

SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO FUNCIONALIZADAS COM ÁCIDO AMINOLEVULÍNICO E LASER DE PULSOS ULTRACURTOS

Karina de Oliveira Gonçalves¹, Mônica Nascimento da Silva¹, 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. As diferenças de tamanho, forma e propriedades de superfície, fazem com que suas aplicações se tornem versáteis, como por exemplo, a terapia fototérmica e o rastreamento de tumores (biomarcadores). Foi recentemente demonstrado na literatura que a incorporação de nanopartículas de ouro na estrutura do ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) melhora as propriedades fotodinâmicas do fármaco. O estudo com laser ocorreu visando à possibilidade de modificação no formato das nanopartículas, de esféricas para outras formas, entre elas bastões e prismas que resultam em bandas de plasmons de comprimentos de onda maiores, uma vez que nanopartículas com formato mais cilíndrico apresentam uma janela na região da janela óptica do tecido biológico e desta forma a luz aplicada em PDT teria maior profundidade de penetração no tecido. Assim propomos neste estudo, sintetizar nanopartículas de ouro com 5-ALA, para realizar o diagnóstico e a terapia (Teranóstica) de doenças com crescimento não controlável, de uma forma mais simples, menos invasiva e mais barata.

Palavras-chave: Nanopartículas de ouro, Terapia Fototérmica, Aterosclerose.

Abstract: *Gold nanoparticles have numerous applications in medicine. The differences in size, shape and surface properties make their applications becoming versatile, for example, photothermal therapy and tracing tumors (biomarkers). It has recently been demonstrated in the literature that incorporation of gold nanoparticles in the structure of 5-aminolevulinic acid (5-ALA) improves the photodynamic properties of the drug. The study laser was aimed at the possibility of change in nanoparticle form, spherical to other shapes, including rods and prisms, resulting in plasmon bands at longer wavelengths, since nanoparticles more cylindrical shape presenting a window in the optical window region of the biological tissue and thus the light applied to PDT have greater depth of penetration into the tissue. Thus we propose in this study, synthesizing gold nanoparticles with 5-ALA, to perform diagnosis and therapy (Teranóstica) diseases of uncontrollable growth, a simpler, less invasive and cheaper.*

Keywords: *Gold nanoparticles, Photothermal Therapy, Atherosclerosis.*

Introdução

Nas últimas décadas, o interesse nas áreas de Nanotecnologia 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 recentemente³. 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 humana⁴.

A síntese de nanopartículas de ouro, com a utilização da fonte de Xenônio, do ácido 5 - aminolevulínico (5-ALA) e do polietilenoglicol (PEG), faz com que elas se tornem orgânicas e biocompatíveis, tendo grandes aplicações na área médica, já que o 5-ALA é empregado como pró-fármaco, pois é o precursor da protoporfirina IX (PPIX), que pode se acumular nos tecidos em rápido crescimento, incluindo tumores e placas ateroscleróticas⁵.

Peng C. e colaboradores⁶ mostraram recentemente que após administração intravenosa de 5-ALA, em coelhos submetidos à dieta hipercalórica, é possível se detectar fluorescência da PPIX na placa de ateroma, com intensidade de fluorescência 12 vezes maior que o grupo controle. 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 biossensor⁷. Observou-se também que aplicação concomitante de 5-ALA com nanopartículas de ouro exerce um efeito cooperativo elevando a formação de espécies reativas de oxigênio aumentando a potencialidade como agente fotossensibilizador⁸.

Materiais e métodos

Reagentes e equipamentos

Para a síntese das nanopartículas de ouro, utilizou-se o tetracloroaurato de hidrogênio (HAuCl₄) da Sigma-Aldrich, água bideionizada, ácido 5-aminolevulínico (5-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, uma lâmpada de xenônio Cermax de 400 Watts e sistema de laser de Ti:Safira (Quantronix Odin bombeado por um laser Coherent Mira-Seed-R). Os pulsos foram

centrados em 800 nm, com duração temporal de 80 a 150 femtossegundos (FWHM), e taxa de repetição de 1 kHz.

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, e o tempo de iluminação foram estudados, até que se obteve o melhores valores para a síntese. Para a formação de nanobastões, utilizou-se a solução de nanopartículas, que foram irradiadas com pulsos ultracurtos em um sistema de laser de Ti:Safira.

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.

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.

Resultado Obtidos

Em testes iniciais, verificou-se que se adicionando HAuCl_4 e 5-ALA em solução aquosa e submetendo-se esta solução à irradiação com lâmpada de xenônio, ocorre uma mudança de cor na solução que é o indicativo de formação de uma solução coloidal. Na figura 1, observa-se picos de absorção em ~ 540 nm devido à SPR (ressonância dos plasmões de superfície), indicando a formação de nanopartículas de ouro.

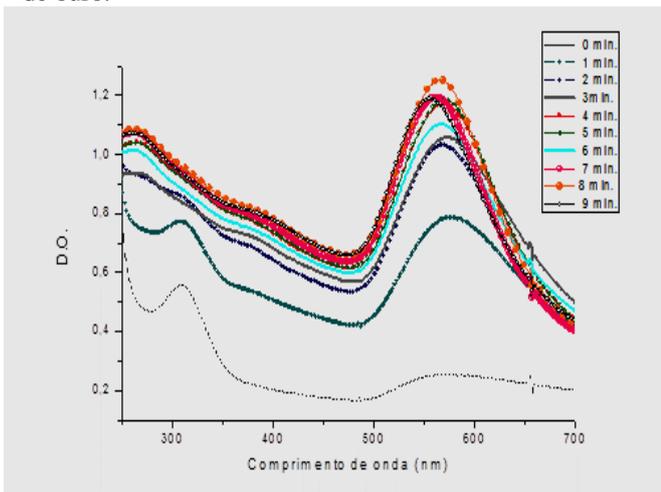


Figura 1: Espectros de absorção das soluções de 5-ALA:AuNPs, com diferentes tempos de iluminação.

O 5-ALA possui os grupos carboxila ($-\text{COOH}$) e amino ($-\text{NH}_2$) em sua estrutura, assim como os aminoácidos. Desta forma os grupos amino e carboxila, são importantes na

estabilização e na redução de metais.

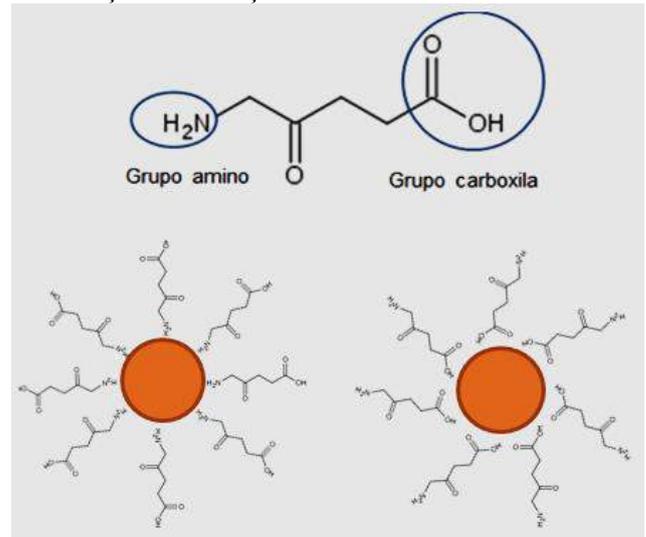


Figura 2: Grupos carboxila e amino da estrutura do 5-ALA e possíveis interações com ouro.

Foram feitos estudos usando o laser, com a intenção de modificar o formato das nanopartículas.

Diferentes parâmetros foram estudados, como tempo de irradiação, energia e duração temporal.

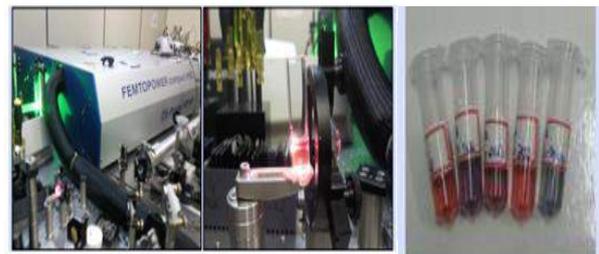
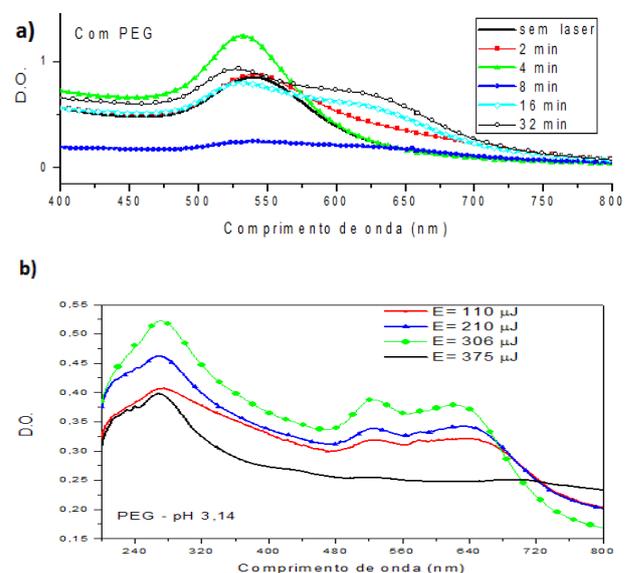


Figura 3: Sistema de irradiação com laser de pulsos ultracurtos e diferentes soluções obtidas.



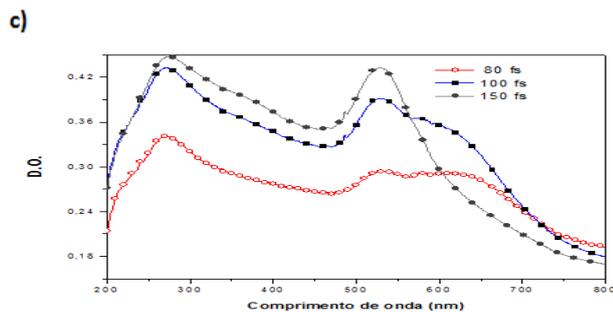


Figura 4: Espectros de absorção das nanopartículas; (a) irradiadas com tempos de 0 a 32 minutos; (b) com variação de energia do laser; (c) diferentes valores de duração temporal (laser: 800 nm, taxa de repetição de 1kHz).

Foram feitas as microscopias eletrônicas de transmissão para as amostras das soluções. Observou-se a formação de partículas esféricas de tamanhos entre 10 e 20 nm, para as soluções que foram iluminadas com a fonte de xenônio somente, e em formato de bastão para as soluções que foram irradiadas com laser de pulsos ultracurtos.

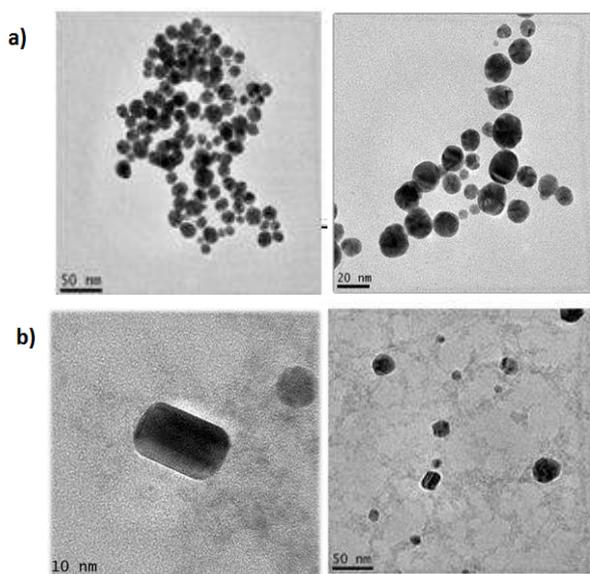


Figura 5: (a) Microscopia eletrônica no MET da solução de 5-ALA:AuNPs em formato esférico, (b) 5-ALA:AuNPs irradiadas com laser de pulso ultracurto.

Discussão

Os resultados apresentados mostram a síntese verde de nanopartículas de ouro com 5-ALA e PEG.

O uso do laser de pulsos ultracurtos levou a formação de nanopartículas de formato de bastões.

A focalização do laser gera uma camada de vapor ao redor do plasma, que esmaece resultando em uma mudança brusca de temperatura local, seguida do aumento da camada de vapor e a formação de bolhas de cavitação. As bolhas de cavitação colapsam e nanopartículas menores são liberadas no líquido.

Imediatamente após a ablação, as partículas menores se aderem formando partículas maiores (*ripening*), que leva a formação dos bastões.

Conclusão

A síntese verde de nanopartículas de ouro utilizando o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), PEG e a luz, foi possível. A iluminação com luz branca de xenônio, foi fundamental para a formação de nanopartículas, pois a luz aquece e fornece fótons à solução.

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. Sem a presença do polietilenoglicol, o $[\text{Au}(\text{OH})_4]^-$ domina a especiação, o processo de nucleação prossegue lentamente e as nanopartículas tendem a ser maiores. Quando o PEG é incorporado à solução de 5-ALA:Au, atua como um microambiente facilitador do transporte de cargas.

O uso do laser de pulsos ultracurtos foi importante para a modificação do formato das nanopartículas, pois alguns estudos demonstraram que nanopartículas em formato de bastões, tem absorção na região da janela óptica do tecido biológico e desta forma a luz aplicada em PDT teria maior profundidade de penetração no tecido, melhorando as propriedades fotodinâmicas. As nanopartículas 5-ALA:AuNPs com formato de bastões, podem ser utilizadas para aplicações em terapia fotodinâmica, pois o ouro potencializa a ação do 5-ALA, que já é utilizado como fármaco, e o formato modificado permite que um o comprimento de onda do laser utilizado na PDT seja maior e atinja o tecido.

Agradecimentos

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

Referências

- [1] Martins, Manuel A., and Tito Trindade. "Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico." *Química Nova* 35.7 (2012): 1434-1446.
- [2] Buzea, Cristina, Ivan I. Pacheco, and Kevin Robbie. "Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity." *Biointerphases* 2.4 (2007): MR17-MR71.
- [3] Matos, Ricardo Almeida de. Síntese verde de nanopartículas de prata e de ouro. Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema, 2011.
- [4] Casanova, Monise Cristina Ribeiro. Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com

- polieletrólitos e tióis. Diss. Universidade de São Paulo, 2010.
- [5] Mohammadi, Zahra, et al. "An in vitro study on the photosensitivity of 5-aminolevulinic acid conjugated gold nanoparticles." *Photodiagnosis and photodynamic therapy* 10.4 (2013): 382-388.
- [6] 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).
- [7] 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.
- [8] de Oliveira Gonçalves, Karina, et al. "Aminolevulinic acid with gold nanoparticles: a novel theranostic agent for atherosclerosis." *Analyst* 140.6 (2015): 1974-1980.