

Estudo da citotoxicidade de nanopartículas de sílica amorfa e sua localização intracelular através de técnicas de imageamento ótico

**Orientador: Mateus Borba Cardoso
LMLS**

Resumo

O projeto aqui descrito visa determinar a citotoxicidade de nanopartículas de sílica amorfa em células de mamíferos bem como investigar a localização intracelular das nanopartículas durante o processo de internalização. Para isso, nanopartículas de sílica fluorescentes com diâmetros de aproximadamente 100 nm serão sintetizadas e, posteriormente, funcionalizadas com diferentes grupos funcionais. Estas nanopartículas serão caracterizadas por espectroscopia de infravermelho (FTIR), potencial zeta, espectroscopia de fluorescência, espalhamento de raios-X a baixos ângulos (SAXS), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), análise termogravimétrica (TGA) e adsorção/dessorção de nitrogênio. Os ensaios *in vitro* serão realizados com células de rim embrionário (células HEK-293), as quais serão tratadas com as nanopartículas fluorescentes contendo diferentes grupos funcionais em sua superfície. Os testes *in vitro* irão avaliar a citotoxicidade das nanopartículas e a viabilidade celular. Paralelamente serão preparadas lâminas para microscopia ótica confocal, nas quais serão utilizados diferentes marcadores para diferentes organelas, o que, em conjunto com a fluorescência das nanopartículas, permitirá o imageamento ótico para localização intracelular das nanopartículas. Com isso, será possível correlacionar as características funcionais da superfície das diferentes nanopartículas com a dinâmica de internalização e localização das nanopartículas dentro das células.

1. Motivação e Metodologia

O recente desenvolvimento das nanoestruturas, cuja finalidade é a aplicação em sistemas biológicos, apontam para uma direção que demanda um conhecimento cada vez mais fundamental da interação entre os sistemas nanométricos e as células [1]. A pesquisa mais comum neste tópico tem sido os chamados testes de citotoxicidade, onde a viabilidade celular para diferentes nanopartículas são avaliadas em diferentes concentrações e com diferentes tempos de incubação. No entanto estes testes não são capazes de elucidar as vias celulares pela qual as nanopartículas interagem com as células bem como suas possíveis consequências.

Paralelamente, as pesquisas que tentam responder a estas questões utilizam marcadores e proteínas fluorescentes na esperança de rastrear as nanopartículas no meio intracelular por microscopia de fluorescência. Neste contexto, as nanopartículas de sílica amorfa (NSA) dopadas com fluoróforos têm sido consideradas estruturas muito promissoras [2]. Por serem opticamente transparentes, as NSAs permitem agregar em sua estrutura uma grande quantidade de fluoróforos, o que resulta no aumento de fluorescência por volume ao mesmo tempo que matam o fluoróforo em uma matriz sólida protegido de *quenchers* moleculares e outras interferências provenientes do solvente. Além disso, as NSAs também apresentam elevada biocompatibilidade e estabilidade química; por apresentarem uma natureza negativa, que permite a modificação e adição de grupos funcionais à sua superfície [3]; e por apresentarem mesoporos que podem ser utilizados para transporte de drogas [4].

Sendo assim o presente projeto tem como objetivo observar a citotoxicidade de nanopartículas com diferentes grupos funcionais e correlacionar esses dados com a localização intracelular das NSAs. Serão utilizadas nanopartículas de sílica com núcleo fluorescente sintetizadas através de um processo de Stöber modificado [5]. Para a síntese do núcleo o corante DY-630-MI será ligado covalentemente ao 2-mercaptopropiltrimetoxisilano (MPTMS) em uma reação de 12 h mantida em atmosfera livre de água com proporção de corante para silano de 1:50. Este precursor de sílica fluorescente será então co-condensado com tetraethylorthosilicato (TEOS) por mais 10 h em uma solução de etanol, água deionizada e amônia para formar o núcleo da NSA.

A adição da *shell* de sílica amorfa às nanopartículas de sílica fluorescente será realizada utilizando a técnica de polimerização com semente (do inglês *seeded polymerization*) através da reação sol-gel descrita por Graf e seus colaboradores. As nanopartículas de sílica descritas na seção anterior serão dispersas em uma solução de amônia (4,2 % [V/V] em etanol) e, imediatamente, uma solução de TEOS (10 % [V/V] em etanol) será adicionada à mistura sob agitação. A reação será mantida sob agitação por 14 horas, seguida de centrifugação a 9000 g por 10 min para eliminar o excesso de TEOS. Depois, o precipitado será lavado várias vezes obtendo, por fim, a estrutura desejada.

A superfície das nanopartículas descritas anteriormente será funcionalizada com grupamentos mercapto, glicidil, isocianato, feniletil; e amino através de reação com (3-mercaptopropil) trimetoxisilano; (3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano; 3-(trietoxisilil)propilisocianato, trimetoxi(2-feniletil)silano; e 3-(aminopropil)

trimetoxisilano, respectivamente. Resumidamente, cada silano (1 % [V/V]) será adicionado a uma suspensão etanólica contendo as nanopartículas previamente preparadas. Após duas horas sob agitação, as nanopartículas funcionalizadas serão recuperadas por centrifugação e lavadas com etanol para retirar o excesso de reagente.

MET e MEV serão utilizadas para verificar a forma, tamanho e distribuição das nanopartículas de sílica no LNNano. A estrutura mesoporosa do nanocompósito de sílica será investigada através de adsorção/dessorção de nitrogênio. As medidas de SAXS serão realizadas na linha D1B-SAXS1 do LNLS, e permitirão determinar tamanho, forma e polidispersão das nanopartículas. As medidas de FTIR serão utilizadas para verificar a eficiência da funcionalização das nanopartículas durante o processo de síntese e a carga da superfície das nanopartículas será determinada através das medidas do potencial zeta.

Nos ensaios biológicos serão realizados estudos de citotoxicidade para determinar protocolos e concentrações de nanopartículas com as funcionalizações distintas. As células serão incubadas por 24 h e em seguida serão tratadas com as nanopartículas, após 12, 24, 48 e 72 h. Após esse período, as células serão submetidas ao teste colorimétrico MTS.

Para microscopia confocal as células serão incubadas sobre uma lamínula de vidro e seguirão o mesmo protocolo dos testes citotóxicos. Terminado o tempo de incubação, as células serão fixadas e coradas com diferentes marcadores. Por fim estas lâminas serão levadas ao microscópio confocal Leica – SP8 (LNBio) para identificar as estruturas celulares marcadas e a região na qual as NSAs serão acumuladas.

Os ensaios biológicos serão realizados no LNBio em colaboração com o grupo do Dr. Jörg Kobarg.

Referências

- [1] A. E. Nel, L. Mädler, D. Velegol, T. Xia, E. M. V Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, and M. Thompson, “Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface.,” *Nat. Mater.*, vol. 8, no. 7, pp. 543–57, Jul. 2009.
- [2] B. Korzeniowska, R. Nooney, D. Wencel, and C. McDonagh, “Silica nanoparticles for cell imaging and intracellular sensing.,” *Nanotechnology*, vol. 24, no. 44, p. 442002, Nov. 2013.
- [3] M. Nakamura, “Approaches to the Biofunctionalization of Spherical Silica Nanomaterials”, “*Nanotechnologies for the Life Sciences*”, vol 2, 2010
- [4] J. L. Vivero-Escoto, I. I. Slowing, B. G. Trewyn, and V. S.-Y. Lin, “Mesoporous silica nanoparticles for intracellular controlled drug delivery.,” *Small*, vol. 6, no. 18, pp. 1952–67, Sep. 2010.
- [5] A. Burns, H. Ow, and U. Wiesner, “Fluorescent core-shell silica nanoparticles: towards ‘Lab on a Particle’ architectures for nanobiotechnology.,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 35, no. 11, pp. 1028–42, Nov. 2006.