

# Síntese e caracterização bioinspirada de partículas superparamagnéticas

## Bioinspired synthesis and characterization of superparamagnetic particles

Vinícius F. Castro<sup>1</sup> e Alvaro A. A. Queiroz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI) – Itajubá (MG), Brasil.

<sup>2</sup>Centro de Estudos e Inovação em Materiais Biofuncionais Avançados/UNIFEI – Itajubá (MG), Brasil.

### Resumo

Esse trabalho aborda a síntese bioinspirada de ferritas do tipo YFeAl encapsuladas em dendrímeros de poliglicerol (PGLD) de geração 3. A estrutura e as propriedades morfológicas do sistema YFeAl/PGLD foi caracterizado por difração de raios-X (DRX) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). As propriedades magnéticas foram estudadas através das técnicas de magnetização e espectroscopia Mössbauer. A citotoxicidade das nanopartículas encapsuladas nos dendrímeros PGLD G3 no nível de membrana celular foi estudada contra células de mamíferos da linhagem CHO.K1, medindo-se quantidade de lactato desidrogenase (LDH) liberado pelo dano celular. A microscopia MET e a análise DRX indicam que foram obtidas nanopartículas esféricas altamente cristalinas e monodispersas com tamanho  $20\text{ nm} < d < 100\text{ nm}$ . A espectroscopia Mössbauer e o estudo da magnetização das nanopartículas frente a um campo magnético indicaram comportamento superparamagnético do sistema YFeAl/PGLD. Os resultados de citotoxicidade indicaram que o nanossistema YFeAl/PGLD é adequado para utilização em nanomedicina.

**Palavras-chave:** neoplasias, dendrímeros, nanopartículas.

### Abstract

This paper discusses the bioinspired synthesis of type YFeAl ferrites encapsulated into polyglycerol dendrimers (PGLD) generation 3. The structure and morphological properties of the system YFeAl/PGLD was characterized by X-ray diffraction (XRD) and transmission electron microscopy (TEM). The magnetic properties were studied through the techniques of Mössbauer spectroscopy and magnetization. The cytotoxicity of the nanoparticles encapsulated in dendrimers PGLD G3 at the cell membrane was studied against mammalian cell line CHO.K1 measuring the amount of lactate dehydrogenase (LDH) released by the cell damage. Microscopy TEM and XRD analysis indicate that spherical nanoparticles were obtained highly crystalline and monodisperse with size  $20\text{ nm} < d < 100\text{ nm}$ . Mössbauer spectroscopy analysis and study of magnetization of the nanoparticles compared to a magnetic field indicated superparamagnetic behavior of the system YFeAl/PGLD. The cytotoxicity results indicated that YFeAl / PGLD nanosystem is suitable for use in nanomedicine

**Keywords:** neoplasms, dendrimers, nanoparticles.

### Introdução

A aplicação da nanotecnologia na área da saúde proporcionou o surgimento nesse século da nanomedicina, as ciências médicas que utilizam materiais na escala de dimensão inferior a 100 nm e que atuam em nível subcelular e elevada especificidade no nível da biologia molecular. Uma especial atenção tem sido dada a nanopartículas magnéticas de tamanho inferior a 35 nm que exibem propriedades superparamagnéticas ou àquelas que possuem tamanho

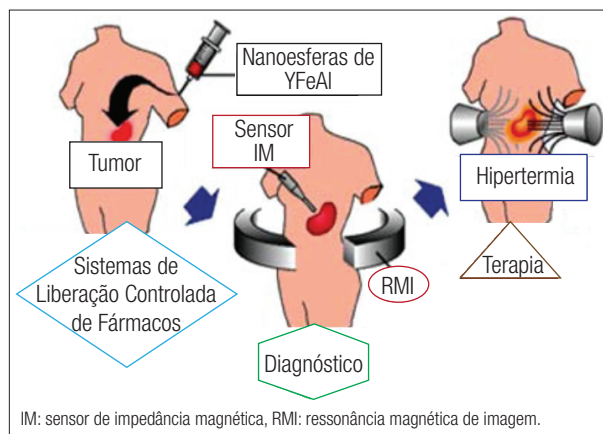
entre 100 nm que exibem um momento magnético estável na presença de um campo magnético externo.

Recentemente nossos estudos demonstraram as propriedades superparamagnéticas de nanopartículas ( $20\text{ nm} < d < 100\text{ nm}$ ) de óxidos mistos de ferro (Fe), ítria (Y) e alumínio (Al) de estequiometria controlada e encapsulada em matriz polimérica biocompatível [1-2]. As nanoesferas transportadoras do óxido de ferro superparamagnético (YFeAl) encontram múltiplas aplicações na nanomedicina, que se estendem desde o diagnóstico de diversas

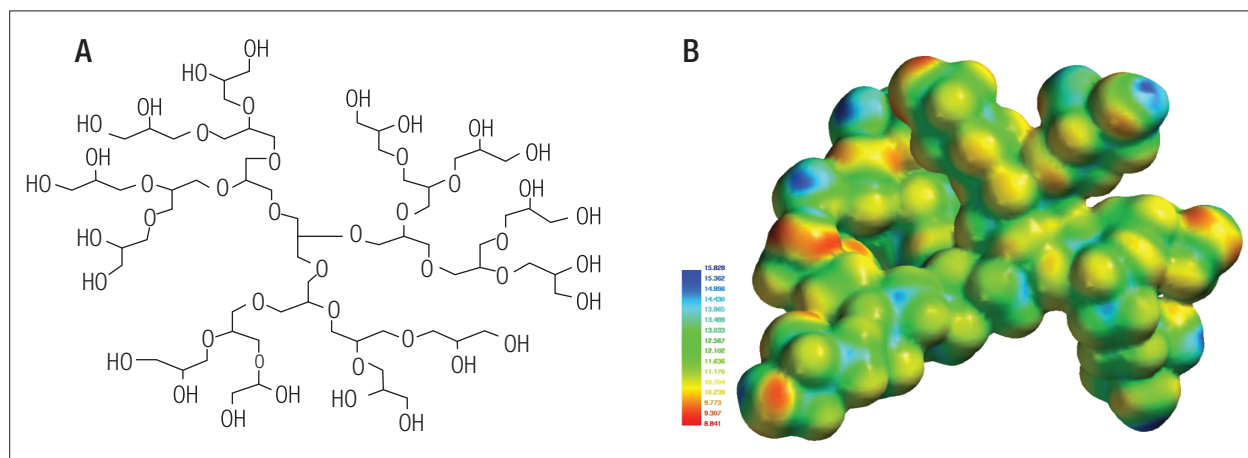
enfermidades que afligem a espécie humana nesse século a exemplo das neoplasias malignas (Figura 1).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para a obtenção de nanopartículas magnéticas, sendo as metodologias que envolvem a utilização dos sistemas micelares as mais promissoras uma vez que tais sistemas permitem a obtenção de nanopartículas com baixo índice de polidispersão [1-2]. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi a obtenção de nanopartículas magnéticas através da utilização de dendrímeros de poliglicerol (PGLD) como sistema mimetizante dos sistemas micelares biológicos. O PGLD é uma macromolécula orgânica, sintética, cuja estrutura 3D mimetizante das proteínas globulares possui cavidades internas que permitem a obtenção de nanopartículas monodispersas (Figura 2).

Nossos estudos, empregando métodos de primeiros princípios, indicam que o PGLD possui cavidades dentro do intervalo  $0,5 \text{ nm} < d < 10 \text{ nm}$  e orbitais de fronteira que podem propiciar a obtenção de nanopartículas superparamagnéticas de YFeAl. Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi a obtenção de partículas superparamagnéticas de YFeAl bioinspirados nas proteínas globulares.



**Figura 1.** Ilustração das principais aplicações das nanoesferas transportadoras de YFeAl [2].



**Figura 2.** Ilustrações da estrutura química do PGLD G3 (A) e de sua superfície equipotencial (B) demonstrando sua estrutura globular.

## Material e Métodos

O dendrímero de PGLD foi sintetizado em nosso laboratório, utilizando a reação de Williamson modificada e caracterizado por ressonância magnética nuclear de prótons e carbono de acordo com nossas publicações anteriores<sup>1</sup>. O encapsulamento de nanopartículas de YFeAl nas cavidade do PGLD foi promovida após mistura dos íons  $Y^{+3}$ ,  $Fe^{+3}$  e  $Al^{+3}$  com o dendrímero em solvente orgânico. Após a reação de coordenação os íons metálicos sofreram redução, formando nanopartículas metálicas de YFeAl nas cavidades dendríticas (Figura 3).

A fim de se caracterizar as fases cristalinas, as nanopartículas de YFeAl foram caracterizadas por difratometria de RX (difratômetro Bruker AXS D8 ADVANCE, operando a 40 kV e 20 mA, com radiação  $K\alpha$  de cobre de  $\lambda = 0,154 \text{ nm}$  e com uma matriz de detectores SOLX funcionando em modo contínuo). O tamanho do cristal a partir do difratograma foi calculado através da equação de Scherrer<sup>2</sup>.

O tamanho e a forma das nanopartículas foram determinados através da microscopia eletrônica de transmissão (MET). As imagens MET foram obtidas com um microscópio JEOL 2000 FX, operando a 200 KV.

Os espectros de transmissão Mössbauer do isótopo de  $^{57}Fe$  foram obtidos em um espectrômetro convencional de aceleração constante com uma fonte do isótopo  $^{57}Co$  imerso em uma matriz de Rh.

As medidas magnéticas foram feitas em um magnetômetro de amostra vibrante MLVSM9, MagLab 9T, Oxford Instruments. Os valores da magnetização de saturação (Ms) e campos coercitivos (HC), foram obtidos a partir das curvas de magnetização saturadas a 5 Teslas. As medidas de susceptibilidade com campo alternado foram feitas em um magnetômetro comercial Lake Shore 7020, com um campo aplicado de 2 Oe a frequências de 10 Hz, 100 Hz, 500 Hz, 1000 Hz em um intervalo de temperaturas desde 5 K a temperatura ambiente.

A citotoxicidade das nanopartículas encapsuladas nos dendrímeros PGLD no nível de membrana celular foi estudada contra células de mamíferos da linhagem CHOK1

medindo-se espectrofotometricamente a quantidade de lactato desidrogenase (LDH) liberado pelo dano celular a 340 nm. O consumo de NADH, medido cineticamente no sobrenadante da suspensão celular após incubação com o sistema YFeAl/PGLD foi correlacionado com a quantidade de LDH liberada. A viabilidade celular é inversamente proporcional à quantidade de LDH liberada.

## Resultados

A Figura 4A mostra o DRX das nanopartículas obtidas. O difratograma evidencia a obtenção de nanopartículas de YFeAl de elevadas cristalinidade e pureza.

As micrografias MET indicaram a formação de nanopartículas de YFeAl no intervalo de 15 a 30 nm (Figura 4B). As nanopartículas obtidas são bem dispersas e com formato esférico.

O espectro Mössbauer de  $^{57}\text{Fe}$  à temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ) das nanopartículas de YFeAl é mostrado na Figura 5A. Os espectros exibem linhas muito largas e assimétricas que indicam a presença de fenômenos de

relaxação magnética. O espectro Mössbauer obtido se ajusta a um dubleto quadrupolar que se associa a uma fração de partículas de espinélio com tamanho de partículas suficientemente pequeno para exibir comportamento superparamagnético à temperatura ambiente.

Na Figura 5B são mostradas as curvas de magnetização frente ao campo magnético. É observada relaxação superparamagnética (remanência nula), não sendo observada histerese. Ao mesmo tempo, nota-se claramente na Figura 5B que à temperatura ambiente (temperatura na qual se utilizam os agentes de contraste) e a campos baixos o comportamento magnético é dominado pela nanoferrita.

A atividade da enzima intracelular lactato desidrogenase (LDH) foi medida em sobrenadante isento de células. A Figura 6 mostra a viabilidade celular das nanopartículas de YFeAl encapsuladas no dendrímero PGLD contra células CHO. A citotoxicidade das nanopartículas de YFeAl encapsuladas no PGLD pode ser avaliada através da quantificação da enzima intracelular lactato desidrogenase (LHD) que é rapidamente liberada das células danificadas para o sobrenadante da cultura de células. Como pode

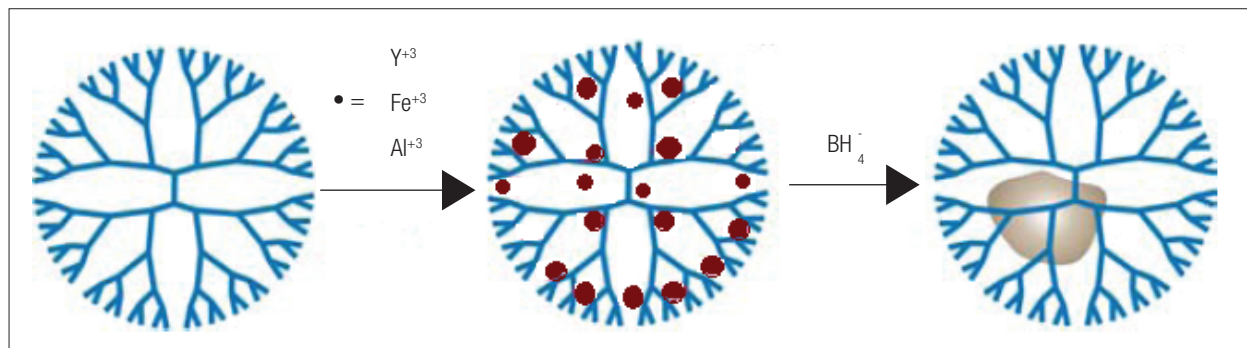


Figura 3. Ilustração do processo de formação de nanopartículas de YFeAl nas cavidades do dendrímero de dendrímeros de poliglicerol.

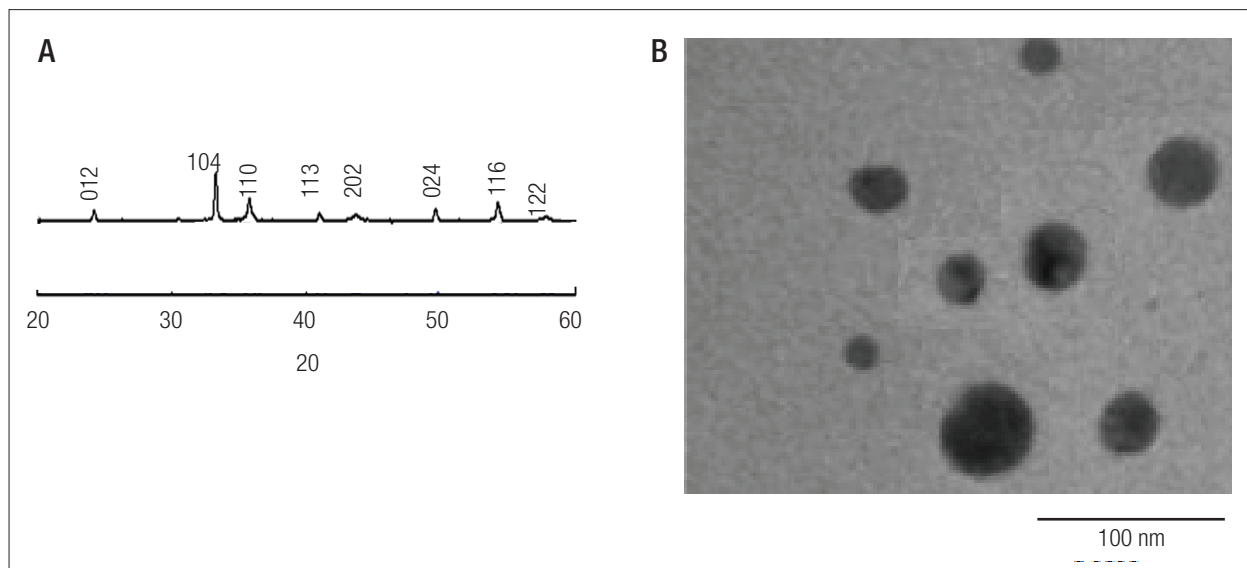
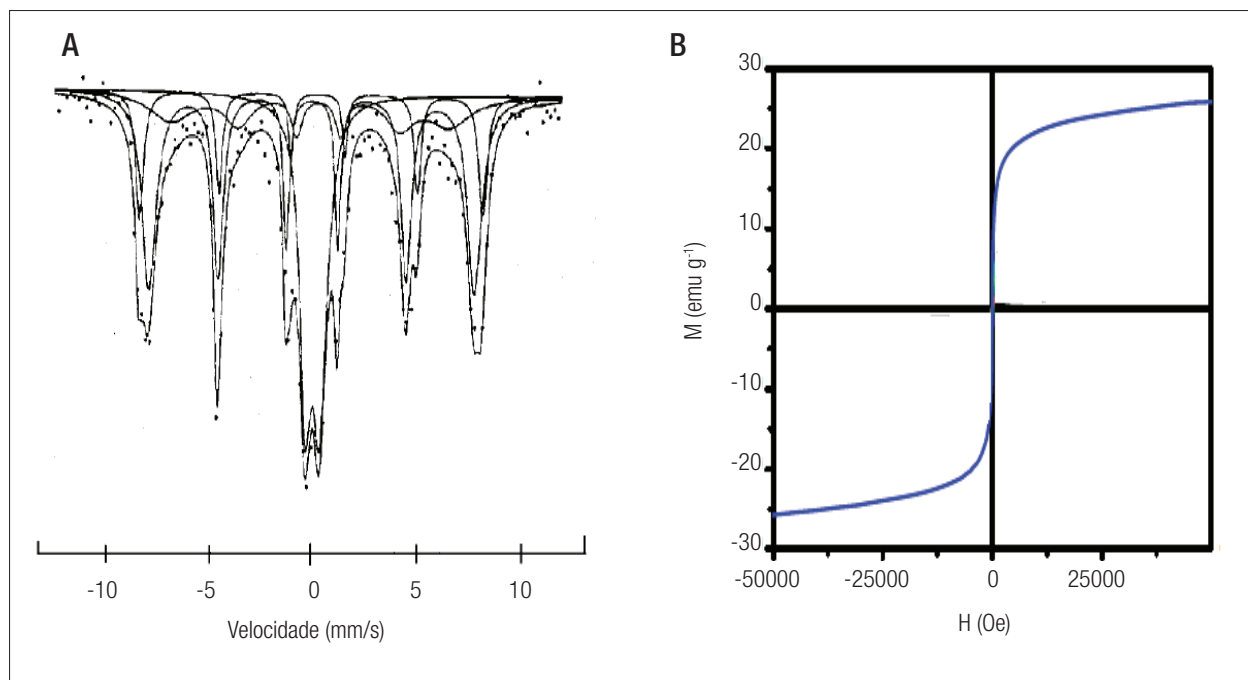
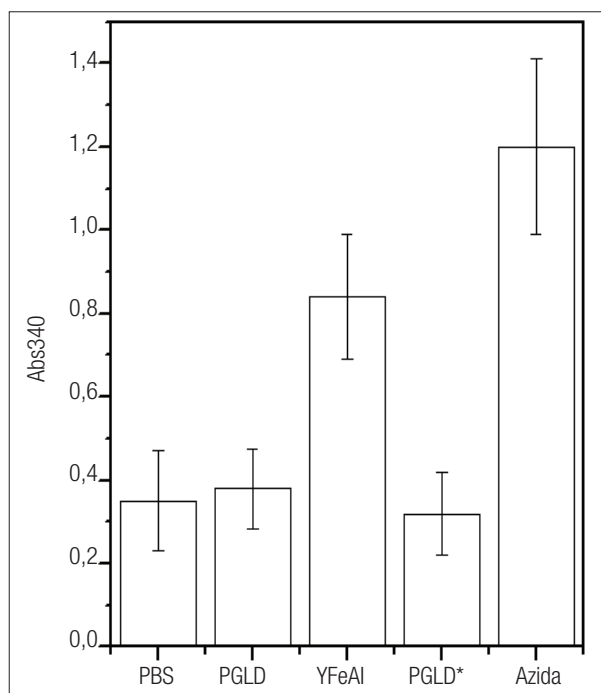


Figura 4. Difração de raios-X (A) e micrografia TEM (B) das nanopartículas de YFeAl com 28.200 X de aumento.



**Figura 5.** Espectro Mössbauer (A) e curva de magnetização em função do campo (B) obtidos à temperatura ambiente para as amostras de YFeAl obtidas por síntese bioinspirada.



**Figura 6.** Avaliação da citotoxicidade do nanossistema YFeAl/PGLD (PGLD\*) através do ensaio LDH. O ensaio foi realizado em triplicata. O controle positivo é o próprio meio de cultura (PBS).

ser observado, após 48 h de incubação no meio celular, não foram observadas diferenças na quantidade de LDH produzida comparativamente ao controle negativo (meio de cultura puro), indicando que as nanopartículas produzidas são adequadas para utilização em medicina.

## Discussão e Conclusões

As nanopartículas superparamagnéticas de YFeAl/PGLD podem ser utilizadas para aplicações na medicina diagnóstica, sendo que suas propriedades magnéticas e morfológicas são elementos diferenciáveis na caracterização do tecido neoplásico. Através das análises MEV observou-se uma distribuição de tamanhos numa faixa de  $20 \text{ nm} < d < 100 \text{ nm}$ , com superfícies lisas e aparentemente sem a presença de poros, indicando que o nanocompósito YFeAl/PGLD preenche o volume livre entre as cadeias do polímero epoxidico sem causar a deformação das nanoesferas. As nanoesferas superparamagnéticas preparadas demonstraram, através dos ensaios *in-vitro* realizados, que a introdução de receptores tumorais em sua superfície possibilitará uma variedade de aplicações na medicina terapêutica e diagnóstica do câncer.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pelo fomento.

## Referências

1. Castro VF, de Queiroz, Alvaro AA. Pontos quânticos magneto ativos: uma nova fronteira para a medicina terapêutica e diagnóstica. *Rev Bras Fis Méd.* 2011;4(3):15-8.
2. Castro VF. Nanocompósitos para utilização em magneto-hipertermia. [Dissertação de Mestrado em Materiais para Engenharia]. Itajubá: Universidade Federal de Itajubá, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; 2012.