



# SÍNTESE, TRANSFEÇÃO E ANÁLISE DA BIOCOMPATIBILIDADE DE NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS EM TECIDOS VIVOS



Camila Hitomi Murata ([camila.murata@gmail.com](mailto:camila.murata@gmail.com)), Aline Ordine ([angiekss@gmail.com](mailto:angiekss@gmail.com)), Daniela Zanchet, Paula Haddad, Tatiane Midori, Lília Souza ([ldsouza@fcm.unicamp.br](mailto:ldsouza@fcm.unicamp.br)) e Li Li Min ([limin@fcm.unicamp.br](mailto:limin@fcm.unicamp.br))

Departamento de Neurologia / Laboratório de Neuroimagem, Faculdade de Ciências Médicas, CP 6111, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

Palavras-chave: nanopartículas - óxido de ferro - células-tronco – biocompatibilidade - transfeção

## INTRODUÇÃO

Para estudar a existência da migração das células-tronco até o local da lesão, é necessário utilizar métodos não invasivos, como exemplo, a detecção dessas células por ressonância magnética. Esse projeto trata-se da marcação de células com nanopartículas de óxido de ferro biocompatíveis (NPOF), se localizando no interior das células e assim possibilitando sua detecção.

O método para a síntese de NPOF é o de decomposição térmica, em que se mistura um complexo de ferro ( $\text{Fe}(\text{acac})_3$ ) com um solvente orgânico que supera altas temperaturas e adiciona surfactantes (ácido oléico e oleilamina) para a formação das NPOF. A função do surfactante é a de restringir o tamanho das partículas em alguns nanômetros pela sua concentração e de evitar o agrupamento entre as partículas. Este método permite a obtenção de NPOF de diversos tamanhos através da mudança de temperatura de refluxo e a razão molar dos surfactantes em relação ao ferro, que podem variar de 3 a 20nm de diâmetro. Estas ao se formarem tendem a se aglomerar por causa da grande área superficial, sendo assim, é necessário recobri-las com moléculas de cadeias longas orgânicas que induz repulsão entre estas.

O ligante DMSA – ácido 2,3-dimercaptosuccínico irá realizar a troca da superfície do nanocristal porque é uma molécula que se liga facilmente a metais formando uma camada estável na carboxila presente, e o grupo tiol livre deste ligante servirá como fixador de anticorpos de alvos específicos. Essa camada também evita a formação de aglomerados e torna as NPOF biocompatíveis.

Para a incorporação de NPOF em células pode-se utilizar agentes que alteram a carga inicial das partículas e assim permitem a incorporação do material pelas células de transfeção de DNA. Um agente utilizado é a Poli-L-lisina, amina policatiônica que auxilia na aderência celular conferindo cargas positivas à superfície e aumentando a interação eletrostática entre íons na superfície celular carregada negativamente.

## METODOLOGIA

Para a síntese de NPOF, foram utilizados: o  $\text{Fe}(\text{Acac})_3$ , benziléter, 1,2- hexadecanodiol e surfactantes como ácido oléico e oleilamina. Em atmosfera inerte de nitrogênio, agita-se a mistura enquanto a temperatura aumenta em intervalos de  $50^\circ\text{C}$  até atingir  $200^\circ\text{C}$ , por 30 minutos, e depois refluxo de 30min. Para a troca de ligantes utilizou-se a razão para cada 10mg de nanopartículas precisou-se de 1ml de tolueno, 1ml de DMSO e 10mg de DMSA, agitou-se por 24 horas. Para a realização dessa síntese o LSQ e o LNLS ajudaram neste experimento.

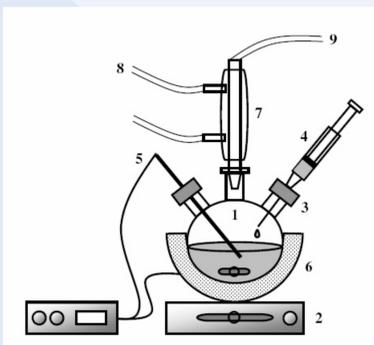


Figura 1. Arranjo experimental para a síntese. (1) balão de reação, (2) agitador magnético, (3) rolhas para vedação, (4) seringa para adição dos reagentes, (5) termopar conectado ao controlador de temperatura, (6) manta aquecedora, (7) condensador, (8) fluxo de água para resfriar o condensador, (9) linha de vácuo/nitrogênio.

A análise morfológica, a observação de mudanças do contraste das NPOF e a biocompatibilidade destas absorvidas pelo tecido vivo foram feitas através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). Quanto à caracterização estrutural, técnicas como difração de raios X (XRD) em pó associadas às técnicas de alta resolução espacial como microscopia eletrônica de transmissão em alta resolução (HRTEM) foram utilizadas, para determinar o grau de cristalinidade.

Para a incorporação de marcadores contendo ferro foi usado um agente de transfeção a lipofectamina 2000 (Invitrogen) e uma concentração de NPOF nas células-HeLa. Estas foram incubadas para avaliar a eficácia da transfeção e coradas com Azul da Prússia. Este corante irá ressaltar as NPOF de dentro das células em uma cor azul escuro.

No procedimento de transfeção com células-tronco de cordão umbilical, foram centrifugadas e resuspendidas em OptiMEM(Invitrogen), meio para cultura das células, sendo avaliada sua viabilidade. Foi utilizado o agente de transfeção DMRIE (Invitrogen) e as NPOF.

## RESULTADOS

Para a síntese foram utilizados 0,7066g de  $\text{Fe}(\text{acac})_3$ , 20ml de benziléter, 1,90ml de ácido oléico, 1,97ml de oleilamina e 2,5866g de 1-2 hexadecanodiol, esses foram misturados sob atmosfera inerte e em constante agitação magnética. Em seguida aumentou a temperatura e permaneceu em refluxo. Ao resfriar, a solução foi diluída com etanol desaerado e centrifugada por 15 minutos com velocidade de rotação de 3000rpm, procedimento feito para retirar as partículas menores que as desejadas. E por fim, as partículas depositadas foram secas a vácuo para que as NPOF possam ser pesadas e assim, realizar a troca de ligantes.

Através da caracterização das NPOF foi possível observar um comportamento superparamagnético tanto antes quanto depois da troca de ligantes, e a estabilidade das partículas à temperatura e atmosfera ambiente.

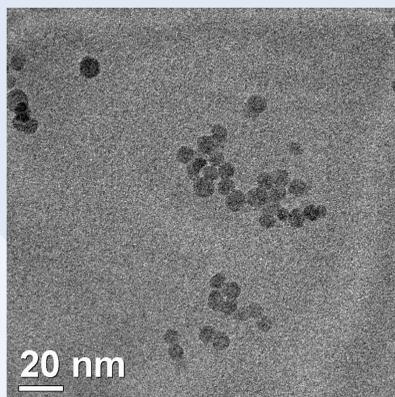


Figura 2. Imagem de TEM das nanopartículas sintetizadas depois da troca de ligantes. Esta micrografia mostra que as NPOF são esféricas e com diâmetros de aproximadamente 8nm.

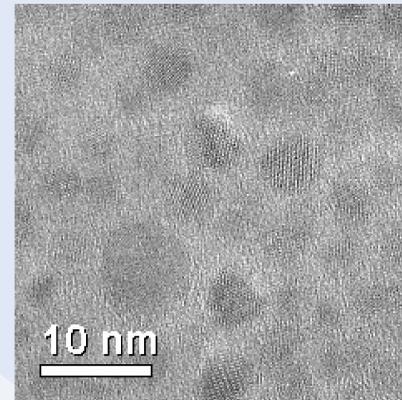


Figura 3. Imagem de TEM, pode ser visualizado a estrutura cristalina das NPOF.

Os resultados da microscopia óptica mostram uma boa taxa de transfeção nas células HeLa e que as partículas menores são mais facilmente fagocitadas. A maior taxa de incorporação das nanopartículas foi nas primeiras 6 horas de incubação, como pode ser visualizada na figura 4.

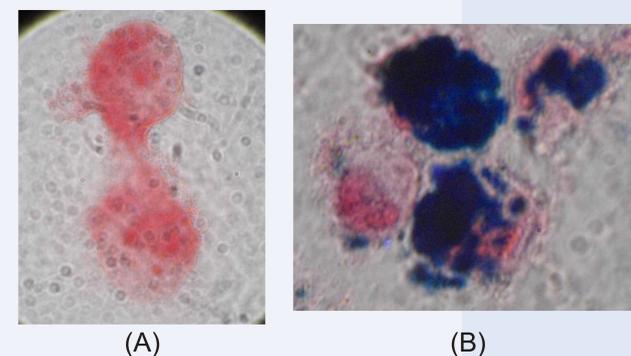


Figura 4. Imagens de microscopia óptica. (a) imagem de células HeLa sem NPOF e a (b) mostra as partículas coradas em azul dentro das células HeLa.

O experimento feito com as células tronco mostrou uma viabilidade celular com o azul de tripan superior a 95%, e não modificou com 6 horas de transfeção com as nanopartículas. As análises em microscopia óptica dessas células tronco que foram transfectadas por 6 horas mostraram depósitos intracelulares de nanopartículas óxido de ferro.

## CONCLUSÃO

Foi possível realizar a síntese das NPOF para a utilização destas na transfeção em células HeLa e células-tronco. Analisaram-se os principais métodos utilizados na caracterização de NPOF. A biocompatibilização das NPOF foi realizada adequadamente, porque ao realizar a transfeção nas células-HeLa e nas células tronco foi aplicado o corante azul da Prússia, e pôde-se perceber que a maioria das células ficou corada, significando a incorporação das NPOF, fato comprovado pela microscopia eletrônica.