



SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO BIOCAMPATÍVEIS¹

Anayive Pérez-Rebolledo²
Priscila Rodrigues da Costa³
Milena Murucci Janeti⁴
Andréa Vidal Ferreira⁵
Raquel Gouvêa dos Santos⁴

Resumo

A nanotecnologia é uma área ampla e interdisciplinar de investigação que vem crescendo de forma importante nos últimos anos. Dentre os diversos tipos de nanomateriais estudados destacam-se, em particular, as nanopartículas de ouro (AuNPs) as quais possuem variados campos de aplicação em biotecnologia e biomedicina. O interesse pelo desenvolvimento de AuNPs deve-se a suas extraordinárias propriedades físicas e químicas resultantes do efeito do tamanho nano. Nesse trabalho foi desenvolvido um novo processo de obtenção de AuNPs biocompatíveis, cuja superfície foi modificada para permitir sua posterior ligação a fármacos com atividade antitumoral. Foram obtidas AuNPs modificadas com tióis, os quais permitiram a conjugação do polímero polietilenoglicol (PEG). Os resultados indicam a formação de AuNPs estabilizadas pelo íon citrato, com tamanhos entre 5-10 nm e forte absorção em 520 nm. As nanopartículas modificadas com tiol e PEG mostraram tamanhos de 62 nm e 644 nm, respectivamente, e apresentaram fácil redispersão em meio aquoso. A concentração de nanopartículas em cada solução foi determinada por ativação neutrônica.

Palavras-chave: Síntese; Nanopartículas de ouro; Biocompatibilidade; Modificação da superfície.

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF BIOCAMPATIBLE GOLD NANOPARTICLES

Abstract

Nanotechnology is a broad and interdisciplinary area of research that has been an important increase in recent years. Among the various types of nanomaterials studied stand out in particular the gold nanoparticles (AuNPs) which can be applied in several fields such as biotechnology and biomedicine. The interest in development of AuNPs is due to its extraordinary physical and chemical properties resulting from the nanoscale. In this work it was developed a new process to obtain biocompatible AuNPs, whose surface was modified to allow its subsequent association to drugs with antitumor activity. Were obtained AuNPs modified with thiols, which allowed conjugation of the polymer polyethylene glycol (PEG). The results indicate the formation of AuNPs stabilized by citrate ion, with sizes ranging 5-10 nm and strong absorption at 520 nm. Nanoparticles modified with thiol and PEG showed sizes of 62 nm and 644 nm, respectively, and had easy redispersion in water. The concentration of nanoparticles in each solution was determined by neutron activation analysis.

Key words: Synthesis; Gold nanoparticles; Biocompatibility; Surface modification.

¹ Contribuição técnica ao 65º Congresso Anual da ABM, 26 a 30 de julho de 2010, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

² PhD, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, CDTN, Belo Horizonte, MG, Brasil

³ Mestranda, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, CDTN, Belo Horizonte, MG, Brasil

⁴ PhD, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, CDTN, Belo Horizonte, MG, Brasil

⁵ Iniciação científica, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, CDTN, Belo Horizonte, MG, Brasil



1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas tecnologias e processos exige cada vez mais a fabricação de materiais com propriedades preestabelecidas, e que são dificilmente encontradas em materiais convencionais. Neste contexto, sistemas nanoestruturados têm atraído grande interesse já que a redução de tamanho (em dimensões da ordem de alguns nanômetros) pode ocasionar mudanças importantes nas propriedades químicas e físicas de um sólido.⁽¹⁾

Os avanços em nanotecnologia têm gerado candidatos promissores para muitas aplicações. Estas diferentes aplicações criam a necessidade de novos métodos preparativos os quais possam ser capazes de controlar tamanho de partícula, dispersibilidade, solubilidade e funcionalidade.⁽²⁾ Em particular, as nanopartículas de ouro (AuNPs) têm mostrado grande potencial em uma variedade de aplicações biológicas,⁽³⁾ incluindo a utilização de testes de diagnóstico altamente sensíveis, ablação térmica,⁽⁴⁾ radioterapia, bem como transportadores para a entrega de drogas diretamente no local de ação.⁽⁵⁾ O raciocínio básico é que quando nanopartículas de ouro são conjugadas com anticorpos monoclonais, peptídeos ou moléculas pequenas, essas podem ser direcionadas ao alvo de ação, com alta especificidade e afinidade, podendo assim, ser usadas como sondas biológicas no diagnóstico por imagem e/ou terapia.⁽⁶⁻⁷⁾ As nanopartículas de ouro, no entanto, sofrem perda ou redução da sensibilidade e seletividade, devido à agregação sob a alta força iônica de fluidos biológicos e a interação não-específica com biomoléculas, como proteínas ou DNA. Trabalhos recentes indicam que as nanopartículas de ouro revestidas com uma camada protetora de polietilenoglicol ou PEG apresentam excelente estabilidade e biocompatibilidade.⁽⁸⁾ A finalidade deste trabalho foi a obtenção de nanopartículas de ouro biocompatíveis, funcionalizadas para permitir a posterior ligação de fármacos com atividade antitumoral. A estratégia utilizada foi a de conjugar um polímero hidrofílico como PEG a nanopartículas de ouro, promovendo a ligação química com moléculas contendo os grupos tiol e ácido carboxílico, através de uma nova metodologia. Técnicas de Espalhamento de luz dinâmico (DLS), Microscopia Eletrônica de transmissão (MET), Microscopia de Força Atômica (AFM) e Espectroscopia de absorção UV-Visível, foram empregadas para caracterizar o tamanho e geometria das nanopartículas, além de confirmar sua ligação a PEG.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes e Materiais

Todos os reagentes usados na síntese foram obtidos da Sigma Aldrich. Os solventes foram usados sem prévia purificação. Em todas as etapas do experimento foi utilizada água Milli-Q (18.2 MΩ). As soluções tampão foram preparadas de acordo com os procedimentos padrões do laboratório. Foram usadas membranas de celulose para diálise, modelo D9652-100 FT, Sigma Aldrich (Saint. Louis, EUA).

2.2 Síntese de AuNPs→citrato e AuNPs→Tiol

Soluções aquosas de AuNPs→citrato e AuNPs modificadas com ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) foram preparadas mediante redução de soluções aquosas de ácido tetracloroáurico(III) trihidrato (HAuCl₄.3H₂O) Brevemente, 10,0 mL da solução de ácido tetracloroáurico(III) 1,0 mM foi dissolvida em água milli-q a baixa



temperatura. Seguidamente foram adicionados 30,0 mL de uma solução de citrato de sódio com agitação contínua por 5 min.⁽⁹⁻¹¹⁾ Posteriormente a solução de ouro foi reduzida mediante a adição de 1,0 mL de Borohidreto de sódio 100 mM mantendo a agitação por cerca de 20 minutos. A solução mudou de incolor a vermelho tendo um pH de 7,0. A suspensão foi armazenada a 4°C. Para a preparação das AuNPs→Tiol foi seguido o mesmo procedimento descrito anteriormente, mas na etapa final o pH de 55,0 mL da solução vermelha (AuNPs→citrato) diluídos em 45,0 mL de água milli-q foi modificado gotejando uma solução de hidróxido de sódio até pH 11,0 e seguidamente foram adicionados 5,0 mL de solução etanólica do ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) 10,0 mM, com agitação constante a baixa temperatura. A solução roxa resultante foi colocada em diálise por 48 horas trocando por 3 vezes a água de diálise. O pH final foi de 8,0.

2.3 Síntese de AuNPs→Tiol-PEG

A solução de AuNPs→Tiol obtida na etapa anterior foi diluída com tampão de ácido 2- N-morfolino etanossulfônico (MES) (50 mM, a pH 6,5) e seguidamente foram adicionados 0,035 mmol de hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 0,0875 mmol de N-hidroxisuccinimida (NHS), mantendo-se a mistura sob agitação por cerca de 45 minutos. Posteriormente, foram adicionados 0,045 mmol de polietilenoglicol bis (3,3-aminopropil) (MW 2000) e a solução resultante foi agitada por 24 h, e finalmente diálisada contra água milli-q por 3 dias. 100 mL da dispersão resultante foi protegida da luz e armazenada a 4°C.

2.4 Caracterização das Nanopartículas Sintetizadas

A etapa de síntese e todas as fases de tratamento da superfície das nanopartículas foram avaliadas através de espectros de absorção na região UV-Visível, obtidos a temperatura ambiente utilizando-se uma cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico, no Espectrofotômetro HP8453– Hewlett Packard; o tamanho das partículas e o índice de polidispersividade foram obtidos a 25 °C pelo método de “light scattering” (DLS), realizado em aparelho Zetasizer 3000 HSA (Malvern Instruments); imagens de Microscopia de Força Atômica (MFA) foram obtidas a temperatura ambiente no aparelho modelo NTegra Aura marca NT-MDT e as imagens de Microscopia Eletrônica de transmissão (MET) no aparelho Tecnai-G2-20-FEI/Tecnai G2-Spirit-FEI/Quanta 200-FEG-FEI/Quanta 3D FEG-FEI microscope. As amostras para TEM foram preparados colocando uma gota da solução de AuNPs sobre uma grade de cobre revestida com filme de carbono amorfo (400 mesh, Emsdiasum)

2.5 Ativação Neutrônica

Ativação neutrônica foi desenvolvida em um reator nuclear TRIGA MARK I IPR-R1 do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear CDTN/CNEN, Belo Horizonte. Alíquotas de 400,0 µL de solução de AuNPs, por duplicata, foram ativadas durante 1 hora. O conteúdo de ouro foi estimado em um Espectrômetro Gama com detector NaI.

3 RESULTADOS

Neste trabalho foram obtidas nanopartículas de ouro (AuNPs) mediante a redução a baixa temperatura, de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ com NaBH_4 e posterior modificação da superfície através da ligação de moléculas com grupos Tiol e/ou PEG, empregando uma metodologia alternativa baseada em protocolos reportados na literatura.⁽⁹⁻¹¹⁾ A Figura 1 mostra uma imagem das cores características das soluções obtidas de AuNPs→citrato, AuNPs→Tiol e AuNPs→Tiol-PEG. Os espectros na região do UV-visível para estas soluções são apresentados na Figura 2.

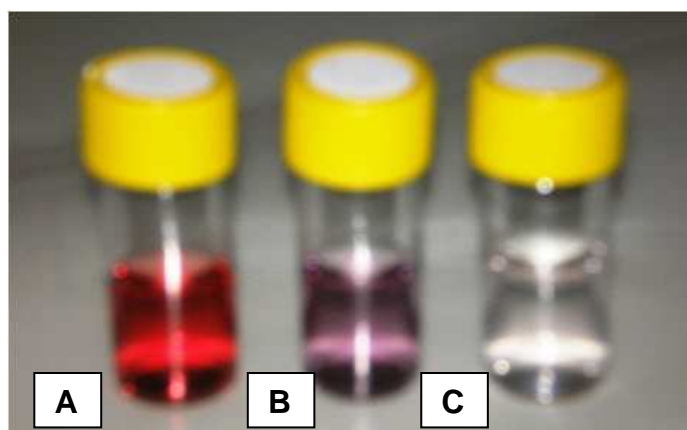


Figura 1. Cores características das soluções de nanopartículas de ouro AuNPs→citrato (A) AuNPs→Tiol (B) AuNPs→Tiol-PEG (C).

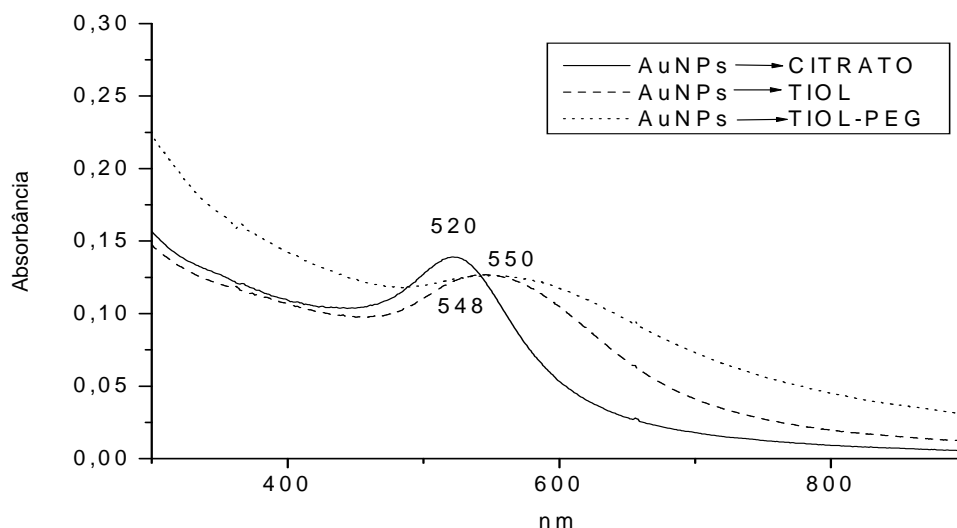


Figura 2. Espectro de absorção para as dispersões de nanopartículas de ouro funcionalizadas.

Os resultados das microscopias MET, MFA (Figuras 3 a 5) e da técnica de DLS, confirmaram a formação de AuNPs→citrato monodispersas com um diâmetro médio de $10,3 \pm 0,6$ nm, a solução foi estável após um mês de preparada. Os resultados de alta resolução de TEM indicam a cristalinidade da partícula de ouro com rede de planos atômicos (111) para a estrutura cristalina fcc do ouro como mostrado na Figura 3B.^(10,11) Para as nanopartículas passivadas com grupos tiol (Figura 4) as análises mostram incipiente aglomeração das nanopartículas, desse modo, o tamanho das AuNPs→Tiol e AuNPs→Tiol-PEG, aumenta aproximadamente a 62 nm

e 644 nm, respectivamente. Os três tipos de soluções de nanopartículas formam aglomerados quando dissolvidos em água ou solução tampão de PBS, mas quando homogenizadas são redispersas.

A ativação neutrônica permitiu a determinação da concentração de ouro em cada solução. A concentração da solução AuNPs→citrato foi de 36,0 µg/mL (esperada 38,0 µg/mL), para AuNPs→Tiol foi de 15,0 µg/mL (esperada 18,0 µg/mL), e para AuNPs→Tiol-PEG foi de 0,75 µg/mL (esperada 11,7 µg/mL). Foi observada a perda de material na etapa de obtenção de AuNPs→Tiol-PEG.

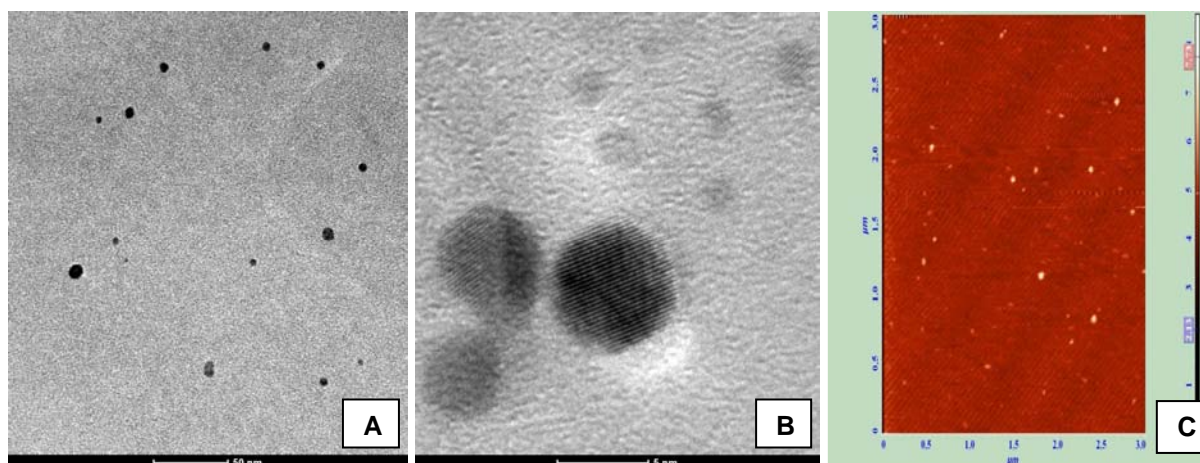


Figura 3. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (A e B) e Microscopia de Força Atômica (C) da monodispersão de AuNPs→citrato.

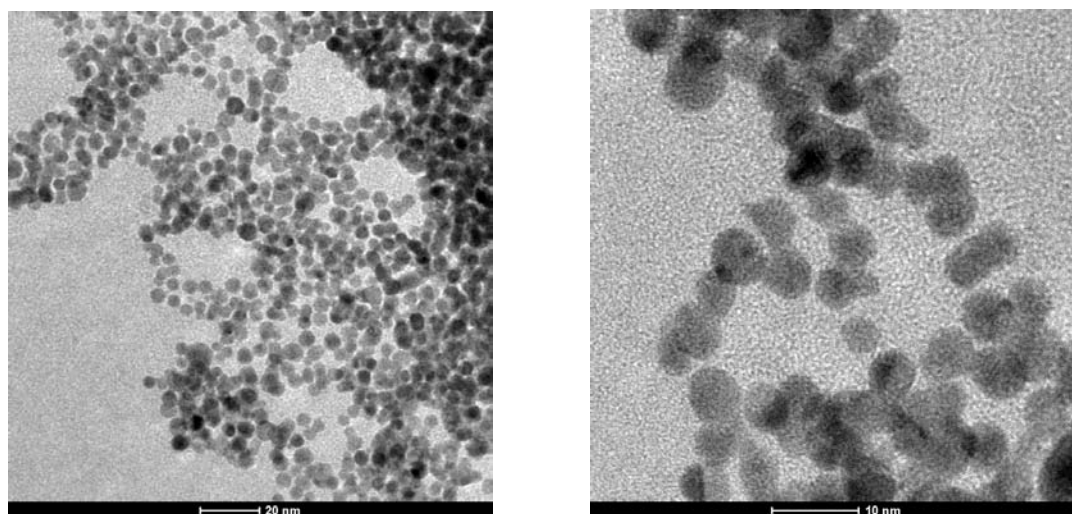


Figura 4. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão da dispersão de AuNPs→Tiol.

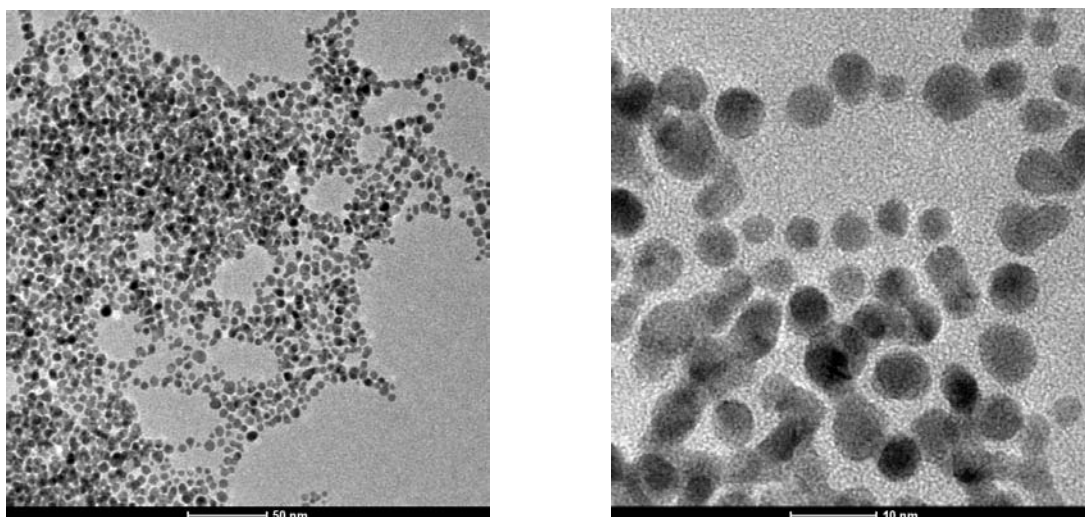


Figura 5. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão da dispersão de AuNPs→Tiol-PEG.

4 DISCUSSÃO

As AuNPs estabilizadas pelo íon citrato, sintetizadas pelo método descrito acima, foram modificadas com tióis, os quais permitiram a conjugação de polietileno glicol (PEG) através de ligações amídicas entre o grupo carboxilato do ácido 3-mercaptopropionico e um grupo amino no PEG modificado, levando a formação de AuNPs→Tiol-PEG (Figura 1). Desse modo as moléculas de citrato eletrostaticamente unidas as nanopartículas, foram substituídas por ligações covalentes mais estáveis fornecidas pela superfície funcionalizada com tióis,⁽¹²⁾ os quais se ligam covalentemente ao PEG. Os produtos com tiol e PEG foram purificados através de etapas de diálise contra água milli-Q, removendo efetivamente contaminantes de pequeno peso molecular. Estas etapas levaram a diminuição da concentração da solução pela perda de nanopartículas, mas atenuaram a formação de grandes aglomerados, em comparação com processos de centrifugação. As nanopartículas obtidas foram facilmente redispersas em meio aquoso. Os dados de quantificação do ouro mostraram grande perda de material na etapa de obtenção de AuNPs→Tiol-PEG. Essas perdas foram atribuídas a processos de diálise e dispersão das nanopartículas, indicando que é necessária a otimização destes processos para melhorar a recuperação do nanomaterial nesta etapa da síntese.

A solução de AuNPs→citrato com tamanhos de partícula em torno de 5 nm - 10 nm, apresentou uma forte absorção em 520 nm, devido à ressonância dos plasmons de superfície característicos de colóides de ouro, a qual é dependente do tamanho e forma das nanopartículas⁽¹⁰⁾ (Figura 2). As dispersões AuNPs→Tiol e AuNPs→Tiol-PEG apresentaram absorção em 548 nm e 550 nm respectivamente. Esse deslocamento da absorção para maiores comprimentos de onda deve-se à mudança da superfície das nanopartículas de ouro, confirmando sua ligação a moléculas de tiol ou de PEG, sugerindo também, possíveis processos de fusão pela formação de ligações de hidrogênio inter-partículas, devidas à funcionalização com grupos terminais -COOH (Tióis) e -NH₂ (PEG). A monodispersão das soluções recém preparadas foi confirmada pela ausência de bandas na região entre 600 e 700 nm características de fortes processos de agregação.⁽¹³⁾

Os resultados das análises de TEM e MFA mostraram que as nanopartículas passivadas com grupos tiol (Figura 4) sofreram incipiente aglomeração, devido a diminuição da estabilização eletrostática e aumento da estabilização estérica

ocorridas pelas variações de pH durante o processo, afetando a etapa posterior de conjugação a moléculas PEG (Figura 5), o que se confirmou pelas análises de DLS. Visto que, o PEG fornece uma camada protetora biológica para melhorar a estabilidade impedindo a aglomeração de partículas e adsorção de proteínas, aumentando conseqüentemente a eficiência da internalização das partículas pelas células-alvo e que nanopartículas recobertas com PEG tem-se mostrado biocompatíveis através de diferentes testes biológicos;⁽¹³⁾ o revestimento das AuNPs com PEG desenvolvido nesse trabalho aparece como mais uma ferramenta útil para obtenção de nanomateriais funcionalizados e adequados para posterior ligação a fármacos contendo atividade antitumoral ou para uso como agentes de contraste em diagnóstico.

5 CONCLUSÃO

Foi desenvolvida com sucesso uma nova metodologia para obtenção de nanopartículas de ouro funcionalizadas com polietilenoglicol modificado. As nanopartículas estabilizadas com citrato apresentaram diâmetros médios de 10,3 nm e foram estáveis por mais de 30 dias. Na funcionalização com moléculas de tiol e PEG foram observados processos de fusão, aglomeração e aumento no tamanho de partícula. As nanopartículas funcionalizadas foram facilmente redispersas em meio aquoso. Os produtos mostraram-se apropriados para posterior funcionalização com fármacos.

Agradecimentos

Agradecemos a todos os membros da equipe do Centro de Microscopia da UFMG, do Laboratório de Microscopia de Força Atômica e do Reator Nuclear do CDTN pelo suporte técnico. Ao CDTN e as agências de fomento CAPES, CNPq.

REFERÊNCIAS

- 1 Muhammed, M., NATO Science Series: Nanostructures: Synthesis, Functional Properties and Applications. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands., v. 128, p. 37-79, 2003.
- 2 Rucareanu, S., Gandubert, V.J., Lennox, R. B., 4-(*N,N*-Dimethylamino)pyridine-Protected Au Nanoparticles: Versatile Precursors for Water- and Organic-Soluble Gold Nanoparticles, Chem. Mater.,v 18, p. 4674–4680, 2006.
- 3 Jiwen Zheng, Jeffrey D. Clogston, Scott E. McNeil, Anil K. Patri, Stability Examination of PEG Bound to Gold Nanoparticles. Disponível em: <http://www.mrs.org/s_mrs/sec_subscribe.asp?CID=8759&DID=197604&action=detail> Acesso em: 18 fev. 2010.
- 4 O'Neal, D.P., Hirsch, L.R., Halas, N.J., Payne, J.D., West, J.L., Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. Cancer Lett. v. 209, p.171–176, 2004.
- 5 Gibson, J.D., Khanal, B.P., Zubarev, E.R., 2007. Paclitaxel-functionalized gold nanoparticles. J. Am. Chem. Soc. v. 129, p.11653–11661, 2003.
- 6 Gao, X., Cui, Y.Y., Levenson, R.M., Chung, L.W.K. & Nie, S.M. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. Nat. Biotechnol. v. 22, p. 969–976, 2004.
- 7 Lee, E.S., Na, K. & Bae, Y.H. Polymeric micelle for tumor pH and folate-mediated targeting. J. Control. Release v. 91, p.103–113, 2003.

- 8 Qian, X., Peng, X.H., Ansari, D.O., Yin-Goen, Q., Chen, G.Z., Shin, D.M., Yang, L., Young, A.N., Wang, M.D., Nie, S., In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. *Nat. Biotechnol.* v. 26, p. 83–89, 2008.
- 9 Andrea Majzik, Rita Patakfalvi, Viktória Hornok, Imre Dékány., Growing and stability of gold functionalization by cysteine. *Gold Bulletin.* v. 42, n 2, p. 113, 2009.
- 10 Kihyun Kwon, Kang Yeol Lee, Young Wook Lee, Minjung Kim, Jinhwa Heo Sang Jung Ahn, Sang Woo Han., Controlled Synthesis of Icosahedral Gold Nanoparticles and Their Surface-Enhanced Raman Scattering Property. *J. Phys. Chem. C*, v. 111, p.1161-1165, 2007.
- 11 Yan-Juan Gu, Jinping Cheng, Chun-Chi Lin, Yun Wah Lam, Shuk Han Cheng, Wing-Tak Wong., Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology.* v. 237, issue 2, p. 196-204, 2009.
- 12 Michael R. Ivanov, Heidi R. Bednar, Amanda J. Haes., Investigations of the mechanism of gold nanoparticle stability and surface functionalization in capillary electroforesis. *ACS NANO.*, v. 3, n 2, p 386-394, 2009.
- 13 Zhang G, Yang Z, Lu W, Zhang R, Huang Q, Tian M, Li L, Liang D, Li C., Influence of anchoring ligands and particle size on the colloidal stability and in vivo biodistribution of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles in tumor-xenografted mice. *Biomaterials.*, v30, p 1928-1936, 2009.