

## Desenvolvimento de nanopartículas de ouro fluorescentes para aplicação biomédica

### Design of fluorescent gold nanoparticles for biomedical applications

#### RESUMO

**Denner de Lima Gonçalves**  
[dennergoncalves@alunos.utfpr.edu.br](mailto:dennergoncalves@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

**André Luiz Tessaro**  
[andretessaro@utfpr.edu.br](mailto:andretessaro@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil

O desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos que promovam elevada eficiência terapêutica aliada a efeitos adversos reduzidos é um desafio constante na área biomédica. Assim, plataformas multimodais, que empregam fármacos conjugados, têm sido exploradas para o tratamento de enfermidades. Essa ação visa aumentar a eficiência utilizando-se de fármacos que operam por vias distintas. Uma excelente alternativa é utilizar nanoformulações que respondam a estímulos externos como a luz. Nesse sentido, esse estudo visou o desenvolvimento de nanoplaformas multimodais para aplicação biomédica. O sistema desenvolvido é constituído de nanopartículas de ouro mediadas por copolímero tribloco da classe dos plurônicos. Antes da síntese das nanopartículas de ouro o copolímero F127 foi modificado, covalentemente, com a sonda fluorescente 5(6) carboxifluoresceína para fins de diagnóstico. O copolímero modificado, F127-CF, foi sintetizado com êxito via reação de esterificação e apresentou elevado rendimento quântico de fluorescências ( $\Phi_F = 0,60$ ), credenciando-o como agente de imagem. Posteriormente, esse material foi usado para a obtenção das nanopartículas de ouro, as quais apresentaram diâmetro hidrodinâmico ao redor de 40nm e elevada estabilidade em solução (7 dias). O sistema desenvolvido será futuramente otimizado e testado considerando seu efeito fototérmico, assim como sua capacidade de encapsular agentes fotossensíveis.

**Recebido:** 19 ago. 2020.  
**Aprovado:** 01 out. 2020.

**PALAVRAS-CHAVE:** Nanopartículas de ouro. Plurônicos. Carboxifluoresceína. Sistema multimodal.

**Direito autoral:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.

#### ABSTRACT

The development of drug delivery systems that promote high therapeutic efficiency combined with reduced adverse effects is a constant challenge in the biomedical area. Thus, multimodal platforms, which use conjugated drugs, have been explored for the treatment of diseases. This action aims to increase efficiency using drugs that operate in different ways. An excellent alternative is to use nanoformulations that respond to external stimuli such as light. In this sense, this study aimed at the development of multimodal nanoplaforms for biomedical application. The developed system consists of gold nanoparticles mediated by triblock copolymer of the pluronic class. Before the synthesis of the gold nanoparticles, the F127 copolymer was modified, covalently, with the 5 (6) carboxyfluorescein fluorescent probe for diagnostic purposes. The modified copolymer, F127-CF, was successfully synthesized via the esterification reaction and showed high quantum fluorescence yield ( $\Phi_F = 0.60$ ), accrediting it as an imaging agent. Subsequently, this material was used to obtain gold nanoparticles, which had a hydrodynamic diameter around 40 nm and high stability in solution (7 days). The developed system will be further optimized and tested considering its photothermal effect, as well as its ability to encapsulate photosensitive agents.

**KEYWORDS:** Gold nanoparticles, pluronic, carboxyfluorescein, multimodal system.



## INTRODUÇÃO

Com os recentes avanços da nanotecnologia o desenvolvimento de novos materiais aplicados à área biomédica tem causado grande impacto no diagnóstico e tratamento de diversas enfermidades MURA et al. (2013, 12, 991-1003); SORTINO (2012, 22, 301-318); WICKI et al. (2015, 200 138–157). Um dos maiores desafios é o desenvolvimento de materiais capazes de liberar agentes ativos de forma controlada e específica, aliando alta eficiência terapêutica a efeitos colaterais reduzidos. Uma excelente alternativa é utilizar nano formulações que respondam a estímulos externos, como por exemplo, a luz. Além de ser prontamente disponível, facilmente manipulável e promover reações fotoquímicas/fotofísicas rápidas, a luz apresenta como vantagem adicional a não interferência a parâmetros fisiológicos SORTINO (2012, 22, 301-318; 16) SORTINO (2010, 39, 2903-2913).

As AuNPs tem sido amplamente explorada devido as suas propriedades particulares, tais como, distribuição de tamanhos, morfologia, funcionalização de superfície e efeito fototérmico BARROS et al (2016, p. 9411–9420). Dentre os diversos métodos de obtenção destas nanopartículas a síntese verde tem recebido muita atenção. O método utilizado neste trabalho foi a síntese com o surfactante polimérico tribloco, especialmente os Plurônicos SAKAI et al (2013, 394, 124–131). Estes materiais são constituídos de dois blocos de polioxietileno (PEO), situados nas extremidades e um bloco central de polioxipropileno (PPO). Em água se autoassociam formando micelas constituídas por estruturas tipo “core-shell”. A utilização dos plurônicos é vantajosa uma vez que não requer a adição de agentes redutores para a síntese das AuNPs, o próprio copolímero atua na redução e estabilização das mesmas. Adicionalmente, devido aos grupos presentes nas suas extremidades esses materiais são susceptíveis a modificações via ligação química, como por exemplo, sua funcionalização com 5(6) –caroxifluoresceína (CF), usada como agente de imagem.

Nesse sentido o objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de nanoplateforma multimodal para aplicações biomédicas. Particularmente busca-se o desenvolvimento de um sistema híbrido, constituído de nanopartículas de ouro (AuNP) mediadas por polímero modificado com agente de imagem para posterior encapsulamento de um fotossensibilizador.

## METODOLOGIA

A modificação do F127 com a CF foi realizada via reação de esterificação utilizando-se cloridrato de 1- [3- (dimetilamino) propil] -3-etilcarbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS) como ativadores de carbonila. OLIVEIRA et al (2020). Resumidamente, CF (0,11 mmol) seguida de EDC (0,14 mmol) e NHS (0,14 mmol) foram adicionados em dimetilformamida (DMF) seco, mantidos sobre agitação em temperatura ambiente e atmosfera inerte por 1 h. Paralelamente, F127 (0,08 mmol) e N, N-Diisopropiletilamina (DIPEA, 0,24 mmol) foram adicionados em DMF e mantidos sob agitação a temperatura ambiente por 1 h. Após, a solução de F127 foi adicionada a mistura inicial, gota-a-gota, por 1 h seguida de vigorosa agitação em temperatura ambiente por 48 h. Finalmente, éter dietílico gelado foi adicionado para precipitação do produto seguido de lavagem e secagem. O produto foi diluído em água milli-Q e purificado por diálise. O F127

fluoresceinizado, nomeado como F127-CF foi caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H, Bruker avance III HD, operando em 300 MHz) e espectrofotometria de absorção UV-Vis (Cary 60, Agilent Technologies).

O rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_F$ ) do F127-CF foi determinado usando a fluoresceína como padrão ( $\Phi_P$ ) = 0,92, em meio ligeiramente básico MAGDE et al (2002, p.75:327–334). Os valores foram calculados com o auxílio da Eq. 1:

$$\Phi_{CF} = \frac{Abs_P F_{CF} n_P^2}{Abs_{CF} F_P n_{CF}^2} \Phi_P \quad (1)$$

Onde Abs é a absorvância no comprimento de onda de excitação, F é a área do espectro de fluorescência e n é índice de refração do meio. Os subscritos P e CF referem-se, respectivamente, ao padrão e a 5(6) -carboxifluoresceína.

A síntese das AuNPs foi baseada na metodologia proposta por Sakai e colaboradores SAKAI et al (2013, 394, 124–131) adaptada para o método de dispersão sólida ZHANG et al (1996, 132, 195–206). 10 mg do copolímero (conforme tabela 1) foram solubilizados em 10mL de etanol seguida da adição de 80  $\mu$ L de solução estoque de HAuCl<sub>4</sub>.xH<sub>2</sub>O (0,001 mol L<sup>-1</sup>). Após a completa solubilização a mistura foi submetida à evaporação rotativa para a formação do filme fino, o qual permaneceu 24 h, sob vácuo, para remoção de traços de solvente. Por fim os filmes foram hidratados com 10mL tampão fosfato ([PBS]= 0, 015 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4) e mantido sob agitação por 3 horas a 45 °C.

Tabela 1 – Massa de copolímero utilizada em cada nanopartícula

Nanopartículas	P123 (mg)	F127 (mg)	F127-F(mg)
1	3,3	5,0	1,7
2	3,3	6,7	-
3	-	10	-
4	-	7,5	2,5

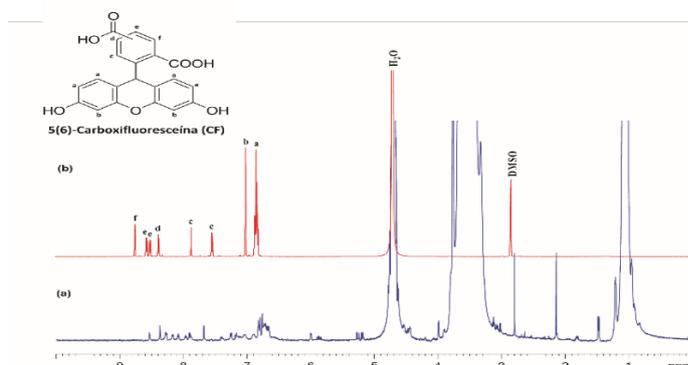
Fonte: Autoria própria (2020).

As nanopartículas sintetizadas foram caracterizadas por espectrofotometria UV-Vis, espalhamento dinâmico de Luz (DLS,) e potencial zeta (NanoPlus Particle Size Analyzer, Particulate Systems Ltd).

#### RESULTADOS E DISCUSSÕES

A síntese do F127-CF rendeu um sólido amarelado o qual foi purificado por diálise diversas vezes (controlado via fluorescência). O produto foi seco e submetido a análise de RMN <sup>1</sup>H (Figura 1) a qual confirmou o sucesso da síntese. Como pode ser observado na Figura 1B, além dos sinais dos hidrogênios dos grupos PEO (~3,6 ppm) e dos grupos PPO (3,5 e 1,1 ppm), os sinais dos hidrogênios da 5(6)-carboxifluoresceína são observados acima 6,5 ppm. Ressalta-se que esta sonda fluorescente é uma mistura dos isômeros 5 e 6, portanto os sinais dos hidrogênios aromáticos (c e e) aparecem duplicados.

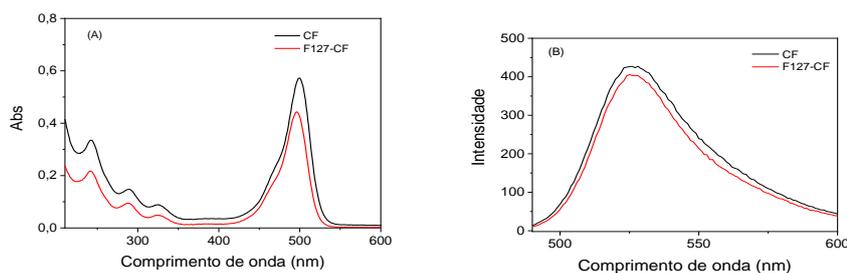
Figura 1. Espectros de RMN de <sup>1</sup>H (A) do copolímero modificado F127-CF em D<sub>2</sub>O e (B) da 5(6)-carboxifluoresceína em DMSO deuterado



Fonte: Autoria própria (2020).

Antes da utilização do polímero para a produção das nanopartículas o rendimento quântico de fluorescência da CF covalentemente ligado ao F127 foi avaliado (Figura 2).

Figura 2- Espectros de (A) absorvância e (B) fluorescência para os ensaios de rendimento quântico fluorescência.



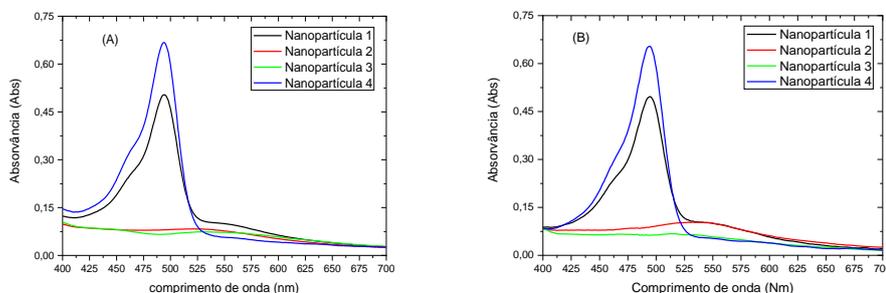
Fonte: Autoria própria (2020).

A figura 2 apresenta os espectros de absorção (Figura 2A) e emissão de Fluorescência (Figura 2B) da CF livre e covalentemente ligada ao F127, indicando que a funcionalização não alterou, significativamente, suas propriedades espectrais. O rendimento quântico de fluorescência do F127-CF foi de 0,60 provando mais uma vez que as propriedades emissivas da sonda fluorescente foram preservadas, o que permite a utilização da mesma para fins de diagnóstico.

De posse do polímero modificado o mesmo foi utilizado para a síntese das AuNPs. Inicialmente foram preparadas quatro nanopartículas de acordo com a tabela 1. As nanopartículas 1 e 2 trabalhou-se com uma mistura de P123/F127 na proporção de 1:2, nos quais foram avaliados a presença ou não do F127-CF na mistura. O mesmo procedimento foi adotado nas nanopartículas 3 e 4, os quais foram preparados com F127 e F127/F127-CF (tabela 1). Os espectros ilustrados na figura 3A indicam a formação das nanopartículas de ouro em todas as soluções preparadas imediatamente após a hidratação, identificados pela formação da banda plasmônica na região compreendida entre 470 a 650nm. A formação da banda é discreta principalmente quando comparado à intensa banda de absorção da CF. Entretanto, após 24 horas observa-se uma pequena evolução na intensidade das bandas plasmônicas, principalmente para as nanopartículas formadas pela mistura de P123/F127 (nanopartícula 1 e 2, Figura 3B). O FWHM (do inglês *full width at half maximum*) foi de 45,1nm e 41,9nm, respectivamente para

nanopartículas 1 e 2. Embora se observe banda plasmônica nas nanopartículas 2 e 4 não foi possível a determinação do FWHM para os mesmos.

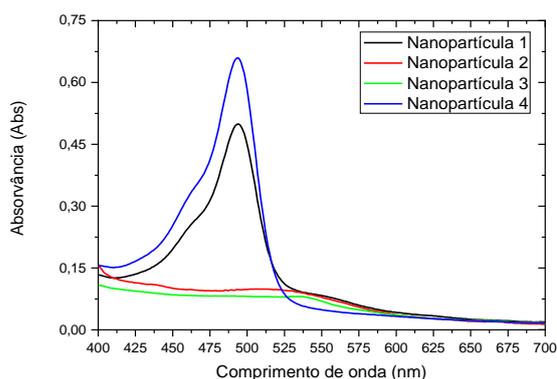
Figura 3-Absorbância da solução feita no UV-Vis imediatamente após a hidratação das nanopartículas (A) e 24 horas após (B)



Fonte: Autoria própria (2020).

As nanopartículas permaneceram estáveis em solução por um período de 7 dias (Figura 4). Após esse período, mesmo não apresentando alterações significativas nos espectros, as soluções fungaram e deixaram de ser avaliadas.

Figura 4. Espectros de absorção realizados 7 dias após a hidratação.

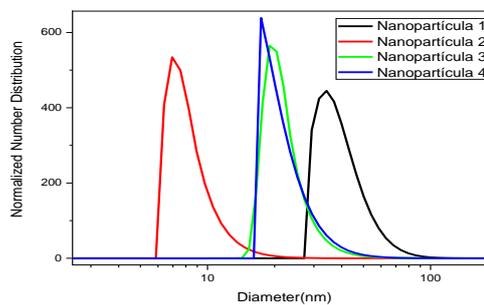


Fonte: Autoria própria (2020).

#### Análises de tamanho e potencial zeta

O tamanho e o potencial zeta das nanopartículas foram analisados por espalhamento de luz dinâmico. Os diâmetros hidrodinâmicos ( $D_H$ ) encontram-se ilustrados na figura 5, sendo 35, 20, 20 e 10nm, respectivamente, para as nanopartículas 1, 2, 3 e 4. Esses valores são condizentes com os valores de FWHM calculados inicialmente considerando as técnicas utilizadas. Os potenciais zeta ilustrados na tabela 2 e Figura 6 corroboram com a estabilidade observada em solução. Os potenciais ligeiramente negativos, associados aos grupos de polioxietileno das extremidades dos copolímeros, permitem a estabilidade das partículas em solução. Surpreendentemente o potencial zeta das nanopartículas 2 foram positivos, fato provavelmente associado a um erro no pH do tampão PBS.

Figura 5 - Distribuição de tamanho



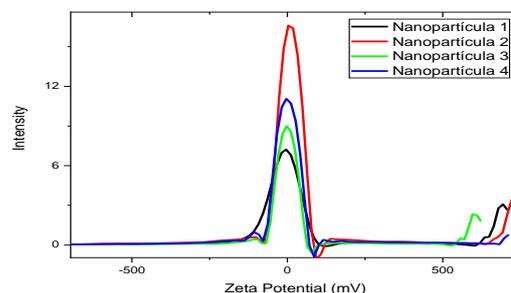
Fonte: Autoria própria (2019).

Tabela 2 - Potencial Zeta dos filmes

ITEM	POTENCIAL (mV)	MOBILITY (cm <sup>2</sup> /VS)
FILME 1	-7,63	-5,95x10 <sup>-05</sup>
FILME 2	9,32	7,27x10 <sup>-05</sup>
FILME 3	-1,31	-1,03x10 <sup>-05</sup>
FILME 4	-0,65	-5,03x10 <sup>-06</sup>

Fonte: Autoria própria (2019).

Figura 6 - Potencial Zeta dos filmes



Fonte: Autoria própria (2019).

## CONCLUSÕES

O objetivo inicial do trabalho era sintetizar nanopartículas de ouro mediadas por copolímero modificado visando o posterior encapsulamento de um agente fotossensível para fins fotodinâmicos, isto é, um sistema multimodal que englobasse, além do efeito fotodinâmico (Fotossensibilizador) e térmico (AuNP), capacidade diagnóstica (CF). A síntese do F127-CF foi realizada como planejado e com êxito. A síntese das nanopartículas, embora tenha sido realizada com êxito, não foi otimizada como previsto. As etapas subsequentes do trabalho foram prejudicadas pelas medidas de prevenção e contenção da pandemia do SARS-CoV-2. Apesar do exposto, o material obtido até o momento apresenta característica desejáveis para a incorporação do fotossensibilizador e futuro ensaio com células.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Fundação Araucária pro seu apoio financeiro ao longo de toda a pesquisa e a Universidade Tecnológica Federal do Paraná-Campus Apucarana por ter cedido o local para a pesquisa, agradeço também a todos que de alguma forma me auxiliaram durante toda a pesquisa. Pesquisa desenvolvida com o auxílio do LAMAP – Laboratórios Multiusuário de Apoio à Pesquisa do Câmpus Apucarana.

## REFERÊNCIAS

BARROS, H, R; CARDOSO, M, B; OLIVEIRA, C, C; FRANCO, C, R, C; BELAN, D, L; VIDOTTI, M; RIEGEL-VIDOTTI, I, C. **Stability of gum arabic-gold nanoparticles in physiological simulated pHs and their selective effect on cell lines.** RSC Adv., v. 2016 6, p. 9411–9420.

MAGDE D, WONG R, SEYBOLD P.G. **Fluorescence quantum yields and their relation to lifetimes of rhodamine 6G and fluorescein in nine solvents: improved absolute standards for quantum yields.** Photochem Photobiol. 2002 75:327–334.

MURA, S; NICOLAS, J; COUVREUR, P; **Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery.** Nature Mater. 2013, 12, 991-1003.

OLIVEIRA, DAPHNE, C, S; FREITAS, CAMILA, F; CALORI, ITALO, R; Goncalves, RENATO, S; Cardinali, CAMILA, A, E, F; MALACARNE, LUIS, C; SPEZIALI, MARIA I, B, R; OLIVEIRA, HUEDER, P, M; TEDESCO, ANATONIO, C; CAETANO, WILKER; HIOKA, NOBURU; TESSARO, ANDRE, L. **THERANOSTIC VERTEPORFIN- LOADED LIPID-POLYMER LIPOSOME FOR PHOTODYNAMIC APPLICATIONS.** Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, Volume 212, 2020, 112039, ISSN 1011-1344, Disponível em:< <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112039>>.

SAKAI, T; HORIUCHI, Y; ALEXANDRIDIS, P; OKADA, T; MISHIMA, S. **Block copolymer-mediated synthesis of gold nanoparticles in aqueous solutions: Segment effect on gold ion reduction, stabilization, and particle morphology.** J. Colloid Interface Sci. 2013, 394, 124–131.

SORTINO, S. **Photoactivated nanomaterials for biomedical release applications.** J. Mater. Chem. 2012, 22, 301-318; 16.

SORTINO, S. **Light-controlled nitric oxide delivering molecular assemblies.** Chem. Soc. Rev. 2010, 39, 2903-2913.

WICKI, A; WITZIGMANN, D; BALASUBRAMANIAN, V; HUWYLER, J. **Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications.** J. Control. Release 2015, 200 138–157.

ZHANG, X; JACKSON, J, K; BURT, H, M. **Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol.** Int. J. Pharm. 1996, 132, 195–206.