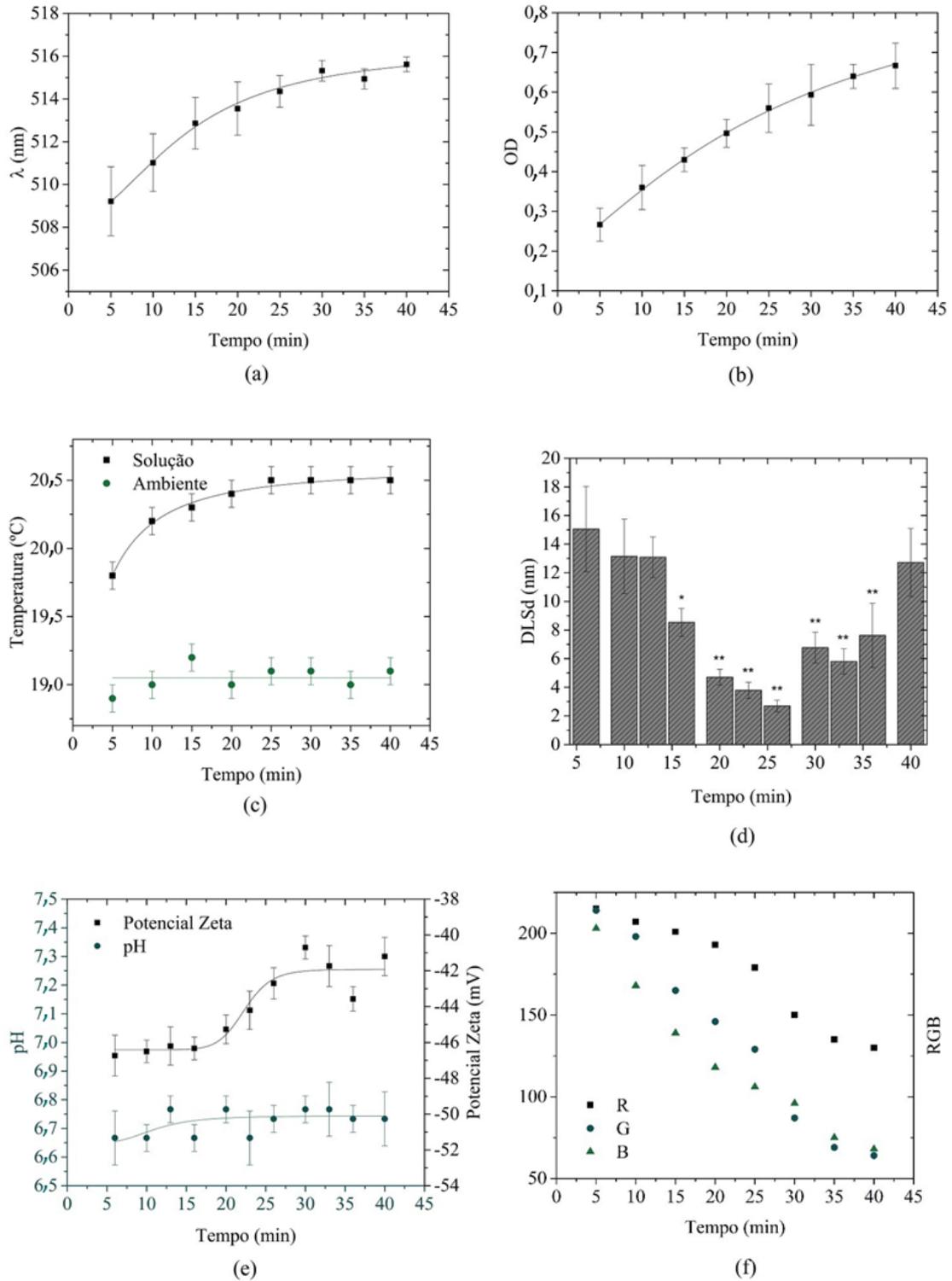
Fonte: Adaptado de SCHIEFER *et al.*, 2021.

De acordo com os resultados apresentados neste item, verifica-se que um tamanho médio mínimo de Cit-AgNPs poderia ser monitorado pela evolução do aumento da temperatura. O potencial Zeta seria uma segunda alternativa, mas o monitoramento da temperatura tende a ser mais barato e simples do que o supramencionado.

#### 4.1.2 Produção e caracterização de AuNPs

Os parâmetros dos espectros de extinção para três coloides de Cit-AgNPs produzidos com 8 períodos diferentes de exposição ao PLAL (variando de 5 a 40 min) estão demonstrados na Figura 16a-c e com 11 períodos de exposição diferentes ao PLAL (5 a 40 min) estão demonstrados na Figura 16d-f.

**Figura 16 - LSPR (a) posição do pico, (b) densidade óptica máxima do pico, (c) temperaturas do ambiente e da solução, (d) tamanho médio das Cit-AuNPs aferido por DLS (DLSd), (e) potencial Zeta e pH e (f) estratificação das cores das soluções coloidais. Notas: As linhas representam ajustes logísticos dos dados. \*P < 0.05 e \*\*P < 0.01.**



Fonte: O autor.

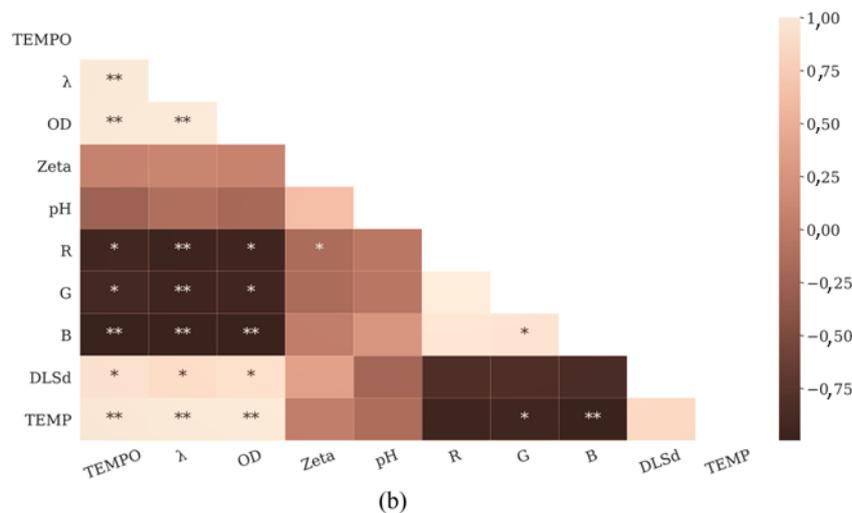
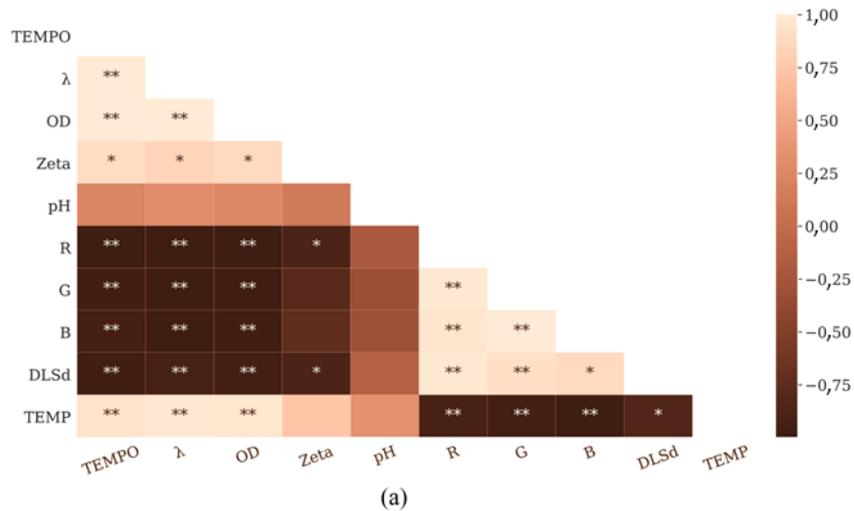
Novamente foi visto que, para o ouro, a temperatura ambiente não apresentou alteração, mantida em  $(19,1 \pm 0,1)$  °C durante os 40 min, já a temperatura da solução aumentou de 19,8 °C para 20,5 °C entre 15 e 25 min de PLAL, estabilizando em  $(20,6 \pm 0,1)$  °C.

Os tamanhos médios menores ( $P < 0.05$ ) estão presentes na faixa de 20 até 26 min de PLAL, apresentando seu menor valor em 26 min. Novamente, comparando os resultados da Figura 16a e Figura 16d, existe um indício de que as NPs estão reduzindo de tamanho médio até 26 min de PLAL enquanto  $\lambda$  aumenta e OD aumenta, mesmo fenômeno observado para AgNPs. De acordo com a Figura 13e, houve um aumento do potencial Zeta também até 26 min de PLAL e uma diferença não significativa no valor do pH nestes tempos de exposição.

A avaliação das cores das amostras está descrita na Figura 16f, onde é possível verificar que o valor de R, G e B decresce enquanto o tempo de exposição ao PLAL aumenta. A redução mais acentuada dos valores de G e de B indica que a solução se torna cada vez mais vermelha, corroborando com a Figura 13a e Figura 13b. Assim, é possível verificar, a partir da Figura 16, que o tamanho médio mínimo de Cit-AuNPs está localizado em 26 min, onde a taxa de aumento da temperatura é reduzida de  $(0,22 \pm 0,07)$  °C/min para  $(0,01 \pm 0,01)$  °C/min. Antes disso, o potencial Zeta aumenta e o DLSd diminui. Porém, após esse tempo, o potencial Zeta atinge um *plateau* e o DLSd aumenta.

Comparando os tempos até 26 min e após este período por meio de matrizes de correlação, a Figura 17 emerge.

**Figura 17 - Matrizes de correlação de Pearson de (a) 6, 10, 13, 16, 20 e 23 min de PLAL e de (b) 26, 30, 33, 36 e 40 min de PLAL fornecidas na faixa de cores conforme apresentado na barra de cores (lado direito) para AgNPs. Nota: Zeta representa o potencial Zeta, TEMPO o tempo de exposição ao PLAL e TEMP a temperatura média da solução. As características das LSPRs e os dados de temperatura média da solução foram adquiridos a partir dos ajustes apresentados na Figura 12. \*  $P < 0,05$  e \*\*  $P < 0,01$ .**



Fonte: O autor.

A Figura 17a indica, assim como a Figura 16b, que existem correlações entre DLSd e as demais variáveis que não são mais observadas em um tempo posterior a 26 min (Figura 17b), onde, por exemplo, DLSd se correlaciona significativamente ( $P < 0.01$ ) negativamente ( $R < 0$ ) com as variáveis TEMPO,  $\lambda$  e OD em um primeiro momento (Figura 17a) e então se correlaciona significativamente ( $P < 0.05$ ) positivamente ( $R > 0$ ) para tempos de exposição ao PLAL superiores a 26 min (Figura 17b).

Conforme observado na revisão de literatura, diferenças no raio (entre 2 e 12 nm) não causam desvios para o vermelho significantes, mas aumentam a OD

(conforme sugere a Figura 1). Já o aumento de densidade do agente surfactante ao redor da NP (aumento da espessura @shell) causa desvio para o vermelho e aumento da densidade ótica (Figura 2).

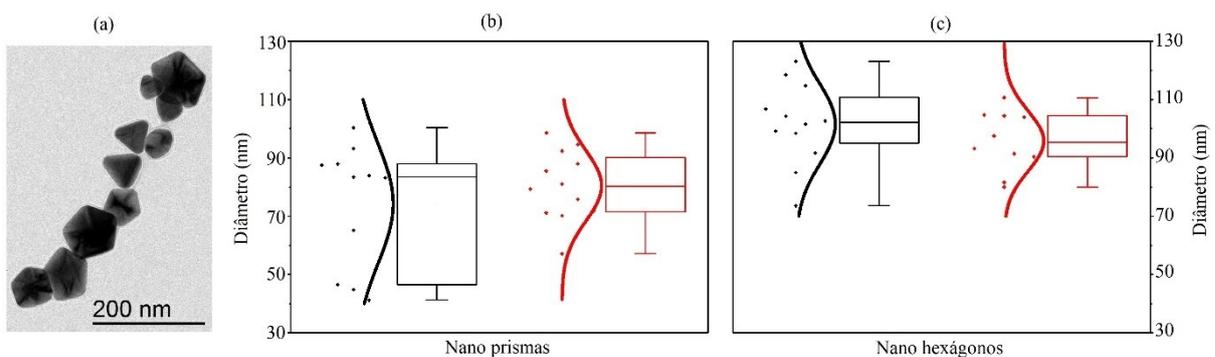
De tal forma, tanto para as Cit-AgNPs quanto para as Cit-AuNPs, um padrão igual foi observado, em que o desvio para o vermelho não está associado ao aumento do tamanho médio destas partículas no meio coloidal, mas é possível encontrar a região temporal de PLAL em que são encontrados os menores tamanhos médios de NPs a partir do simples monitoramento da temperatura da solução.

## 4.2 FOTOCONVERSÃO DE NPs

### 4.2.1 Repetibilidade do aparelho

Para verificar a repetibilidade e os resultados do LIPS, duas alíquotas da mesma solução coloidal ablada, de nanopartículas de prata quase esféricas de diâmetro médio de 5 nm, foram submetidas simultaneamente ao aparelho aqui descrito por 72 h (ver Figura 18a); a Figura 18 demonstra a conversão de forma em nanoprismas de diâmetro circunscrito de  $(74 \pm 21)$  nm e  $(80 \pm 12)$  nm (Figura 18b) e nanohexágonos de diâmetro circunscrito de  $(102 \pm 14)$  nm e  $(96 \pm 10)$  nm (Figura 18c) para cada alíquota, respectivamente. Um teste de ANOVA unidirecional indicou uma diferença não significativa entre os resultados das alíquotas, a partir das quais um valor de P de  $P = 0,39$  e um valor de razão  $F = 0,76$  foram adquiridos para nanoprismas e  $P = 0,29$  e  $F = 1,20$  para nanohexágonos.

**Figura 18 - Análises MET de duas alíquotas de uma única solução coloidal ablada submetida a LIPS. (a) Exemplo de imagem MET adquirida. Duas alíquotas da mesma solução são apresentadas em preto (esquerda) e vermelho (direita), respectivamente. (b) Distribuições normais de diâmetros circunscritos de nanoprismas e (c) nanohexágonos.**



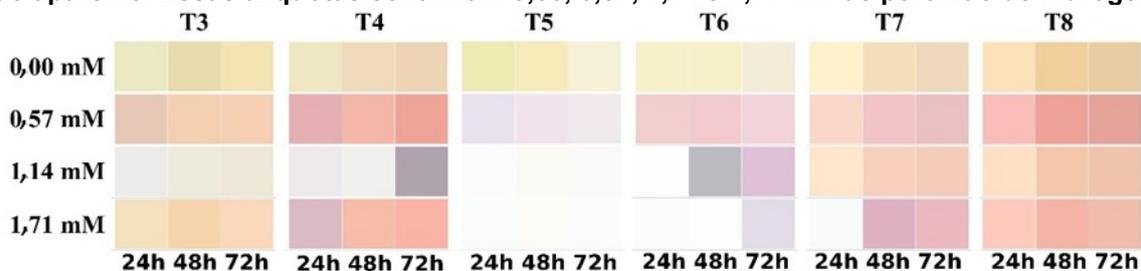
Fonte: O autor.

A partir da Figura 18, é possível identificar o diâmetro médio circunscrito dos nanoprismas como sendo  $(28 \pm 5)$  % menor que o tamanho médio do diâmetro circunscrito dos nanohexágonos, enquanto uma boa concordância das distribuições de tamanho pode ser observada entre as alíquotas para nanoprismas e nanohexágonos. Assim, este resultado demonstra a capacidade do aparelho de foto converter múltiplas alíquotas ao mesmo tempo sob as condições ideais de iluminação, temperatura e umidade relativa, permitindo a análise dos efeitos do peróxido de hidrogênio no processo.

#### 4.2.2 Avaliação de múltiplas amostras submetidas ao aparelho

Como a cor das soluções coloidais pode indicar mudanças na forma, densidade, distribuição e tamanho das próprias nanopartículas, as cores das alíquotas foram obtidas em intervalos de 24 h ao longo de 72 h, conforme mostrado em Figura 19.

**Figura 19 - Seis amostras de soluções coloidais (T3 – T8) avaliadas em 24, 48 e 72 h de exposição ao aparelho. Essas alíquotas continham 0,00, 0,57, 1,14 e 1,71 mM de peróxido de hidrogênio.**



Fonte: O autor.

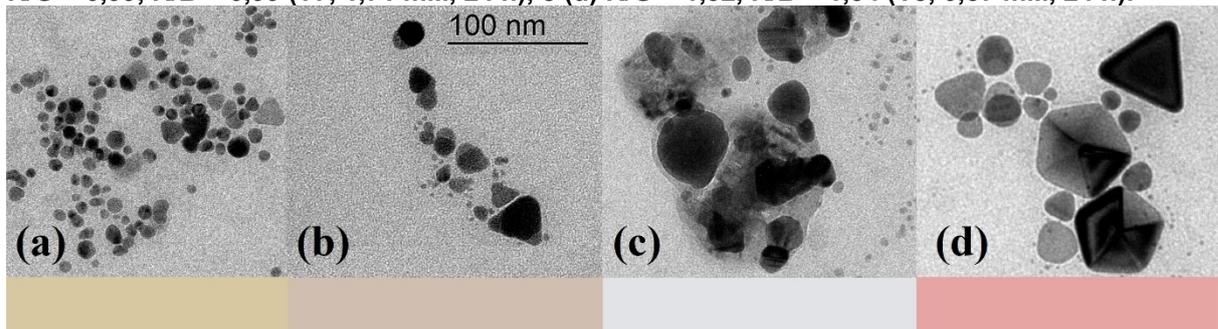
Da Figura 19, pode-se notar 3 principais comportamentos distintos para as cores de dispersão foto convertidas, tais como:

- Alíquotas sem peróxido de hidrogênio, com mesmo volume, citrato, incidência de luz, temperatura, umidade relativa, tempo de exposição e pH, apresentaram cores distintas. Como Figura 18 indica que o aparelho está causando efeitos similares em alíquotas de uma mesma amostra, pequenas variações nas características das soluções coloidais originais de nanopartículas de prata cobertas com citrato quase esféricas causadas por tempos de ablação ligeiramente diferentes (< 2 min) pode interferir no processo de síntese

- Alíquotas de uma mesma solução coloidal, com a mesma concentração de  $H_2O_2$  ou sem peróxido de hidrogênio, têm sua cor alterada de acordo com o tempo de exposição, demonstrando uma dependência direta da síntese e do tempo de exposição
- Alíquotas de uma mesma solução coloidal com diferentes concentrações de  $H_2O_2$  no mesmo tempo de exposição apresentam cores diferentes, indicando uma estrita dependência entre forma-fotoconversão e concentração de peróxido de hidrogênio.

A partir de Figura 19 pode-se inferir, independentemente da solução coloidal primária e mesmo após 72 h de exposição ao aparelho, que as cores da solução vão ficando mais vermelhas à medida que a fotoconversão progride (de 24 h para 72 h). Como a síntese mediada por plasmon é baseada na agregação de sementes e pequenas nanopartículas em nanopartículas maiores, é possível indicar uma progressão da síntese de Figura 20a para Figura 20b para Figura 20d, também concordando com a tendência da solução se tornar mais vermelha quando nanopartículas quase esféricas são convertidas em nano prismas e nano hexágonos.

**Figura 20 - Imagens MET de AgNPs submetidas ao LIPS com as cores das soluções abaixo delas (a) R/G = 1,06, R/B = 1,33 (T3, 0,00 mM, 48 h), (b) R/G = 1,10, R/B = 1,27 (T7, 0,00 mM, 72 h), (c) R/G = 0,99, R/B = 0,99 (T7, 1,71 mM, 24 h), e (d) R/G = 1,32, R/B = 1,34 (T8, 0,57 mM, 24 h).**



Fonte: O autor.

Portanto, se esta tendência de fato representa o progresso da síntese mediada por plasmon, pode-se sugerir que nanopartículas quase esféricas (diâmetro médio circunscrito de  $(6 \pm 5)$  nm, Figura 20a) tornam-se nano prismas (diâmetro médio circunscrito de  $(30 \pm 8)$  nm, Figura 20b), que eventualmente se agregam para formar nano hexágonos (diâmetro médio circunscrito de  $(70 \pm 4)$  nm, Figura 20d).

Um fenômeno intrigante acontece quando a solução se torna transparente - NPs ainda são visíveis na solução e são fortemente cobertos por citrato (a região mais escura formando um halo ao redor dos NPs em (Figura 20c).

Figura 20b (um exemplo de síntese mediada por plasmon de baixa intensidade sem  $H_2O_2$ ) indica a capacidade dessas nanopartículas de sofrer síntese mediada por plasmon com incidência de luz de baixa intensidade, enquanto  $H_2O_2$ , aliás, serve como catalisador desse processo (como visto em Figura 20d). A Figura 20d descreve T8 com 1,71 mM em 24 h, o que indica um estágio final (formação de nano hexágono) de síntese mediada por plasmon em 24 h, o que diminui drasticamente o tempo necessário para sintetizar nanopartículas quase esféricas em nano hexágonos com a adição de peróxido de hidrogênio.

No entanto, quantidades específicas de peróxido de hidrogênio induzem as razões R/G e R/B a se tornarem unitárias (como mostrado em Figura 20c); uma possível blindagem do LSPR.

Para relacionar as características de LSPR (densidade óptica (OD), posição de pico ( $\lambda$ ), largura total na metade do máximo (FWHM), razão Gaussiana para Lorentziana (wG/wL), e área (A)) da solução coloidal primária (solução coloidal antes de ser submetida ao aparelho) com as razões R/G e R/B (estágio de síntese - após ser submetida ao aparelho), temos definiram as quantidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\mu$ ,  $\nu$  e  $\xi$ , que representam o desvio percentual de  $\lambda$ , FWHM, wG/wL, A e OD, respectivamente. A partir dessas quantidades, surge um mapa de calor em Figura 21.

**Figura 21 - Mapa de calor da razão de cor para  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\mu$ ,  $\nu$  e  $\xi$  (desvio percentual de  $\lambda$ , FW HM, wG/wL, A e OD, respectivamente – superior esquerdo e superior direito) de acordo com as concentrações molares de peróxido de hidrogênio (0,00, 0,57, 1,14 e 1,71) para cada período de 24, 48 e 72 h para T3, T4, T5, T6, T7 e T8. (inferior esquerdo) razão R/G. (canto inferior direito) Relação R/B. As médias foram 402,07 nm, 67,20 nm, 1,40, 28,03 nm e 0,31 para  $\lambda$ , FW HM, wG/wL, A e OD, respectivamente.**



Fonte: O autor.

Identificando  $R/G > 1,3$  e  $R/B > 1,3$  simultaneamente (R sendo, no mínimo, 30 % superior a G e B) em:

- T4 0,57 mM 48 h
- T4 0,57 mM 72 h
- T4 1,71 mM 48 h
- T4 1,71 mM 72 h
- T8 0,57 mM 24 h
- T8 0,57 mM 48 h
- T8 0,57 mM 72 h
- T8 1,71 mM 48 h

T4 e T8 tiveram as melhores respostas, onde os valores de  $\xi$  foram significativamente maiores em comparação com outras amostras. Valores maiores de  $\xi$  refletem maiores ODs, e maiores relações R/G e R/B indicam um estágio possivelmente mais avançado da síntese. Uma correlação de Pearson entre OD e tamanho hidrodinâmico médio de NPs (DLSd) (obtida de SCHIEFER *et al.*, 2021)

resulta em um coeficiente de correlação de Pearson ( $\mathcal{R}$ ) de  $\mathcal{R} = -0,91$  e uma significância de  $P = 0,03$ .

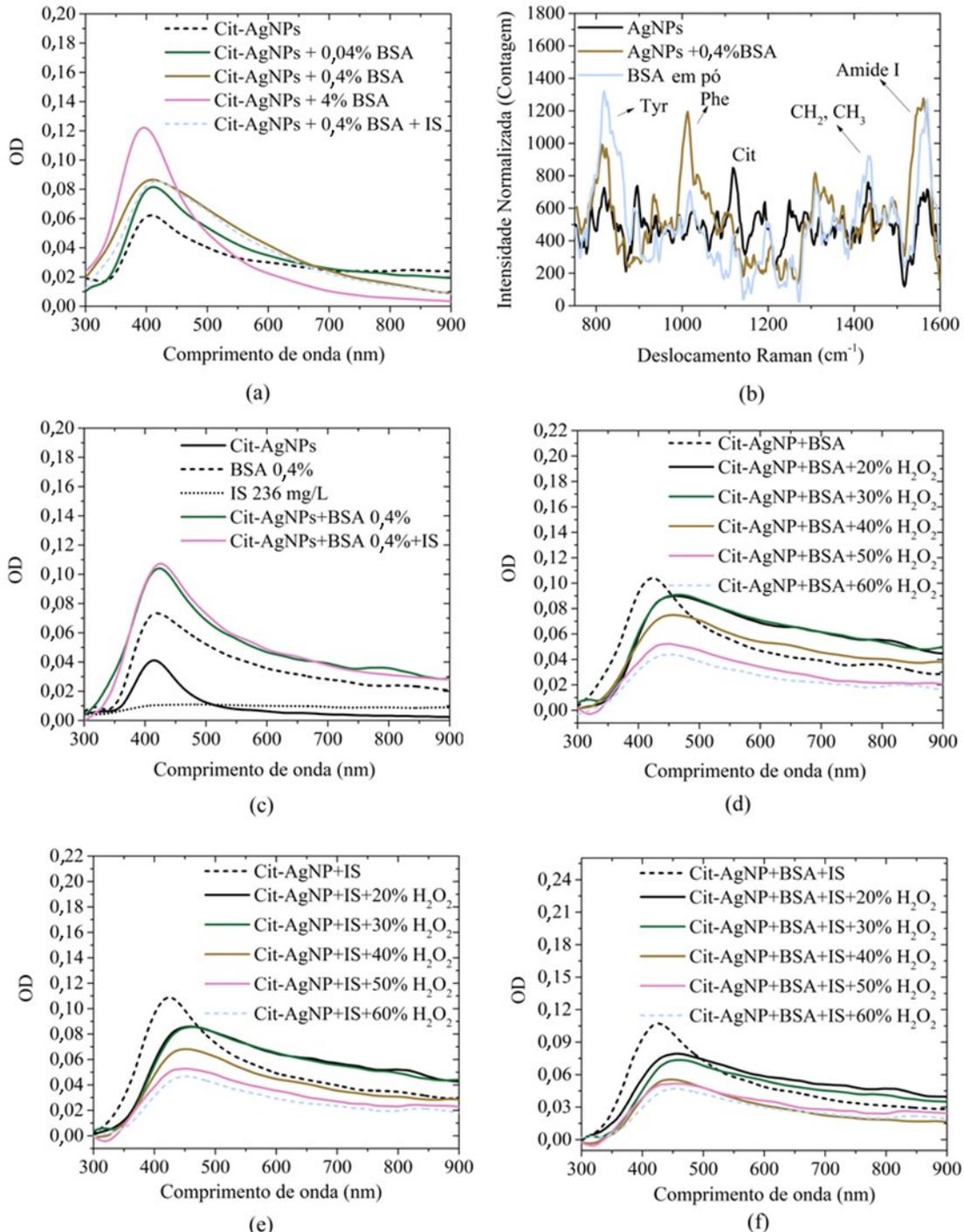
Esperar que nanopartículas menores formem nanoprismas de maneira mais rápida é uma afirmação razoável, uma vez que a síntese mediada por plasmon de nanopartículas quase esféricas é baseada na tendência de sementes de nanopartículas se aglomerarem em nanopartículas maiores de formas desejadas

#### 4.3 SENSORIAMENTO COLORIMÉTRICO DE UTs COM USO DE AgNPs

O efeito da interação Cit-AgNPs e BSA no LSPR é mostrado na Figura 22a para amostras com concentrações de BSA de 0,04% (w/v), 0,4% (w/v) e 4% (w/v). A interação é revelada por mudanças no OD e na simetria da LSPR. Além disso, a adição de IS à amostra com 0,4% de BSA não resulta em efeitos perceptíveis. Essa interação também é observada nos espectros Raman.

Como mostrado na Figura 22b, a adição de BSA às Cit-AgNPs reduz a intensidade do pico de Citrato (Cit) (GRYS *et al.*, 2020) e aumenta os picos de tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) e Amida-I (FAZIO *et al.*, 2016). Este comportamento está de acordo com a literatura e é um indicativo da ligação Cit-AgNPs e BSA.

**Figura 22 - LSPR de Cit-AgNPs obtidas com uma taxa de aumento de temperatura de  $(0,02 \pm 0,01) \text{ }^\circ\text{C/min}$ . Foram utilizadas soluções contendo 0,04, 0,4 e 4% de BSA e 236 mg / L de IS; (b) Espectros Raman de Cit-AgNPs, BSA em pó e Cit-AgNPs com 0,4% de BSA. Tyr: Tirosina, Phe: Fenilalanina, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> e desvios Amida-I foram obtidos de (FAZIO *et al.*, 2016) e Cit: Citrato trissódico de (GRYS *et al.*, 2020) (c) espectros de absorvância de Cit-AgNPs, BSA 0,4%, IS 236 mg/L, Cit-AgNPs com BSA 0,4% e Cit-AgNPs com BSA 0,4% e 236 mg/L de IS; (d), (e) e (f) demonstram a correlação entre a absorvância e a quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na amostra.**



Fonte: Adaptado de SCHIEFER *et al.*, 2021.

A Figura 22c mostra os espectros de absorvância de Cit-AgNPs, BSA, IS, Cit-AgNPs + BSA e Cit-AgNPs + BSA + IS. Conforme já verificado na Figura 22a,

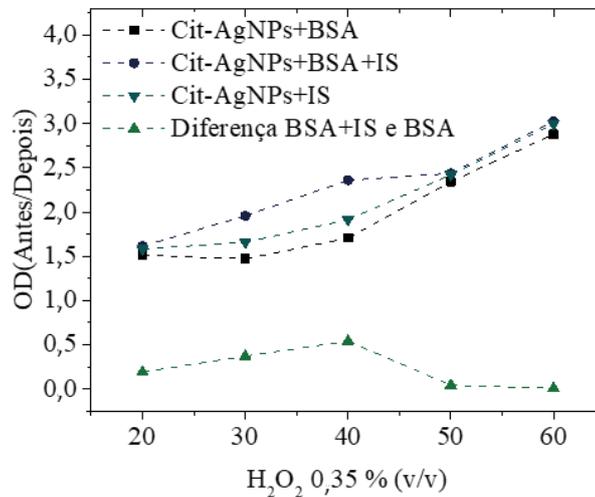
diferenças importantes não são observadas após a adição de IS à amostra Cit-AgNPs + BSA.

Uma vez que a ligação de BSA a Cit-AgNPs foi indicada por SERS na Figura 22b e a ligação de IS e BSA foi previamente estudada (DEVINE *et al.*, 2014), os efeitos dos ligantes na dissolução de AgNPs na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram investigados. A albumina é uma proteína termossensível e fluorescente. Quando a albumina é aquecida a temperaturas elevadas, ocorrem mudanças em sua conformação tridimensional, o que pode levar à perda de sua atividade biológica. A temperatura de desnaturação da albumina varia dependendo da fonte e do grau de pureza da proteína, mas geralmente fica entre 60-80°C (RIZZI *et al.*, 2015). Sendo assim, a exposição prolongada da albumina ao laser utilizado na espectroscopia Raman acarretará na perda da sensibilidade pela desnaturalização da amostra acrescida pela perda devida à fluorescência da amostra. Desta maneira, o tempo de exposição da amostra ao laser deve ser reduzido, comprometendo assim a relação sinal-ruído.

A ligação de PBUTs, como IS e PCS, às Cit-AgNPs e às Cit-AgNPs + BSA pode permitir sua quantificação por afetar a OD da LSPR, um comportamento sugerido por (SIGG; LINDAUER, 2015). Como pode ser visto na Figura 22d-f, quando ambos, BSA e IS estão presentes na amostra de Cit-AgNPs, as diminuições na OD da LSPR para as concentrações mais baixas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são mais pronunciadas. Uma diminuição da OD de mais de 20% é observada para a concentração mais baixa avaliada (20% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

O comportamento indicado pela Figura 22d-f evidencia uma possível correlação entre a concentração de PBUTs e a OD da LSPR, sugerindo uma alternativa para quantificar toxinas como IS e PCS. As razões das ODs, antes e depois da inserção de diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas amostras, são demonstradas na Figura 23. As concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizadas na figura 23 foram determinadas experimentalmente visando reduzir a OD da LSPR para Cit-AgNPs em aproximadamente 50% da OD original.

**Figura 23 - OD a 405 nm de acordo com a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para ambos Cit-AgNPs + BSA com e sem IS 236 mg/L, Cit-AgNPs com IS 236 mg/L, e a diferença entre Cit-AgNPs + BSA com e sem IS (valor absoluto). As linhas tracejadas que conectam os símbolos são apenas um auxílio visual.**



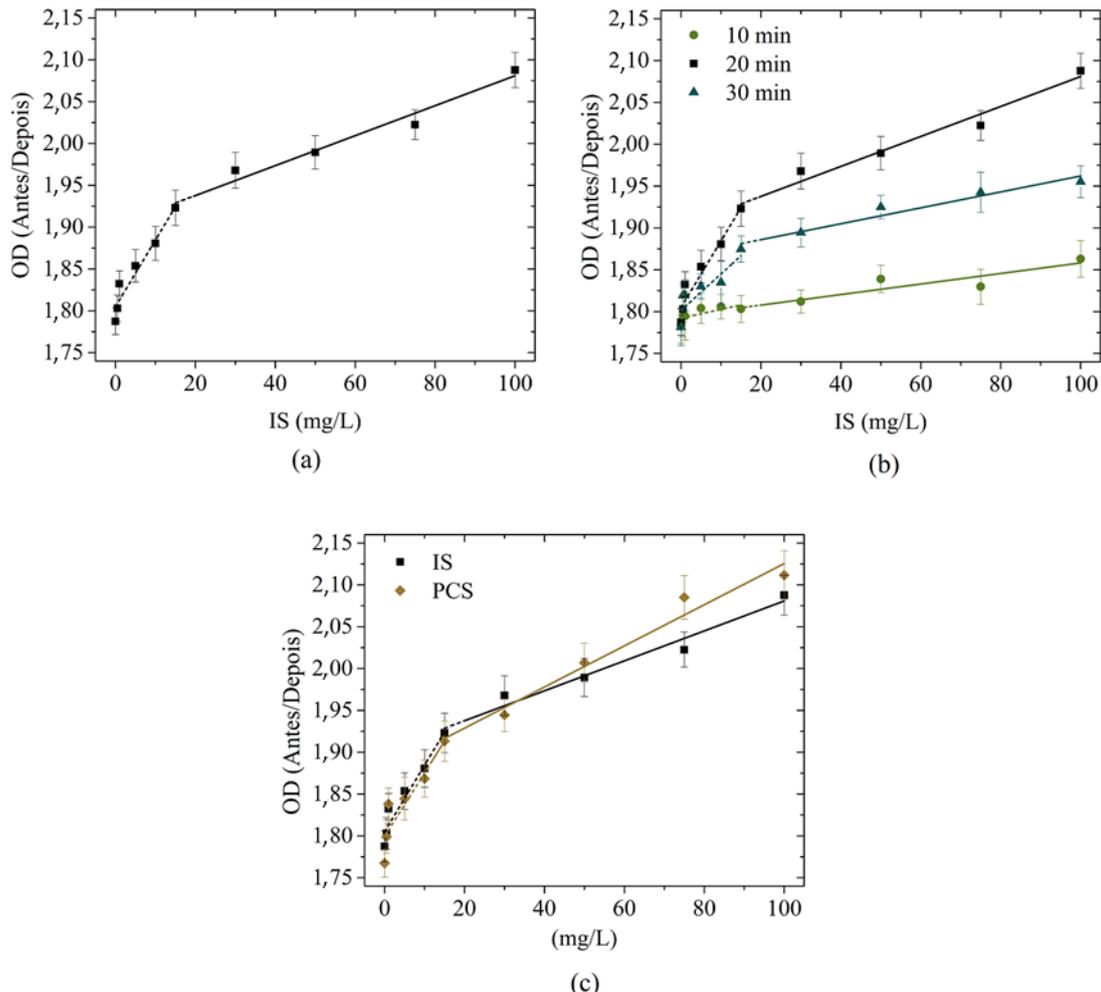
Fonte: Adaptado de SCHIEFER *et al.*, 2021.

A razão de OD aumenta com a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para as três primeiras concentrações, no entanto, para 40% (v / v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,35%) a diferença entre as razões de OD das amostras com e sem IS é maximizada. Portanto, esta concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi escolhida para a operação do sensor de PBUTs. É importante notar que não foram encontradas diferenças significativas no pH da solução para essas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

A proporção entre a albumina e as toxinas permanece aproximadamente a mesma que a encontrada em sistemas biológicos usando uma concentração de BSA de 0,4% (10 vezes mais baixa do que a concentração normal de albumina no sangue) e diluindo as concentrações de IS e PCS 10 vezes.

A Figura 24a mostra a razão de OD para diferentes concentrações de IS nas amostras de Cit-AgNPs + BSA + IS. Na curva de resposta do sensor da Figura 24a, duas regiões lineares podem ser distinguidas. A faixa inferior, abaixo de 15 mg/L de IS, com sensibilidade de  $(0,008 \pm 0,001) \text{ (mg/L)}^{-1}$  e a faixa de 15 a 100 mg/L de IS com sensibilidade  $(0,0018 \pm 0,0002) \text{ (mg/L)}^{-1}$ .

**Figura 24 - Curva de resposta do sensor dada em termos de razão OD (antes e depois da inserção de 40% (v/v) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,35%)) em função da concentração de PBUTs em amostras Cit-AgNPs + BSA 0,36%. Os dados correspondem a NPs obtidas com diferentes taxas de crescimento de temperatura: (a) Detecção de IS com a taxa de crescimento de temperatura de 0,02 °C/min alcançada após 20 min de PLAL; (b) Detecção de IS com taxa de crescimento de temperatura de 0,08 °C/min, 0,02 °C/min e 0,008 °C/min após 10, 20 e 30 min de PLAL, respectivamente; (c) Detecção de IS e PCS com taxa de crescimento de temperatura de 0,02 °C/min após 20 min de PLAL. As linhas são ajustes lineares para dados em duas regiões de concentração, de 0 a 15 mg/L (linhas tracejadas) e de 15 a 100 mg/L (linhas contínuas).**



Fonte: Adaptado de SCHIEFER *et al.*, 2021.

Para verificar o impacto do tamanho médio das NPs na sensibilidade do sensor, a razão de ODs foi obtida para Cit-AgNPs produzidas em taxas de crescimento de temperatura de 0,08 °C/min, 0,02 °C/min e 0,008 °C/min. Os resultados mostrados na Figura 24b e na Tabela 5 estão de acordo com dados previamente relatados na literatura (KOZHUSHNER *et al.*, 2014; RATHORE; KURCHANIA; PANDEY, 2015), que afirmam que maiores sensibilidades são obtidas com NPs menores. Embora a concentração de Cit em PLAL tenha mudado de 1,0 para 0,1 mM, a maior

sensibilidade foi obtida com Cit-AgNPs quando a taxa de crescimento de temperatura foi de  $(0,02 \pm 0,01)$  °C/min, que se relaciona ao menor tamanho médio.

Conforme o tamanho de uma NP diminui, os elétrons em sua superfície se tornam cada vez mais confinados (SCHULLER, 2003), além disto, as partículas menores têm razões de superfície-volume maiores, o que significa que uma maior densidade de elétrons total localizada na superfície da NP menor (NOVOTNY, 2011). Portanto, as NPs menores geralmente são mais sensíveis do que as partículas maiores por apresentarem uma SPR mais intensa, tornando-as melhores para uso em sensores colorimétricos, como o do tipo aqui apresentado. Isto é um indicativo da preservação geral deste comportamento da solução coloidal (VERMA *et al.*, 2015), onde foi possível observar que NPs produzidas por PLAL com  $(0,02 \pm 0,01)$  °C/min foram as caracterizadas com menor tamanho médio e melhor resposta de sensoriamento. Além disso, não há diferença estatística entre as concentrações de NPs nos coloides decorrentes dos tempos de exposição ao PLAL de 20 e 30 min, um indicativo de que o principal efeito contribuinte para a sensibilidade do sensor se refere ao tamanho médio das Cit-AgNPs.

**Tabela 5 - Relação de sensibilidade do sensor com o tempo de exposição ao PLAL. Valores obtidos a partir da Figura 24b.**

Taxa de crescimento da temperatura °C/min	Tempo aproximado de exposição ao PLAL (min)	Sensibilidade 0-15 mg/L (mg/L) <sup>-1</sup>	Sensibilidade 15-100 mg/L (mg/L) <sup>-1</sup>
0.08	10	0,0010±0,0005	0,0006±0,0002
0.02	20	0,008±0,001	0,0018±0,0002
0.008	30	0,004±0,001	0,0001±0,0001

Fonte: Adaptado de SCHIEFER *et al.*, 2021.

Neste sentido, o melhor desempenho do sensor foi obtido nas seguintes condições: utilizando Cit-AgNPs produzidas por PLAL por um período de 20 min, quando a taxa de crescimento da temperatura de  $(0,02 \pm 0,01)$  °C/min é atingida.

De acordo com a literatura e a partir de experimentos realizados neste trabalho, Cit-AgNPs ligam-se ao BSA (SHRIVASTAVA; DASH, 2010; MAKYLA; PALUCH, 2009). Além disso, é bem conhecido que PBUTs, como IS e PCS, ligam-se à BSA (DEVINE *et al.*, 2014) enquanto H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxida as AgNPs, alterando a cor e afetando a LSPR da solução coloidal (DEWANGAN *et al.*, 2019; SIGG; LINDAUER, 2015).

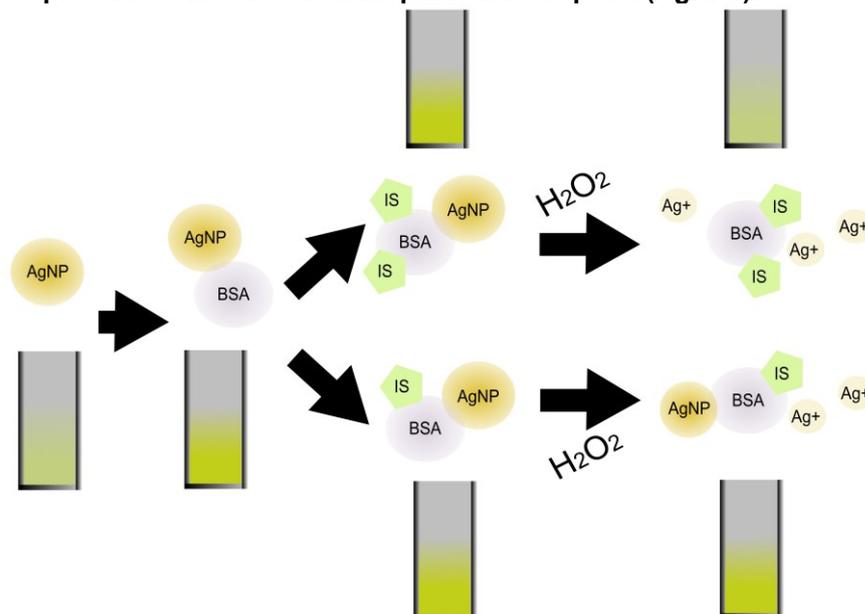
Portanto, tomando os seguintes pontos:

- A alteração no espectro de absorção das soluções de AgNPs quando submetidas à BSA foi verificado;
- Uma concentração muito baixa (0.4%) de BSA, quando inserida na amostra de Cit-AgNPs e submetida à espectroscopia Raman, apresentou picos relacionados à BSA;
- Quando submetidas a  $H_2O_2$ , amostras de Cit-AgNPs com e sem BSA sofreram reduções próximas da intensidade do pico no espectro de absorção;
- Amostras de Cit-AgNPs+IS e Cit-AgNPs+BSA+IS sofreram reduções distintas da intensidade do pico no espectro de absorção quando submetidas a mesma concentração de  $H_2O_2$ ;
- Amostras de Cit-AgNPs+BSA e Cit-AgNPs+BSA+IS sofreram reduções distintas da intensidade do pico no espectro de absorção quando submetidas a mesma concentração de a  $H_2O_2$ .

Assim, o seguinte mecanismo é sugerido para a detecção de PBUTs:

- As razões de ODs mais altas para maiores concentrações de IS e PCS indicam uma estabilização elétrica crescente de BSA causada por IS e PCS, enfraquecendo a ligação de BSA e Cit-AgNPs, levando a uma maior oxidação de AgNPs devido ao  $H_2O_2$ . O mecanismo proposto pode ser visualizado na Figura 25.

**Figura 25 Representação esquemática do sensoriamento de toxinas urêmicas ligadas a proteína com o uso de nanopartículas de prata (AgNPs).**



Fonte: Adaptado de SCHIEFER *et al.*, 2021.

A fim de avaliar as características metrológicas do sensor para pelo menos duas PBUTs, o procedimento usado para IS foi repetido para PCS. Os resultados estão demonstrados na Figura 24c e resumidos na Tabela 6, juntamente com características de outros sensores encontrados na literatura. As equações utilizadas para este fim foram obtidas de (POSSETTI *et al.*, 2012).

**Tabela 6 - Sensibilidades ( $s$ ) de sensores para PBUTs obtidas da literatura. Nota:  $^a s$  em  $(\text{mg/L})^{-1}$  de ajustes na Fig. 24c,  $^b s$  em  $(\text{mL/min})(\text{mg/L})^{-1}$  de (LIN, C. *et al.*, 2011),  $^c s$  em  $(\text{mg/dL})(\text{mg/L})^{-1}$  estimado para concentração total de IS e PCS em (DI IORIO *et al.*, 2019) e  $^d s$  em  $(\text{mg/L})^{-1}$ .**

PBUT		IS	IS	PCS	PCS
	Intervalo de concentração (mg/L)	0-15	15-100	0-15	15-100
Cit-AgNPs+BSA	$^a s$	0,008±0,001	0,0018±0,0002	0,008±0,002	0,0025±0,0002
	$\mathcal{R}$	0,97	0,99	0,93	0,99
	$R^2$	0,93	0,97	0,82	0,97
TFGe	$^b s$	1,7±0,6	1,7±0,6	3,5±0,9	3,5±0,9
	$\mathcal{R}$	-0,708	-0,708	-0,511	-0,511
	$R^2$	-	-	-	-
Azotemia	$^c s$	17,857	17,857	7,815	7,815
	$\mathcal{R}$	-0,44	-0,44	-0,46	-0,46
	$R^2$	-	-	-	-
Fluorescência	$^d s$	0,807	-	-	-
	$\mathcal{R}$	0,9	-	-	-
	$R^2$	0,81	-	-	-

Fonte: Adaptado de SCHIEFER *et al.*, 2021.

Os altos coeficientes de correlação de Pearson ( $\mathcal{R} > 0,90$ ) indicam uma forte relação entre a razão OD e a concentração de IS e PCS. Os coeficientes  $R^2$  também indicam que altas concentrações de IS e PCS podem ser inferidas por este sensor.

Uma comparação com sensores descritos, considerando  $\mathcal{R}$  e  $R^2$ , a Tabela 6 demonstra a robustez do sensor. Mesmo que seja possível observar que as sensibilidades dos outros trabalhos são de ordens de grandeza maiores, o intuito deste sensor é de poder distinguir entre as concentrações normais e urêmicas destas toxinas com um processo simples, reproduzível e de baixo custo.

De acordo com a Tabela 6, a incerteza expandida inerente à determinação da concentração de toxina foi 3,88 mg/L para IS (0-15 mg/L), 17,23 mg/L para IS (15-100 mg/L), 4,08 mg/L para PCS (0-15 mg/L) e 12,55 mg/L para PCS (15-100 mg/L) para um nível de confiança de 95%. A Tabela 7 indica as principais contribuições da linearidade e reprodutibilidade para a incerteza expandida. Os erros associados à reprodutibilidade e à linearidade podem estar relacionados aos desvios encontrados

nas características das soluções coloidais para o mesmo tempo de exposição de PLAL próximos, como pode ser observado na Figura 16a-b e na Figura 16d.

**Tabela 7 - Características metrológicas do sensor. Resolução e Linearidade são representadas por Res. e Lin., respectivamente. A repetibilidade (Rep.) e a reprodutibilidade (Repro.) tiveram 4 graus de liberdade. U95% é a incerteza expandida para um nível de confiança de 95%.**

PBUT	Faixa de concentração (mg/L)	Incertezas (mg/L)				U <sup>95%</sup>
		Tipo A		Tipo B		
		Rep.	Repro.	Res.	Lin.	
IS	0-15	0,82	1,35	0,13	2,86	3,88
IS	15-100	2,03	5,94	0,56	13,91	17,23
PCS	0-15	0,86	1,42	0,13	3,00	4,08
PCS	15-100	1,47	4,33	0,41	10,12	12,55

Fonte: Adaptado de SCHIEFER *et al.*, 2021.

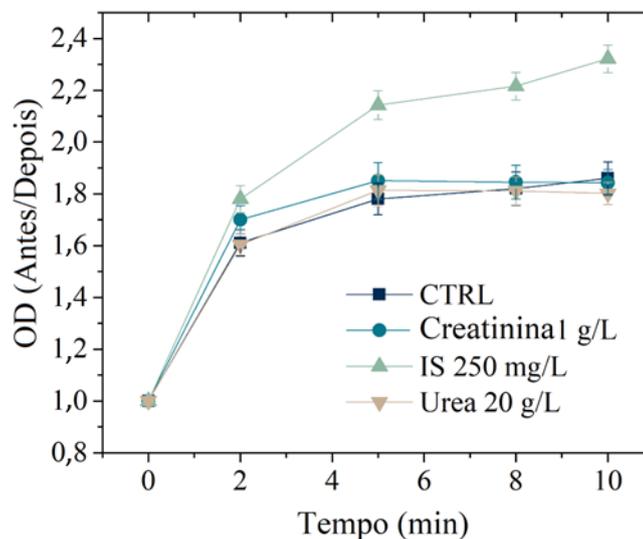
Para a plataforma de detecção baseada na sensibilidade dependente do tamanho de Cit-AgNPs + BSA, LoDs de 5,7 mg/L para IS e 3,2 mg/L para PCS foram obtidos para um nível de confiança de 95%, os valores de referência normais e urêmicos estão presentes na tabela 3. Esses valores de LoD são comparáveis aos obtidos por (JUANG *et al.*, 2019), em que foram usados nano folhas de grafeno, muito mais complexas e caras para se produzir quando comparadas com as NPs, além de ser uma ordem de magnitude maior do que aqueles obtidos com kits de ensaio (FUSHIMI *et al.*, 2019) não utilizados para estes fins. Como o limite de quantificação (LoQ) é 19 mg/L para IS e 10,7 mg/L para PCS, uma medição quantitativa só pode ser realizada acima desses limites. Como a resposta do sensor não pode ser baseada em poucos interferentes, visto que o soro humano é um meio complexo, novos testes *ex vivo* devem esclarecer a melhor resposta deste sensor às PBUTs. No entanto, essas substâncias podem ser isoladas do soro humano por meio de técnicas químicas bem conhecidas, que não exigem que esse sensor seja altamente seletivo para quantificar essas toxinas.

Com base nos dados de trabalhos anteriores relatados na Tabela 6, é possível verificar que os valores de R<sup>2</sup> (Tabela 5) e LoDs (5,7 mg/L para IS e 3,2 mg/L para PCS) obtidos com o Cit-AgNPs + BSA, são semelhantes aos relatados na referência (JUANG *et al.*, 2019), que quantificam moléculas usando nano folhas de grafeno. Portanto, este sensor possui características metrológicas comparáveis às apresentadas na literatura, mas pode quantificar PBUTs com a necessidade de uma fração do volume da amostra exigida pelo padrão ouro (HPLC / UPLC) sem materiais

complexos ou caros como nano folhas de grafeno (JUANG *et al.*, 2019) ou colesterol oxidase (DEWANGAN *et al.*, 2019).

A resposta do sensor foi avaliada para concentrações de um PBUT e 2 NPBUTs com concentrações superiores às encontradas no soro urêmico, como pode ser visto na Figura 26. Os valores para as PBUTs podem ser encontrados na Tabela 3, a concentração urêmica de creatinina é de 136mg/L e de ureia 1.57g/L (EUTOX, 2023).

**Figura 26 - Concentrações de metabólitos e seu efeito no sensor de acordo com o tempo de exposição ao peróxido de hidrogênio. Creatinina, ureia e IS foram adicionados separadamente nas amostras analisadas.**



Fonte: Adaptado de SCHIEFER<sup>b</sup> *et al.*, 2022.

Como pode ser afirmado na Figura 26, toxinas urêmicas, como creatinina e ureia, não afetaram o sensor após 2 minutos, enquanto a razão IS OD continuou aumentando até 10 minutos após a inserção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

As razões entre CTRL e IS, CTRL e creatinina e CTRL e ureia são apresentadas na Tabela 8.

Tempo (min)	Razão OD composta para CTRL (%)		
	IS	Creatinina	Ureia
2	10,48±0,45	5,51±0,25	-0,47±-0,02
5	20,35±0,87	3,95±0,2	1,87±0,09
8	21,7±0,93	1,36±0,07	-0,53±-0,02
10	24,79±1,01	-0,95±-0,04	-3,18±-0,13

Fonte: Adaptado de SCHIEFER<sup>b</sup> *et al.*, 2022.

A partir da Figura 26 e da Tabela 8, é possível verificar que, entre os períodos de tempo escolhidos, a maior razão OD de IS e CTRL é obtida em 10 min. Também é

possível determinar que, aos 10 min, a razão entre ODs é  $(26 \pm 4)$  % maior na comparação de IS com creatinina e  $(29 \pm 4)$  % maior na comparação de IS com ureia.

Um teste ANOVA com Dunnett como *post-hoc* não mostrou diferença estatística entre CTRL e creatinina, assim como entre CTRL e ureia em todos os períodos investigados. No entanto, ao considerar IS, mesmo após 2 min de exposição a  $H_2O_2$ , é possível verificar um  $P < 0,05$  quando comparado ao CTRL.

A resposta para cada composto de acordo com o intervalo de tempo entre 2 e 10 min quando um ajuste linear é realizado é apresentada na Tabela 9.

**Tabela 9 - Resposta linear da relação de ODs entre 2 e 10 min.**

Ajuste Linear	Razão OD do composto			
	CTRL	IS	Creatinina	Ureia
Interceptação (razão OD)	$1,57 \pm 0,05$	$1,71 \pm 0,10$	$1,69 \pm 0,06$	$1,59 \pm 0,07$
Inclinação (razão OD/min)	$0,031 \pm 0,007$	$0,06 \pm 0,01$	$0,017 \pm 0,008$	$0,02 \pm 0,01$
$\mathcal{R}$	0,95	0,95	0,84	0,86
$R^2$	0,91	0,91	0,70	0,74

Fonte: Adaptado de SCHIEFER<sup>b</sup> *et al.*, 2022.

Da Tabela 9 é possível observar que, embora a creatinina tenha apresentado um valor de interceptação próximo ao relacionado ao IS, tanto a creatinina quanto a ureia apresentaram uma inclinação menor que o CTRL, enquanto o IS apresentou uma inclinação 2 vezes maior do que a inclinação do CTRL.

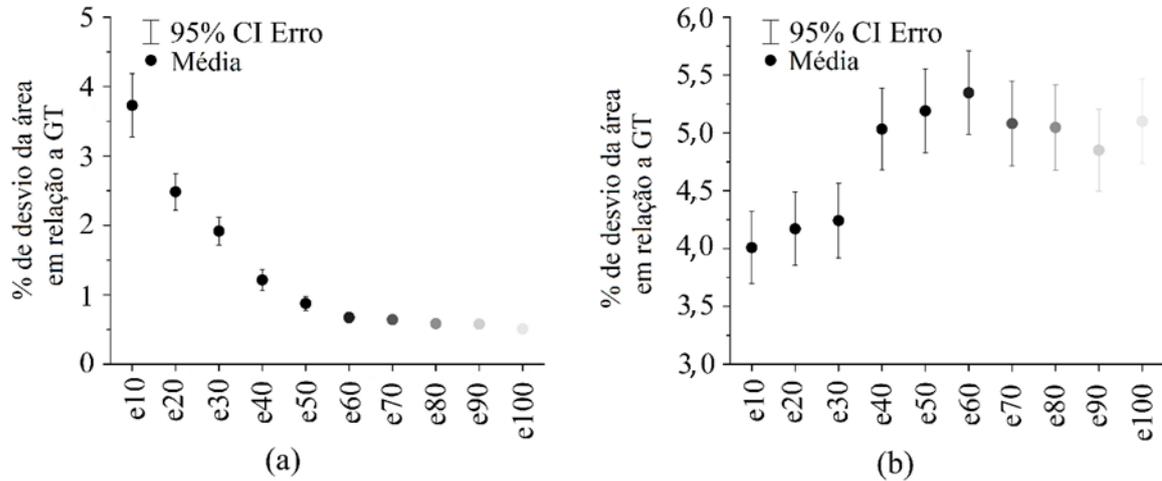
A Tabela 9 também indica que tanto o  $\mathcal{R}$  quanto o  $R^2$  apresentam valores maiores para CTRL e IS quando comparados a creatinina e ureia. Um  $\mathcal{R}$  mais alto representa uma correlação mais alta entre tempo e a razão OD, enquanto um valor de  $R^2$  mais alto indica que o ajuste linear descreve bem os dados observados.

Mesmo obtendo estes resultados satisfatórios, sabe-se que o sangue humano é um meio complexo que não apresenta apenas toxinas urêmicas. Assim, essas investigações devem avançar antes de determinar a resposta real deste sensor para uma gama maior de compostos, para posterior aplicação deste sensor para análise *ex vivo*.

#### 4.4 APLICAÇÃO DO MODELO PIX2PIX NO ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

O tempo total de treinamento foi de 1 h 26 min, dos quais 10 modelos resultantes (e10-e100) foram usados para avaliar a área ocupada pelas células nos conjuntos de dados de treinamento e teste contendo 280 e 120 imagens, respectivamente (veja a Figura 27).

**Figura 27 - Desvio médio das saídas GT de todo o conjunto de dados para as imagens do (a) conjunto de dados de treinamento e (b) conjunto de dados de teste processado pelos modelos. Nota: CI Erro significa intervalo de erro médio de confiança.**

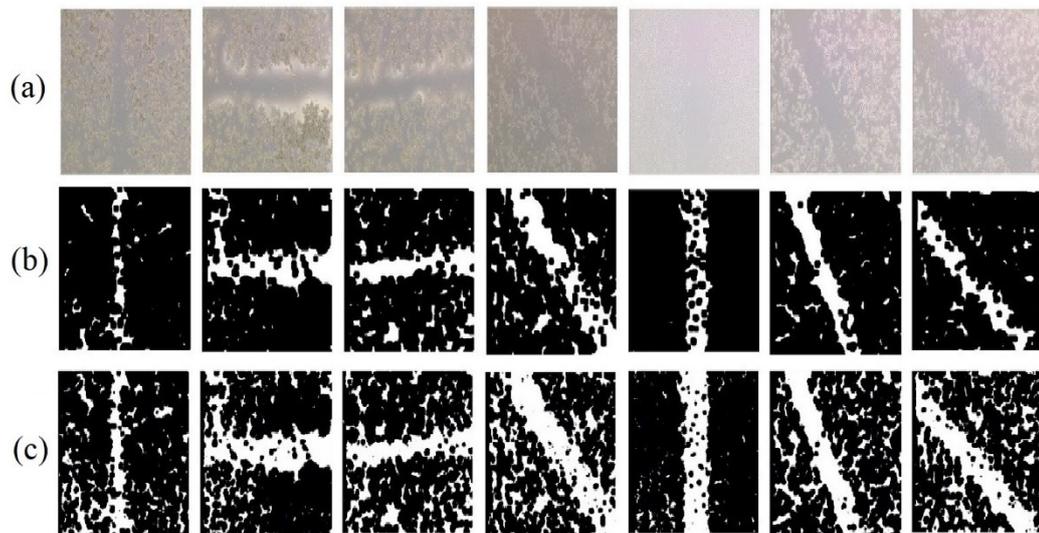


Fonte: Adaptado de SCHIEFER *et al.*, 2022.

A partir da Figura 27a é possível verificar que e60-e100 apresentou a porcentagem média de desvio da área em relação a GT semelhante entre os modelos gerados pelo modelo pix2pix, mas e90 apresentou o menor valor, que será, portanto, usado para testes adicionais.

Avaliando a área ocupada pelas células obtidas por GT e por e90 em cada saída de imagem individualmente, é possível observar que suas diferenças podem chegar a até 18% para casos específicos. A Figura 28 mostra aquelas imagens para as quais a diferença na área ocupada pelas células resultante do processamento da imagem pelo e90 foi superior a 10% quando comparado com o GT.

**Figura 28 - Imagens processadas pelo e90 que apresentaram diferenças médias superiores a 10% quando comparadas com saídas do GT. (a) Imagens de entrada brutas, (b) Saídas do GT e (c) Saídas do modelo e90.**

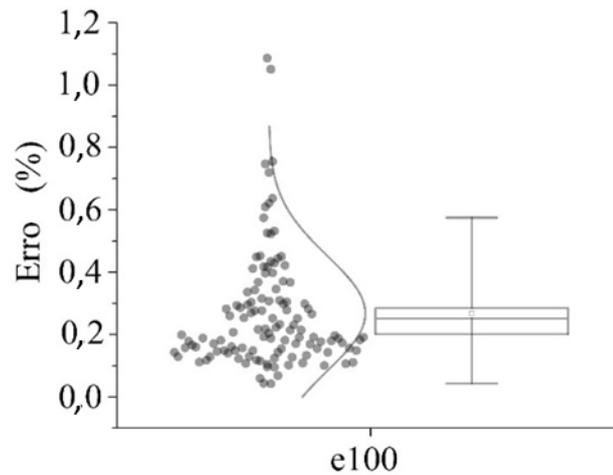


Fonte: Adaptado de SCHIEFER *et al.*, 2022.

Embora tenham sido observadas diferenças de mais de 10% da área ocupada entre as saídas apresentadas na Figura 28b e na Figura 28c, os padrões apresentados são semelhantes e as saídas do e90 tendem a ser mais sensíveis para áreas vazias do que as saídas GT. Isso pode indicar mais uma vez os efeitos do viés no processamento manual da imagem, que é drasticamente reduzido no método pix2pix.

Girando e invertendo as imagens do conjunto de dados de teste, gerando 8 entradas de cada imagem original que deveriam resultar na mesma área ocupada, o modelo e90 resultou em um erro médio de cerca de 0,3% (veja a Figura 29).

**Figura 29 - Erro médio das 120 áreas ocupadas resultantes do processamento de e90 para o conjunto de dados de teste invertido e girado. Nota: A curva ajustada aos pontos de dados é uma curva normal.**



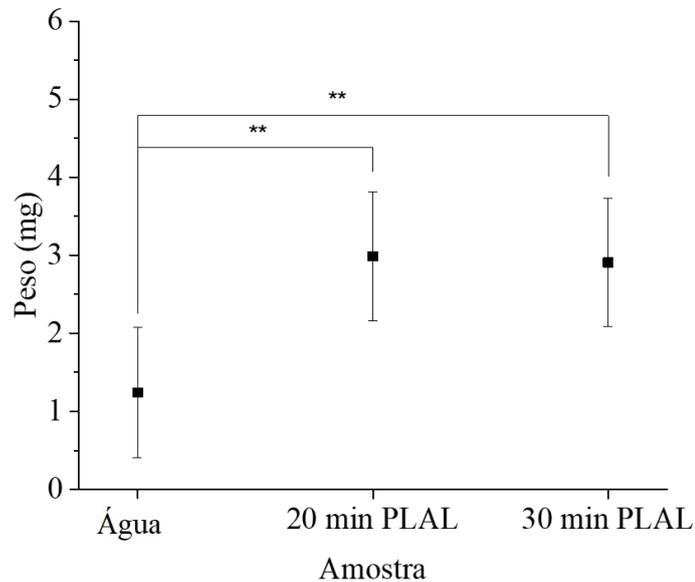
Fonte: Adaptado de SCHIEFER *et al.*, 2022.

Assim, o modelo e90 apresentou erros dentro de  $(5,1 \pm 0,3)$  % da área ocupada quando comparado com o GT e a orientação da imagem não causou grande desvio (erro de  $(0,27 \pm 0,02)$  %). Esses erros apresentam um desvio percentual menor do que os demonstrados pela Figura 11, onde uma única modificação de variável originada de viés pode levar a erros de até 15%, sugerindo que a análise manual, mesmo usando um algoritmo, é tendenciosa. O processamento da imagem por esses modelos levou em média 0,14s. No entanto, uma limitação desse modelo é que ele ainda é desenvolvido com base em um processo tendencioso, o que pode levar a erros de identificação no processamento da rede.

Após a realização do ensaio de wound healing, fizemos uso do modelo gerado, podendo avaliar a migração celular das células submetidas aos tratamentos com diversas concentrações de NPs, tendo como controle a migração induzida pelo citrato em 0, 24, 48 e 72h.

A concentração de AgNPs foi aferida conforme presente no item 3.4.3 e gerou o resultado presente na Figura 30.

**Figura 30 - Média e desvio padrão da média da diferença de peso do Eppendorf vazio e com a presença do pellet de AgNPs para AgNPs produzidas com 20 e 30 min de PLAL. Nota: \* Representa  $P < 0.05$  e \*\*  $P < 0.01$ .**

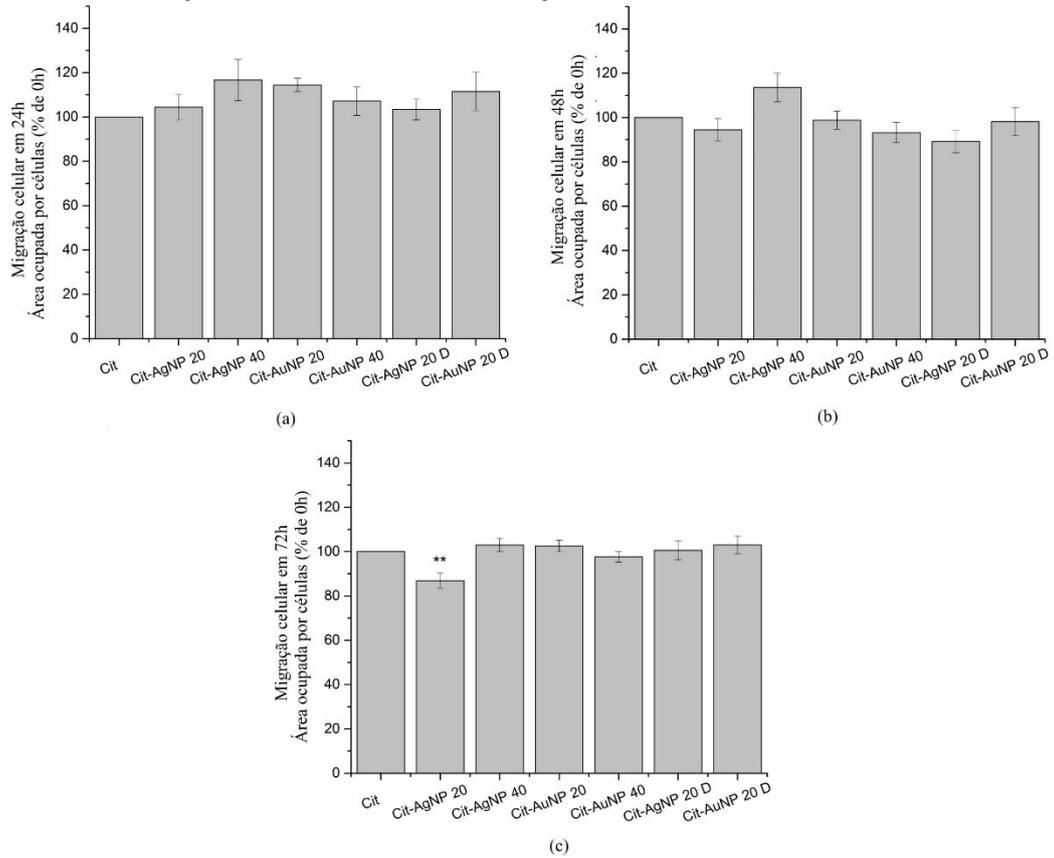


**Fonte: Adaptado de SCHIEFER<sup>b</sup> et al., 2022.**

Como é possível observar na Figura 30, não há alteração significativa na concentração de AgNPs entre aquelas produzidas com 20 e 30 min de PLAL. Contudo, é possível verificar uma concentração de  $(2.2 \pm 0.4)$  mg para 20 min de PLAL e  $(2.1 \pm 0.4)$  mg para 30 min de PLAL. Desta maneira, a concentração média de AgNPs é de  $(370 \pm 70)$   $\mu\text{g/mL}$  para 20 min de PLAL e  $(350 \pm 70)$   $\mu\text{g/mL}$  para 30 min de PLAL. Contudo, estes dados não foram obtidos para AuNPs.

Fazendo uso destes resultados e observando a Figura 31 tanto as AgNPs quanto as AuNPs não induziram ou inibiram a migração em 24 ou em 48h. Contudo, Cit-AgNPs produzidas com 20 min de PLAL (que representa uma concentração de  $(370 \pm 70)$   $\mu\text{g/mL}$ ) inibiram a migração em 72h de exposição, corroborando com experimentos já publicados (VIEIRA et al., 2017; MA et al., 2014; HU; CHENG; LIANG, 2022).

**Figura 31 - Média e desvio padrão da média da migração celular analisada pelo modelo pix2pix para 24, 48 e 72h. Nota: \* Representa  $P < 0.05$  e \*\*  $P < 0.01$ .**



Fonte: O autor.

## 5 CONCLUSÃO

Este trabalho desenvolveu um sensor colorimétrico baseado em NPs metálicas para quantificar IS e PCS, reduzindo custos e complexidade de análise, assim como aplicou o modelo pix2pix no ensaio de migração celular, o tornando eficiente e fidedigno, refletindo diretamente na qualidade dos resultados.

Um equipamento de síntese mediada por plasmon de baixa intensidade capaz de sintetizar amostras múltiplas simultaneamente foi construído com sucesso e demonstrou reprodutibilidade. Nano prismas de tamanho único foram formados e, se a incidência de luz continuar, os nano prismas tendem a se agregar em nano hexágonos de maneira rápida. À medida que a quantidade de nano prismas e nano hexágonos aumenta, suas razões R-para-G e R-para-B da solução aumentam (de acordo com o sistema de cores RGB). As razões R-para-G e R-para-B aumentam mais rapidamente quando a solução original tem uma densidade óptica mais alta, que está estritamente correlacionada com a diminuição do tamanho médio das nanopartículas quase esféricas.

As características do aqui desenvolvido sensor de UTs permitem a distinção entre concentrações urêmicas destas toxinas por um simples ensaio colorimétrico que requer um mínimo volume de amostra. Este sensor fornece um método que não depende do uso de equipamentos caros exigidos por outras técnicas para a quantificação dessas moléculas, como as usadas para HPLC e UPLC. Sugerimos que as razões OD mais altas para concentrações de IS e PCS indiquem uma aumentada estabilidade elétrica da BSA por IS e PCS, enfraquecendo a ligação BSA para com as Cit-AgNPs e levando a uma maior oxidação de AgNPs por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Embora existam muitos interferentes presentes no soro humano, os resultados obtidos das NPBUTs no sensor são um forte indicativo de que este sensor pode ser uma alternativa para a distinção entre amostras de soro normal e urêmico.

Também foi observada uma relação entre a temperatura da solução coloidal e o tamanho médio das nanopartículas que foram utilizadas no sensoriamento, durante o processo de produção destas NPs, e investigações adicionais devem ser conduzidas para entender melhor a relação entre o tamanho médio mínimo das Cit-AgNPs e Cit-AuNPs e a taxa de crescimento da temperatura da solução durante o PLAL.

O comportamento observado pode estar relacionado a efeitos como a oxidação de nanopartículas (ZHANG; HU; DENG, 2016), ou a processos de agregação e fragmentação e ser um meio efetivo para determinar o tamanho médio das nanopartículas durante a produção por PLAL.

O modelo pix2pix, foi utilizado para a avaliação da migração celular, e quantificou a área total ocupada pelas células por meio da rede neural, o que difere de trabalhos publicados anteriormente (GEBÄCK *et al.*, 2009, NUNES; DIAS, 2017), assim abolindo a interação humana, potencialmente reduzindo o viés, reduzindo a força de trabalho e melhorando os resultados do ensaio. Além disso, todo o conjunto de épocas pode ser obtido em menos de 2 horas com o hardware apropriado e as imagens podem ser processadas em menos de 1 segundo. Embora as imagens não tenham sido adquiridas com valores iguais de pixels nas direções x e y, a rotação dessas imagens não apresentou alterações significativas nos resultados finais. Assim, redimensionar essas imagens não afeta significativamente as saídas.

## 6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Em trabalhos futuros, as NPBUTs serão colocadas juntas com as PBUTs para avaliar a interferência direta na resposta do sensor, assim como uma gama maior de toxinas e metabólitos urêmicos será investigada a fim de verificar os limites deste sensor.

A aplicação da regularização ao cGAN, como é o caso do *Early Stopping* baseado em validação ou validação cruzada poderá ser realizada em trabalhos futuros, a fim de aprimorar os resultados do modelo.

## 7 PUBLICAÇÕES

### 7.1 ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS E ANAIS DE CONGRESSOS

SCHIEFER, E. M. *et al.* A method based on pix2pix to attenuate bias in the analysis of wound healing assays. **Research Society and Development**, v. 11, n. 12, p. e125111234271, 2022.

SCHIEFER, E. M. *et al.* Protein-Bound Uremic Toxins Quantification by a Colorimetric Sensor Based on the Oxidation of Silver Nanoparticles. **IEEE Sensors Journal**, v. 21, n. 20, p. 22651-22660, 2021.

SCHIEFER<sup>b</sup>, E. M. *et al.* Study of Interferents of a Plasmonic Sensor for Uremic Toxins. *In: SBFOTON IOPC 2022, Brasil. IEEE*, p. 1-5, 2022.

### 7.2 ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS E ANAIS DE CONGRESSOS - PARCERIAS

ATHERINO, M. C. *et al.* Cytotoxicity and Uptake of *Lafoensia pacari* Extract in Mammary Carcinoma Cells. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, p.43-53, 2020.

COSTA, L. C. S. *et al.* Detection of Glyphosate in Water with Photonic-Tailored Silver Nanoparticles. *In: SBFOTON IOPC 2022, Brasil. IEEE*, p. 1-5, 2022.

FAVRETTO, G. *et al.* Uremic endothelial-derived extracellular vesicles: Mechanisms of formation and their role in cell adhesion, cell migration, inflammation, and oxidative stress. **Toxicology Letters**, v. 347, p. 12-22, 2021.

GREGORIO, P. C. Growth differentiation factor-15 (GDF-15) and syndecan-1 are potential biomarkers of cardiac and renal involvement in classical Fabry disease under enzyme replacement therapy. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 4, n. 47, 2022.

NOWACKI, L. C. *et al.* *Ilex paraguariensis* extract as an alternative to pain medications. **Acta Pharmaceutica**, v. 71, n. 3, p. 383-398, 2020.

SANTOS, A. F. *et al.* Chemical, biological, and pharmacological evaluation of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis*, *St. Hill. (Aquifoliaceae)*. **Research Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e3011225335, 2022.

SANTOS, A. F. *et al.* Comparative metabolomic study of high-flux hemodialysis and high volume online hemodiafiltration in the removal of uremic toxins using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 208, 2022.

SANTOS, A. F. *et al.* MO653: High-Flux Haemodialysis and Haemodiafiltration: A Comparative Study Based on 1-H NMR Serum Metabolic Profile. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 37, n. Supplement\_3, 2022.

SANTOS, A. F. *et al.* P1057 Untargeted 1h NMR-Based Serum Metabolic Profile Analysis of Patients Treated with High Volume Hemodiafiltration (HDF). **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 35, n. Supplement\_3, 2020.

SANTOS, A. F. *et al.* Schiefer counter: An alternative method for clonogenic assay evaluation. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 106, 2020.

SANTOS, A. F. *et al.* The toxicity of *Aspidosperma subincanum* to MCF7 cells is related to modulation of oxidative status and proinflammatory pathways. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 281, 2021.

## REFERÊNCIAS

- ABBASI, E. *et al.* Silver nanoparticles: Synthesis methods, bio-applications and properties. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 1–8, 2014.
- ABDELMOTAAL, H. *et al.* Pix2pix Conditional Generative Adversarial Networks for Scheimpflug Camera Color-Coded Corneal Tomography Image Generation. **Translational Vision Science & Technology**, v. 7, n. 10, p. 1-18, 2021.
- ADJEI, I. M.; SHARMA, B.; LABHASETWAR, V. Nanoparticles: Cellular uptake and cytotoxicity. *In: Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 814, p. 73-91, 2014.
- AI, N. *et al.* Ponatinib exerts anti-angiogenic effects in the zebrafish and human umbilical vein endothelial cells via blocking VEGFR signaling pathway. **Oncotarget**, v. 9, n. 62, p. 31958–31970, 2018.
- ALAVI, M.; KARIMI, N. Characterization, antibacterial, total antioxidant, scavenging, reducing power and ion chelating activities of green synthesized silver, copper and titanium dioxide nanoparticles using artemisia haussknechtii leaf extract. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 48, n. 8, p. 1–16, 2017.
- ALT, V. *et al.* An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. **Biomaterials**, v. 25, n. 18, p. 4383–4391, 2004.
- AMABILE, N. *et al.* Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. 5, p. 1873–1880, 2011.
- AMENDOLA, V. **Synthesis of gold and silver nanoparticles for photonic applications**. 2008, 242f. Tese: (Doutorado em Ciência dos Materiais) University of Padua, Padua, Itália, 2008.
- AMENDOLA, V.; MENEGHETTI, M. Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, n. 20, p. 3805, 2009.
- AMINI, S. M. Preparation of antimicrobial metallic nanoparticles with bioactive compounds. **Materials Science and Engineering: C**, v. 103, p. 109809, 2019.
- AUERBACH, R.; AUERBACH, W.; POLAKOWSKI, I. Assays for angiogenesis: A review. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 51, n. 1, p. 1–11, 1991.
- BARANSKA, P. *et al.* Expression of Integrins and Adhesive Properties of Human Endothelial Cell Line EA.hy 926. **Cancer Genomics & Proteomics**, v. 2, n. 5, p. 265–269, 2005.

BARRETO, F. C. *et al.* The quest for a better understanding of chronic kidney disease complications: an update on uremic toxins. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 36, n. 2, p. 221–235, 2014.

BASTYS, V. *et al.* Formation of silver nanoprisms with surface plasmons at communication wavelengths. **Advanced Functional Materials**, v. 16, n. 6, p. 766–773, 2006.

BILLAUD, P. *et al.* Optical extinction spectroscopy of single silver nanoparticles. **The European Physical Journal D**, v. 43, n. 1-3, p. 271–274, 2007.

BIPM *et al.* (org.). **JCGM 100:2008**: Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement. França: JCGM, 2008. E-book. Disponível em:  
[https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM\\_100\\_2008\\_E.pdf/cb0ef43f-baa5-11cf-3f85-4dcd86f77bd6?version=1.10&t=1659082531978&download=true](https://www.bipm.org/documents/20126/2071204/JCGM_100_2008_E.pdf/cb0ef43f-baa5-11cf-3f85-4dcd86f77bd6?version=1.10&t=1659082531978&download=true).  
Acesso em: 11 ago. 2023.

BORCHERT, H. *et al.* Determination of nanocrystal sizes: a comparison of TEM, SAXS, and XRD studies of highly monodisperse CoPt<sub>3</sub> particles. **Langmuir**, v. 21, n. 5, p. 1931–1936, 2005.

BURDA, C. *et al.* Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes. **ChemInform**, v. 36, n. 27, p. 1025-1102, 2005.

CANNY, John. A computational approach to edge detection. **IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence**, n. 6, p. 679–698, 1986.

CARRACEDO, J. *et al.* Cell apoptosis and hemodialysis-induced inflammation. **Kidney International**, v. 61, p. S89–S93, 2002.

CENTRO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA. **CME UFPR**. Site, disponível em:  
<https://cme.ufpr.br/equipamentos/>

CHEN, C. J.; OSGOOD, R. M. Direct observation of the local-field-enhanced surface photochemical reactions. **Physical Review Letters**, v. 50, n. 21, p. 1705–1708, 1983.

CHEN, H. *et al.* Multifunctions of excited gold nanoparticles decorated artificial kidney with efficient hemodialysis and therapeutic potential. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 30, p. 19691–19700, 2016.

CHEN, H.; LIU, Y. Creating functional water by treating excited gold nanoparticles for the applications of green chemistry, energy and medicine: A review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 60, p. 9–18, 2018.

CLARK, W. R. *et al.* Uremic toxins and their relation to dialysis efficacy. **Blood Purification**, v. 48, n. 4, p. 299–314, 2019.

CLARO, L. *et al.* The impact of uremic toxicity induced inflammatory response on the cardiovascular burden in chronic kidney disease. **Toxins**, v. 10, n. 10, p. 384, 2018.

CUNHA, R. S. D. *et al.* How do Uremic Toxins Affect the Endothelium? **Toxins**, v. 6, n. 12, p. 1-24, 2020.

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

DELL'AGLIO, M. *et al.* Mechanisms and processes of pulsed laser ablation in liquids during nanoparticle production. **Applied Surface Science**, v. 348, p. 4–9, 2015.

DESIMONI, E; BRUNETTI, B. About estimating the limit of detection by the signal to noise approach. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 06, n. 04, 2015.

DEVINE, E. *et al.* Binding Affinity and Capacity for the Uremic Toxin Indoxyl Sulfate. **Toxins**, v. 6, n. 2, p. 416-429, 2014.

DEWANGAN, L. *et al.* A colorimetric nanoprobe based on enzyme-immobilized silver nanoparticles for the efficient detection of cholesterol. **RSC Advances**, v. 72, n. 9, p. 42085-42092, 2019.

DE IESO, M. L.; PEI, J. V. An accurate and cost-effective alternative method for measuring cell migration with the circular wound closure assay. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 5, 2018.

DI IORIO, B. R. *et al.* Nutritional Therapy Modulates Intestinal Microbiota and Reduces Serum Levels of Total and Free Indoxyl Sulfate and P-Cresyl Sulfate in Chronic Kidney Disease (Medika Study). **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 8, p. 1424, 2019.

DU, H. *et al.* Gold nanoparticle-based colorimetric recognition of creatinine with good selectivity and sensitivity. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 55, n. 48, p. 12334–12340, 2016.

ELLINGER, A.; PRUTZ, W. Der einfluß von mechanischen hindernissen im dünndarm und di arm auf die indicanausscheidung beim hunde. **Hoppe-Seyler's eitschrift für physiologische Chemie**, v. 38, n. 5-6, p. 399–427, 1903.

EUA. United States Department of Health & Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. **Chronic Kidney Disease in the United States, 2021**. EUA: United States Department of Health & Human Services, 12 jul. 2022. Disponível em: [https://www.cdc.gov/kidneydisease/publications-resources/CKD-national-facts.html?CDC\\_AA\\_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fkidneydisease%2Fpublications-resources%2F2019-national-facts.html](https://www.cdc.gov/kidneydisease/publications-resources/CKD-national-facts.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fkidneydisease%2Fpublications-resources%2F2019-national-facts.html). Acesso em: 9 ago. 2023.

EUA. United States Patent Office. **Purification of m- and p-cresol by azeotropic distillation with a hydrocarbon entrainer US3337424A**. EUA: United States Patent

Office, 22 ago. 1984. Disponível em:

<https://patents.google.com/patent/US3337424A/en>. Acesso em: 9 ago. 2023.

EUTOX. ESAO. **Uremic Solutes Database**. Europe: ESAO, 9 ago. 2023. Disponível em: <https://database.uremic-toxins.org/soluteList.php>. Acesso em: 9 ago. 2023.

FAVRETTO, G. *et al.* Role of organic anion transporters in the uptake of protein-bound uremic toxins by human endothelial cells and monocyte chemoattractant protein-1 expression. **Journal of Vascular Research**, v. 54, n. 3, p. 170–179, 2017.

FAZIO, B. *et al.* SERS detection of biomolecules at physiological pH via aggregation of gold nanorods mediated by optical forces and plasmonic heating. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 161–171, 2005.

FUSHIMI, Y. *et al.* Performance evaluation of an Indoxyl Sulfate Assay Kit "NIPRO". **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 57, n. 11, p. 1770-1776, 2019.

GABRIELSEN, M. *et al.* Cucurbitacin covalent bonding to cysteine thiols: the filamentous-actin severing protein cofilin1 as an exemplary target. **Cell Communication and Signaling**, v. 11, n. 1, p. 58, 2013.

GEBÄCK, T. *et al.* TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. **BioTechniques**, v. 46, n. 4, p. 265–274, 2009.

GLORIEUX, C. *et al.* Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 10, p. 1384–1390, 2011.

GONZÁLEZ, A. L. *et al.* Size, Shape, Stability, and Color of Plasmonic Silver Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 17, p. 9128–9136, 2014.

GO, A. S. *et al.* Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. **New England Journal of medicine**. v. 351, n 13, p. 1296, 2004.

GOODFELLOW, I. *et al.* Generative adversarial networks. **Communications of the ACM**, v. 63, n. 11, p. 139-144, 2020.

GOODWIN, A. M. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. **Microvascular Research**, v. 74, n. 2-3, p. 172–183, 2007.

GREENWOOD, N. N.; EARNSHAW, A. 28 - Copper, Silver and Gold. *In: Chemistry of the Elements*. 2. ed. **Elsevier**, Berlin: Elsevier Verlag, 1997.

GRYS, D. *et al.* Citrate coordination and bridging of gold nanoparticles: The role of gold adatoms in AuNP aging. **ACS Nano**, v. 14, n. 7, p. 8689–8696, 2020.

GUO, S.; DIPIETRO, L. A. Factors Affecting Wound Healing. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 3, p. 219-229, 2010.

HE, D.; GARG, S.; WAITE, T. D. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mediated Oxidation of Zero-Valent Silver and Resultant Interactions among Silver Nanoparticles, Silver Ions, and Reactive Oxygen Species. **Langmuir**, v. 28, n. 27, p. 10266-10275, 2012.

HILL, N. R. *et al.* Global prevalence of chronic kidney disease – a systematic review and meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 7, p. e0158765, 2016.

HIMMELFARB, J.; IKIZLER, T. A. Hemodialysis. **New England Journal of medicine**, v. 363, n. 19, p. 1833–1845, 2010.

HU, B.; CHENG, Z.; LIANG, S. Advantages and prospects of stem cells in nanotoxicology. **Chemosphere**, v. pt 2, n. 291, p. 132861, 2022.

HUNG, Y. *et al.* Colorimetric Detection of Heavy Metal Ions Using Label-Free Gold Nanoparticles and Alkanethiols. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 39, p. 16329–16334, 2010.

HUTTER, E.; FENDLER, J. H. Exploitation of localized surface plasmon resonance. **Advanced Materials**, v. 16, n. 19, p. 1685–1706, 2004.

HUYNH, K. A.; CHEN, K. L. Aggregation Kinetics of Citrate and Polyvinylpyrrolidone Coated Silver Nanoparticles in Monovalent and Divalent Electrolyte Solutions. **Environment, Science and Technology**, v. 45, n. 13, p. 5564-5571, 2011.

IQBAL, P. *et al.* Nanotechnology: The “Top-Down” and “Bottom-Up” Approaches. *In*: GALE, P. A.; STEED, J. W. **Supramolecular Chemistry**. Chichester, UK, 2012  
Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470661345.smc195>. Acesso em: 09 ago. 2023.

ISOLA, P. *et al.* Image-to-Image Translation with Conditional Adversarial Networks, **2017 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)**, pp. 5967-5976, 2017.

ITOH, Y. *et al.* Protein-bound uremic toxins in hemodialysis patients measured by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and their effects on endothelial ROS production. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 403, n. 7, p. 1841–1850, 2012.

JIN, R. *et al.* Controlling anisotropic nanoparticle growth through plasmon excitation. **Nature**, v. 425, n. 6957, p. 487–490, 2003.

JOHNSON, P. B.; CHRISTY, R. W. Optical Constants of the Noble Metals. **Physical Review B**, v. 6, n. 12, p. 4370-4379, 1972.

JOHNSTON, S. T. *et al.* Interpreting scratch assays using pair density dynamics and approximate Bayesian computation. **Open Biology**, v. 4, n. 9, 2014.

JOURDE-CHICHE, N. *et al.* Endothelium structure and function in kidney health and disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 15, n. 2, p. 87–108, 2019.

JUANG, R. *et al.* Floating SERS substrates of silver nanoparticles-graphene based nanosheets for rapid detection of biomolecules and clinical uremic toxins. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 576, p. 36–42, 2019.

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, n. 1, p. 51–57, 2009.

KELLY, K. L. *et al.* The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. **Journal of Physical Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 668-677, 2002.

KIM, K. *et al.* Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on candida albicans. **BioMetals**, v. 22, n. 2, p. 235–242, 2008.

KINNEAR, C. *et al.* Form follows function: Nanoparticle shape and its implications for nanomedicine. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 17, p. 11476–11521, 2017.

KNIGHT, E. L. Kidney dysfunction, inflammation, and coronary events: A prospective study. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 15, n. 7, p. 1897–1903, 2004.

KOZHUSHNER, M. A. *et al.* Effect of Temperature and Nanoparticle Size on Sensor Properties of Nanostructured Tin Dioxide Films. **The Journal Of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 21, p. 11440-11444, 2014.

KREIBIG, U.; VOLLMER, M. **Optical Properties of Metal Clusters**. 1. ed. Berlin: Springer Verlag, 1995.

LABORATÓRIO DE LASER. **LabLaser**. Site, disponível em: <https://lablaser.tk/principal.htm>

LABORATÓRIO DE BIOPOLIMEROS. **BIOPOL**. Site, disponível em: <http://www.biopol.ufpr.br/equipamentos/>

LAKSHMI, B. S. *et al.* Changes in the inflammatory and oxidative stress markers during a single hemodialysis session in patients with chronic kidney disease. **Renal Failure**, v. 40, n. 1, p. 534–540, 2018.

LANGILLE, M. R., ZHANG, J., & MIRKIN, C. A. Plasmon-Mediated Synthesis of Heterometallic Nanorods and Icosahedra. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 15, n. 50, p. 3543–3547, 2011.

LANGILLE, M. R.; PERSONICK, M. L.; MIRKIN, C. A. Plasmon-mediated syntheses of metallic nanostructures. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 52, p. 13910–13940, 2013.

LAUFFENBURGER, D.; A; HORWITZ, A. F. Cell migration: A physically integrated molecular process. **Cell**, v. 84, n. 3, p. 359–369, 1996.

LEVEY, A. S; CORESH, J. Chronic kidney disease. **The Lancet**, v. 379, n. 9811, p. 165–180, 2012.

LI, H.; ZHANG, L. Photocatalytic performance of different exposed crystal facets of BiOCl. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 6, p. 48–56, 2017.

LIN, C. *et al.* Measuring serum total and free indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate in chronic kidney disease using UPLC-MS/MS. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 27, n. 2, p. 502–509, 2019.

LIN, Y. T. *et al.* Protein-bound uremic toxins are associated with cognitive function among patients undergoing maintenance hemodialysis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 20388, 2019.

LIN, C. *et al.* p-Cresylsulfate and Indoxyl Sulfate Level at Different Stages of Chronic Kidney Disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 25, n. 3, p. 191-197, 2011.

LIPSHUTZ, B. H.; YAMAMOTO, Y. Introduction: Coinage metals in organic synthesis. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 8, p. 2793–2795, 2008.

LOWIK, C.W.G.M. *et al.* Quantification of adherent and nonadherent cells cultured in 96-well plates using the supravital stain neutral red. **Analytical Biochemistry**, v. 213, n. 2, p. 426–433, 1993.

MA, L. *et al.* Ag nanoparticles decorated MnO<sub>2</sub>/reduced graphene oxide as advanced electrode materials for supercapacitors. **Chemical Engineering Journal**, v. 252, p. 95-103, 2014.

MACIEL, R. *et al.* Uremia impacts VE-cadherin and ZO-1 expression in human endothelial cell-to-cell junctions. **Toxins**, v. 10, n. 10, p. 404, 2018.

MAHOMED, F. A. On the pathology of uraemia and the so-called uraemic convulsions. **BMJ**, v. 2, n. 862, p. 10–12, 1877.

MAIER, S. A. *et al.* Terahertz surface plasmon-polariton propagation and focusing on periodically corrugated metal wires. **Phys. Rev. Lett.**, v. 97, p. 176805, 2006.

MAKYLA, K.; PALUCH, M. The linoleic acid influence on molecular interactions in the model of biological membrane. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 71, n. 1, p. 59-66, 2009.

MASIELLO, M. G. *et al.* Phenotypic switch induced by simulated microgravity on MDA-MB-231 breast cancer cells. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–12, 2014.

MERIN, U.; CHERYAN, M. Ultrastructure of the surface of a polysulfone ultrafiltration membrane. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 25, n. 9, p. 2139–2142, 1980.

MIDELET, J. *et al.* The Sedimentation of Colloidal Nanoparticles in Solution and Its Study Using Quantitative Digital Photography. **Particle and Particle Systems Characterization**, v. 34, n. 10, 2017.

MIE, G. Beitrage zur Optik truber Medien, speziell kolloidaler Metallosurngem. **Annalen der Physik**, v. 25, n. 3, p. 377-445, 1908.

MIRZA, M.; OSINDERO, S. Conditional Generative Adversarial Nets. **ArXiv**, 2014.

MONSUUR, H. N. *et al.* Methods to study differences in cell mobility during skin wound healing in vitro. **Journal of Biomechanics**, v. 8, n. 49, p. 1381-1387, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

NAYFEH, M. Chapter 8 – Nanometal. *In: Fundamentals and Applications of Nano Silicon in Plasmonics and Fullerenes*, **Elsevier**. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48057-4.00008-6>. Acesso em: 09 ago. 2023.

NAVAS-MORENO, M. *et al.* Nanoparticles for live cell microscopy: A surface-enhanced raman scattering perspective. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

NEDDERSEN, J.; CHUMANOV, G.; COTTON, T. M. Laser ablation of metals: A new method for preparing sers active colloids. **Appl. Spectrosc.**, v. 47, n. 12, p. 1959–1964, 1993.

NEDELCO, I. *et al.* Silver based materials for biomedical applications. **Current Organic Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 173–184, 2014.

NEVES, P. D. M. M. *et al.* Brazilian dialysis census: analysis of data from the 2009-2018 decade. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 42, n. 2, p. 191–200, 2020.

NIKURA, K. *et al.* Gold nanoparticles as a vaccine platform: Influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo. **ACS Nano**, v. 7, n. 5, p. 3926–3938, 2013.

NISHIMOTO, M.; ABE, S.; YONEZAWA, T. Preparation of ag nanoparticles using hydrogen peroxide as a reducing agent. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 17, p. 14493–14501, 2018.

NISKANEN, I. *et al.* Determination of nanoparticle size using rayleigh approximation and mie theory. **Chemical Engineering Science**, v. 201, p. 222–229, 2019.

NIWA, T. Metabolic profiling with gas chromatography—mass spectrometry and its application to clinical medicine. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 379, p. 313–345, 1986.

NIWA, T. Mass spectrometry in the search for uremic toxins. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 16, n. 6, p. 307–332, 1997.

NIWA, T. Indoxyl sulfate is a nephro-vascular toxin. **Journal of Renal Nutrition**, v. 20, n. 5, p. S2–S6, 2010.

NIWA, T. Update of uremic toxin research by mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30, n. 3, p. 510–521, 2011.

NOVOTNY, L. Nanoparticles and their plasmonic properties for biomedical applications. **Nature Photonics**, v. 5, p. 83-90, 2011

NUNES, J. P. S.; DIAS, A. A. M. ImageJ macros for the user-friendly analysis of soft-agar and wound-healing assays. **Biotechniques**, v. 4, n. 62, p. 175-179, 2017.

PARAMELLE, D. *et al.* A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. **The Analyst**, v. 139, n. 19, p. 4855, 2014.

PAWAR, S. N.; EDGAR, K. J. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. **Biomaterials**, v. 33, n. 11, p. 3279-3305, 2012.

POSSETTI, G. R. C. *et al.* Metrological evaluation of optical fiber grating-based sensors: An approach towards the standardization. **Journal of Lightwave Technology**, v. 30, n. 8, p. 1042–1052, 2012.

RAJ, S. *et al.* Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 4, n. 3, p. 186, 2012.

RAMAN, C. V.; KRISHNAN, K. S. A new type of secondary radiation. **Nature**, v. 121, n. 3048, p. 501–502, 1928.

RATHORE, D.; KURCHANIA, R.; PANDEY, R. K. Gas Sensing Properties of Size Varying CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles, **IEEE Sensors Journal**, v. 15, n. 9, p. 4961-4966, 2015.

RIZZI, A. *et al.* Influence of thermal processing on the physico-chemical and structural characteristics of blood proteins. **Food Research International**, n. 69, p. 48-57, 2015.

ROELLI, P. *et al.* Molecular cavity optomechanics as a theory of plasmon-enhanced raman scattering. **Nature Nanotechnology**, v. 11, n. 2, p. 164–169, 2015.

ROHELA, G. K. *et al.* A Review Paper on Recent Trends in Bio-nanotechnology: Implications and Potentials. **Nanoscience & Nanotechnology-Asia**, v. 1, n. 9, p. 12–20, 2018.

RODRIGUES, M. *et al.* Wound Healing: A Cellular Perspective. **Physiological Reviews**, v. 99, n. 1, 2019.

ROGERS, J. V. *et al.* A preliminary assessment of silver nanoparticle inhibition of monkeypox virus plaque formation. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, n. 4, p. 129–133, 2008.

ROMAGNANI, P. *et al.* Chronic kidney disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, 2017.

SALATIN, S.; DIZAJ, S. M.; KHOSROUSHAHI, A. Y. Effect of the surface modification, size, and shape on cellular uptake of nanoparticles. **Cell Biology International**, v. 39, n. 8, p. 881–890, 2015.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R453–R462, 2014.

SCHIEFER, E. M. *et al.* Protein-Bound Uremic Toxins Quantification by a Colorimetric Sensor Based on the Oxidation of Silver Nanoparticles. **IEEE Sensors Journal**, v. 21, n. 20, p. 22651–22660, 2021.

SCHNEIDER, C. *et al.* NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012.

SCHOOTS, A. *et al.* Uremic toxins and the elusive middle molecules. **Nephron**, v. 38, n. 1, p. 1–8, 1984.

SCHÖTT, U. *et al.* The endothelial glycocalyx and its disruption, protection and regeneration: a narrative review. **Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine**, v. 24, n. 1, 2016.

SCHULLER, D. A. J. Size-dependent enhancement of surface-plasmon resonance in gold nanoparticles. **Applied Physics Letters**, v. 82, p. 220–222, 2003.

SIGG, L.; LINDAUER, U. Silver nanoparticle dissolution in the presence of ligands and of hydrogen peroxide. **Environmental Pollution**, v. 206, p. 582–587, 2015.

SHRIVASTAVA, S.; DASH, D. Label-free colorimetric estimation of proteins using nanoparticles of silver. **Nano-micro Letters**, v. 2, p. 164–168, 2010.

SMET, R. D. *et al.* A sensitive HPLC method for the quantification of free and total p-cresol in patients with chronic renal failure. **Clinica Chimica Acta**, v. 278, n. 1, p. 1–21, 1998.

STAMPLECOSKIE, K. G., SCAIANO, J. C. Silver as an Example of the Applications of Photochemistry to the Synthesis and Uses of Nanomaterials. **Photochemistry and Photobiology**, v. 4, n. 88, p. 762–768, 2012.

- STEVENS, L. A. *et al.* Assessing kidney function — measured and estimated glomerular filtration rate. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 23, p. 2473–2483, 2006.
- STINGHEN, A. E. M.; PECOITS-FILHO, R. Vascular damage in kidney disease: Beyond hypertension. **International Journal of Hypertension**, v. 2011, p. 1–5, 2011.
- STROBBIA, P.; LANGUIRAND, E.; CULLUM, B. M. Recent advances in plasmonic nanostructures for sensing: a review. **Optical Engineering**, v. 54, n. 10, p. 100902, 2015.
- SUNG H. K. *et al.* Colorimetric detection of Co<sup>2+</sup> ion using silver nanoparticles with spherical, plate, and rod shapes. **Langmuir**, v. 28, n. 29, p. 8978-8982, 2013.
- TANG, B. *et al.* Photoinduced Shape Conversion and Reconstruction of Silver Nanoprisms. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 17, n. 113, p. 7025–7030, 2009.
- TAURAN, Y. *et al.* Molecular recognition by gold, silver and copper nanoparticles. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 35, 2013.
- VERMA, S. *et al.* A facile synthesis of broad plasmon wavelength tunable silver nanoparticles in citrate aqueous solutions by laser ablation and light irradiation. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 527, p. 23-33, 2017.
- USMAN, A. I.; AZIZ, A. A.; NOQTA, O. A. Green formation of nano-hexagon from nano-triangle of gold nanoparticles using palm oil fronds extracts. **Solid State Phenomena**, v. 290, p. 87–92, 2019.
- VADAKEDATH, S.; KANDI, V. Dialysis: A review of the mechanisms underlying complications in the management of chronic renal failure. **Cureus**, v. 8, n. 9, 2017.
- VANHOLDER, R. Uraemic toxins and cardiovascular disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, n. 3, p. 463–466, 2003.
- VANHOLDER, R. *et al.* Why do patients on peritoneal dialysis have low blood levels of protein-bound solutes? **Nature Reviews Nephrology**, v. 5, n. 3, p. 130–131, 2008.
- VANHOLDER, R. *et al.* Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. **Kidney International**, v. 63, n. 5, p. 1934–1943, 2003.
- VANHOLDER, R. C.; RINGOIR, S. M. G. The uremic syndrome. *In*: CAMERON, S. *et al.* **Oxford Textbook of Clinical Nephrology**. Oxford, UK, 1992. p. 1236–1250.
- VANHOLDER, R. C. *et al.* European Uremic Toxin Work Group. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 20, n. 6, p. 1048, 2005.

VANHOLDER, R.; LAECKE, S. V.; GLORIEUX, G. What is new in uremic toxicity?. **Pediatric Nephrology**, v. 23, n. 8, p. 1211, 2008.

VELNAR, T.; GRADISNIK, L. Tissue Augmentation in Wound Healing: the Role of Endothelial and Epithelial Cells. **Medical Archives**, v. 6, n. 72, p. 444-448, 2018.

VIEIRA, L. F. A. *et al.* Metallic nanoparticles reduce the migration of human fibroblasts in vitro. **Nanoscale Research Letters**, v. 1, n. 12, 2017.

XIA, Y., HALAS, N.J. Shape-Controlled Synthesis and Surface Plasmonic Properties of Metallic Nanostructures. **MRS Bulletin**, v. 30, p. 338–348, 2005.

XUE, C. *et al.* Mechanistic Study of Photomediated Triangular Silver Nanoprism Growth. **Journal of the American Chemical Society**, v. 26, n. 130, p. 8337–8344, 2008.

XUE, C., MIRKIN, C. A. pH-Switchable Silver Nanoprism Growth Pathways. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 12, n. 46, p. 2036–2038, 2007.

YANG, B. *et al.* In vitro comparative evaluation of recombinant growth factors for tissue engineering of bladder in patients with neurogenic bladder. **Journal of Surgical Research**, v. 186, n. 1, p. 63–72, 2014.

YANG, L. *et al.* Comparisons of the biodistribution and toxicological examinations after repeated intravenous administration of silver and gold nanoparticles in mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

WU, X. *et al.* Photovoltage Mechanism for Room Light Conversion of Citrate Stabilized Silver Nanocrystal Seeds to Large Nanoprisms. **Journal of the American Chemical Society**, v. 29, n. 130, p. 9500–9506, 2008.

WU M. *et al.* Rapid Colorimetric Detection of Cartap Residues by AgNP Sensor with Magnetic Molecularly Imprinted Microspheres as Recognition Elements. **Molecules**, v. 23, n. 6, p. 1-14, 2018.

WU, G. *et al.* A novel AgNPs-based colorimetric sensor for rapid detection of Cu<sup>2+</sup> or Mn<sup>2+</sup> via pH control. **RSC Advances**, v. 26, n. 5, p. 20595-20602, 2015.

ZHANG, C.; HU, Z.; DENG, B. Silver nanoparticles in aquatic environments: Physicochemical behavior and antimicrobial mechanisms. **Water Research**, v. 88, p. 403-427, 2016.

ZHANG, J. *et al.* Photomediated synthesis of silver triangular bipyramids and prisms: The effect of pH and BSPP. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 35, p. 12502–12510, 2010.