

SÍNTESE VERDE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO E APLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO E TERAPIA DE ATEROSCLEROSE

Karina de Oliveira Gonçalves¹, Monica Nascimento da Silva¹, Leticia Bonfante Sicchieri², Flávia Rodrigues de Oliveira Silva² e Lilia Coronato Courrol^{1,2}

¹Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de São Paulo;

²Centro de Lasers e Aplicações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

e-mail: k_oligon@yahoo.com.br

Resumo: As nanopartículas de ouro apresentam inúmeras aplicações na medicina, como por exemplo, a terapia fototérmica e o rastreamento de tumores (biomarcadores). Elas também podem ser utilizadas no transporte de drogas (drug delivery), genes e DNA.

Foi recentemente demonstrada na literatura que a incorporação de nanopartículas de ouro na estrutura do ácido δ - aminolevulínico (ALA) melhora as propriedades fotodinâmicas da terapia.

Neste estudo propomos estabelecer correlações entre alterações nas fluorescências da protoporfirina IX extraídas do sangue e o crescimento da placa de ateroma. Este estudo implica em determinar se as nanopartículas de ouro sintetizadas com ALA podem fornecer informações adicionais e permitir prever quais pacientes correm maiores riscos de doença cardíaca no futuro de forma não invasiva e de baixo custo.

Palavras-chave: Nanopartículas, Fluorescência, Protoporfirina IX, Aterosclerose.

Abstract: *Gold nanoparticles have several applications in medicine, such as photo-thermal therapy and tracing tumors (biomarkers). They can also be used to transport drugs (drug delivery), genes and DNA.*

It has recently been demonstrated in the literature that incorporation of gold nanoparticles in the structure of ALA enhances the properties of photodynamic therapy.

In this study we propose to establish correlations between changes in fluorescence of protoporphyrin IX extracted from the blood and the growth of atherosclerotic plaque. This study implies determine whether gold nanoparticles synthesized with Ala can provide additional information and allow predicting which patients are at greater risk of future heart disease noninvasively and at low cost.

Keywords: *Nanoparticles, Fluorescence, Protoporphyrin IX, Atherosclerosis.*

Introdução

Nas últimas décadas, o interesse na área das Nanotecnologias e Nanociências, têm se tornado cada

vez maior. As nanopartículas de ouro apresentam inúmeras aplicações, como a terapia fototérmica e o rastreamento de tumores.^{1,2}

Alguns métodos de síntese “verde” de nanopartículas vêm sendo desenvolvidos recentemente.³ São alternativas inovadoras, pois envolvem a síntese biológica, sobretudo, através do uso de bactérias, fungos e plantas.⁴ Esses processos são de extrema importância porque reduzem ou eliminam o uso de solventes e reagentes e também a geração de produtos tóxicos, nocivos à saúde humana.^{5,6}

A síntese de nanopartículas de ouro, com a utilização da fonte de Xenônio, do ácido δ - aminolevulínico (ALA) e do polietilenoglicol (PEG), faz com que elas se tornem orgânicas e biocompatíveis, tendo grandes aplicações na área médica, já que o ALA é empregado como pró-fármaco, pois é precursor da protoporfirina IX (PPIX), que pode se acumular nos tecidos em rápido crescimento, incluindo tumores e placas ateroscleróticas.

Peng C. e colaboradores⁷ mostraram recentemente que após administração intravenosa de ALA, ácido delta-aminolevulínico em coelhos submetidos à dieta hipercalórica, é possível se detectar fluorescência da protoporfirina IX, a PPIX, na placa de ateroma. A intensidade de fluorescência de PPIX atingiu o máximo 2 h após a injeção de ALA e apresentou intensidade 12 vezes maior do que a do segmento de vaso normal adjacente, e se obteve uma correlação positiva com o teor de macrófagos.⁷ Subsequentemente, foi realizada a terapia fotodinâmica (635 nm a 50 J/cm²) nas placas ateroscleróticas. Em um trabalho recente verificamos que a PPIX extraída do sangue aumenta com o aumento da placa de ateroma, indicando a possibilidade de utilização da PPIX como um biossensor.⁸ Observou-se que aplicação concomitante de ALA, um precursor da PPIX, e nanopartículas de ouro exerce um efeito cooperativo elevando a formação de espécies reativas de oxigênio aumentando a potencialidade como agente fotossensibilizador.³ Assim, nesse trabalho a autofluorescência de protoporfirina (PPIX), extraída do sangue de coelhos submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica foi analisada, sem e com a administração oral de ALA e ALA: Au. Desta forma este

trabalho apresenta os resultados do estudo da potencialidade do uso do ALA: Au como agente terapêutico de aterosclerose.

Materiais e métodos

Reagentes e equipamentos

Para a síntese das nanopartículas de ouro, utilizou-se o tetracloroaurato de hidrogênio (HAuCl_4) da Sigma-Aldrich, água bideionizada, ácido δ - aminolevulínico (ALA) da Sigma-Aldrich, e polietilenoglicol (PEG).

Os materiais/equipamentos foram: pipetas e ponteiras, tubo tipo Eppendorf, béqueres e frascos de plástico e de vidro. Além de vortex Biomixer QL-901 para homogeneizar as amostras, uma balança Shimadzu AVW 220 D e uma lâmpada de xenônio Cermax de 400 Watts.

Síntese das nanopartículas de ouro

Para o preparo das nanopartículas, foram adicionados os reagentes acima citados, seguido de adição de água bideionizada. A solução foi então agitada no vórtex por 5 minutos e exposta à luz branca (lâmpada de Xenônio.) As concentrações dos reagentes, o tempo de iluminação e o pH foram estudados, até que se obteve o melhor valor para as concentrações que foi de 45,22 mg de Ala, 15,62 mg de Au e volume final de 100 ml de solução. O melhor tempo de iluminação também foi obtido, a partir da análise dos dados de absorção óptica das nanopartículas.

As primeiras nanopartículas, foram feitas sem a adição de PEG, depois constatou-se que, com a adição de PEG, as nanopartículas adquiriam melhor estabilidade, e assim foram utilizadas 1 mg de PEG para cada 1 ml de solução.

Caracterização

As amostras foram analisadas no espectrofotômetro Varian Cary 17D. Para as análises utilizou-se cubetas de quartzo com caminho óptico de 10 mm. O volume de amostra utilizado foi de aproximadamente 1 ml. Também foi analisada uma amostra de ALA em água bideionizada.

Microscopia eletrônica de transmissão

As análises microscópicas foram feitas no microscópio eletrônico de varredura da marca Philips modelo LX30 do Centro de Ciências e Tecnologia de Materiais do IPEN. Empregou-se o software ImageJ® 1.46f para determinar o tamanho médio das nanopartículas, aplicando um modelo de fit gaussiano pelo Origin 8.

Resultados Obtidos

Após homogeneizar a solução ALA: Au, obtêm-se uma solução amarelada, que não sofre nenhum tipo de espalhamento de luz e também não absorve luz alguma no comprimento de onda de 300 a 800 nm. Entretanto, ao iluminar essa solução com luz de Xe, observa-se a mudança da cor da solução, passando do amarelado

/incolor para o violeta - de diferentes tons -, dependendo do tempo empregado de iluminação com Xe, conforme mostra a figura 1. Essa mudança de cor é resultado da redução do ouro, que passou da forma iônica (Au^{3+}) para a forma reduzida (Au^0) e que, por ser um sólido pequeno, ficou em suspensão.

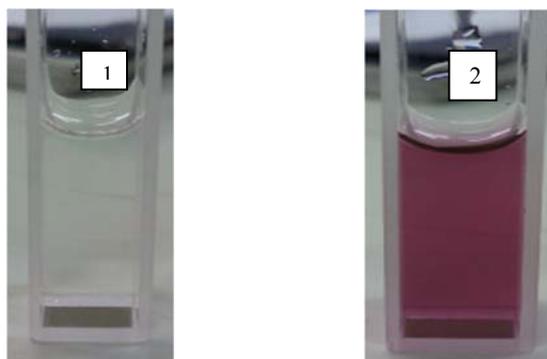


Figura 1: 1 – Solução sem iluminar; 2 – Solução iluminada com 6 minutos.

Analisou-se os valores de absorbância da nanopartículas com PEG, quando o pH foi alterado, sem alterar o pH, ambas com iluminação de 2 minutos, e por fim sem iluminação com a lâmpada de Xe. Para tanto, fez-se a espectroscopia Uv-Vis do ALA sozinho, para saber se apareceria alguma banda. Esses resultados são apresentados na figura 2. Pode-se notar que a alteração do pH favoreceu a formação das nanopartículas de ouro. O estudo da alteração do pH das nanopartículas é fundamental, pois como se deseja utilizá-las, em estudos animais, o pH se faz importante, já que depois da síntese, estas apresentam um pH muito ácido.

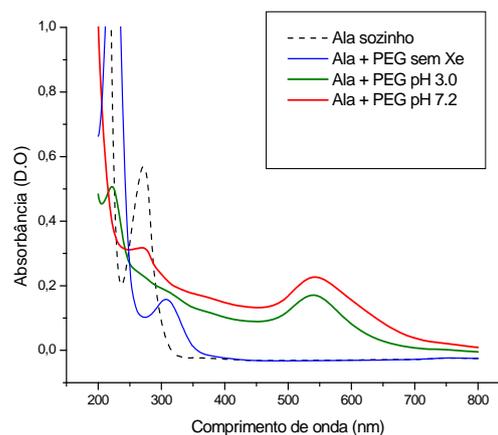


Figura 2: Nanopartículas com PEG e mudança de pH.

Foram feitas as microscopias eletrônicas de transmissão para as amostras das soluções. O resultado das amostras de nanopartículas com PEG e alteração de pH, estão na figura 3. Escolheu-se o tempo de iluminação 2 minutos e pH de 7.2. Observou-se a formação de partículas esféricas de tamanhos entre 10 e 20 nm.

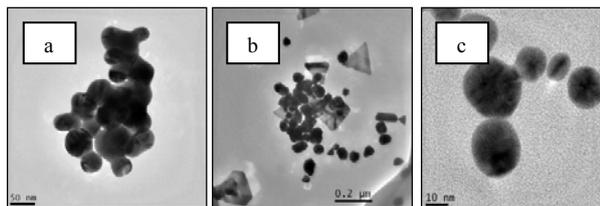


Figura3: Microscopia eletrônica no MET da solução de partículas de ouro, a) ALA:Au; b) ALA:Au com pH ajustado em 7,0 c) ALA:Au com PEG com pH ajustado em 7,2.

Estudo animal

Foram utilizados 10 animais, sendo todos coelhos brancos e machos da Nova Zelândia da espécie *Oryctolagus Cuniculus*, adultos pesando cerca de $(2,5 \pm 0,5)$ kg e idade de $(3,5 \pm 4)$ meses.

Os coelhos foram divididos em 3 grupos:

- Grupo Controle (GC): 2 coelhos
- Grupo ALA sem dieta: 2 coelhos
- Grupo ALA com dieta: 3 coelhos
- Grupo ALA:Au com dieta: 3 coelhos

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal da Unifesp CEP N° 1147091113.

Os animais ficaram em aclimatação durante duas semanas para ambientação nas gaiolas com temperatura média entre 18 ° C a 21° C no Biotério do IPEN. Depois os grupos foram divididos e foi feita a indução da ração hipercolesterolêmica a 1% preparada utilizando 200 gramas de colesterol (Sigma-Aldrich a 95%®) dissolvidos em 800 mililitros de clorofórmio e distribuídos em 20 quilogramas de ração comercial Nuvital® para coelhos. Apenas os grupos ALA com dieta e ALA:Au com dieta receberam esta ração. Os demais coelhos receberam ração molhada com clorofórmio.

Todos os grupos receberam a mesma quantidade de ração sendo aproximadamente de 150 a 250 gramas de ração consumida por dia por cada coelho durante 60 dias.

Preparação e administração oral da solução de ALA e ALA:Au

Foram utilizados 60 mg/kg de ALA, que foi diluída em solução fisiológica, e o pH foi alterado para 6.8 com adição de NaOH.

A solução de ALA:Au, utilizada, foi a descrita acima.

Os animais receberam 3 doses: no primeiro dia de dieta, no 34° dia e no 60° dia. Os coelhos receberam as doses via oral, com ajuda de uma seringa.

A coleta de sangue foi realizada no 60° dia, aproximadamente 3 horas depois de ser aplicado ALA e ALA:Au. Os dados obtidos estão representados na figura 4.

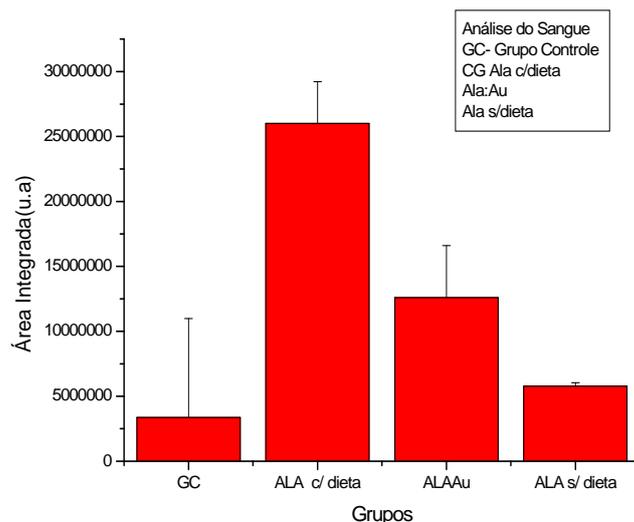


Figura 4: A área do espectro de emissão (575-725 nm) da PPIX extraída do sangue é mostrada no gráfico. A unidade de medida utilizada, foi a unidade arbitrária.

Discussão

Os resultados apresentados mostram que a síntese verde de nanopartículas com ALA, foi melhorada com a adição de PEG em pH neutro (pH 7.2).

Os resultados das análises do sangue, mostram que houve um aumento na emissão da protoporfirina IX, nos grupos que receberam a dieta hipercolesterolêmica, e ainda, um aumento maior no Grupo ALA e ALA:Au.

Conclusão

A síntese verde de nanopartículas de ouro utilizando o ácido aminolevulínico (ALA), e a luz, foi possível.

Para tanto, foi necessário o estudo das concentrações de Ala e Au, até que se obteve o melhor valor para as concentrações que foram: 45,22 mg de ALA, 15,62 mg de Au e volume final de 100 ml de solução. O melhor tempo de iluminação também foi obtido, a partir da análise dos dados de absorção óptica das nanopartículas. Pode-se observar, na figura de microscopia eletrônica, que em pH neutro, em torno de 7.2, as nanopartículas encontram-se dispersas. O PEG funcionou como agente capeante, pois envolveu as nanopartículas evitando que estas se aglomerassem, dando mais estabilidade e tornando-as organicamente solúveis e biocompatíveis.

Em relação aos dados de sangue, pode se observar um aumento na emissão da PPIX, nos grupos ALA c/ dieta e ALA: Au c/ dieta, ou seja, embora, parte do ALA tenha sido usado na reação com o tetracloroaurato de hidrogênio (HAuCl₄), na formação das nanopartículas, houve ainda um restante, que participou na formação da PPIX, e assim os resultados mostraram um método que pode ser usado para detectar crescimento de placas de ateroma, e futuramente a utilização dessas nanopartículas para terapia fotodinâmica.

Agradecimentos

Ao Biotério do IPEN, ao Centro de Lasers e Aplicações, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares e também à Capes pelas bolsas concedidas.

Referências

- [1] MARTINS, Manuel A.; TRINDADE, Tito. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 35, n. 7, p. 2 - 28 2012.
- [2] BUZEA, C.; PACHECO, II; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, v. 2, n. 4, p. 17-71, 2007.
- [3] CASANOVA, Monise Cristina Ribeiro. Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis. 2010. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- [4] MATOS, Ricardo Almeida de. Síntese verde de nanopartículas de prata e de ouro. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química). Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema, 2011.
- [5] SCHAFFAZICK, Scheila Rezende; GUTERRES, Sílvia Stanisçuaski; FREITAS, Liane de Lucca and [6] POHLMANN, Adriana Raffin. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quím. Nova* [online]. 2003, vol.26, n.5, pp. 726-737. ISSN 0100-4042.
- [6] POLIAKOFF, M. et al. Green chemistry: Science and politics of change. *Science*, v. 297, n. 5582, p.807-810, 2002.
- [7] C. Peng, Y. Li, H. Liang, J. Cheng, Q. Li, X. Sun, Z. Li, F. Wang, Y. Guo, Z. Tian, L. Yang, Y. Tian, Z. Zhang, and W. Cao, "Detection and photodynamic therapy of inflamed atherosclerotic plaques in the carotid artery of rabbits," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 102, 26-31 (2011).
- [8] M. Nascimento da Silva, L. B. Sicchieri, F. Rodrigues de Oliveira Silva, M. F. Andrade, and L. C. Courrol. Liquid biopsy of atherosclerosis using protoporphyrin IX as a biomarker. *Analyst*, v. 139, p. 1383-1388, 2013.
- [9] Z. Mohammadi, A. Sazgarnia, O. Rajabi, S. Soudmand, H. Esmaily, and H. R. Sadeghi, "An in vitro study on the photosensitivity of 5-aminolevulinic acid conjugated gold nanoparticles," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 10, 382-388 (2013).