Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos
Departamento de Físico Química
Grupo de Materiais Coloidais

Mônica Freitas da Silva

**Estudo de estabilidade coloidal de sistemas de nanopartículas
magnéticas recobertas visando aplicação em biomedicina.**

São Carlos
2017

Mônica Freitas da Silva

**Estudo de estabilidade coloidal de sistemas de nanopartículas
magnéticas recobertas visando aplicação em biomedicina.**

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em química.

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Laudemir Carlos Varanda

São Carlos

-2017-

*A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão
próximos a mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, por ser o motivo da minha fé, que por muitos momentos me sustentou para chegar até aqui.

Ao professor Laudemir Carlos Varanda, pela oportunidade de trabalho, confiança e aprendizado diário, contribuindo passo a passo na construção da profissional que me tornei.

Aos meus pais Paulo e Ana e ao meu irmão Paulo, por proporcionarem a melhor estrutura familiar que eu poderia ter, com todo apoio e paciência. Por serem meu espelho e meu orgulho.

Ao Danilo, que por muitas vezes teve que ser mais forte que eu para que nada saísse dos trilhos. À quem eu devo toda gratidão por tanta paciência e amor dedicados à mim.

Aos amigos do Grupo de Materiais Coloidais, pela convivência e aprendizados diários e por todo auxílio nestes 6 anos de amizade. À minha família, principalmente aos meus avôs Ovídio e Laurindo, que assistem por essa conquista de outro plano e sabem que muito do que sou e conquistei, devo a eles. Vô Lau, não esquecerei nunca que até mesmo antes da escola, eu já lia e escrevia por causa do senhor.

Aos amigos que conquistei nesta jornada e também ao longo da minha vida, que jamais permitiram que eu desanimasse nas dificuldades: Aline, Sarah, Carol, Rebecca, Mayara, Noelle, Ana Paula e Eloísa. E a todos os amigos que fiz nos períodos de graduação e pós-graduação na Unesp e no IQSC.

Ao Instituto de Química da UNESP Araraquara, pela minha formação e por me receber novamente, oferecendo mais uma oportunidade de aprendizado e trabalho. Principalmente aos professores Assis Vicente Benedetti e Marcelo Ornaghi Orlandi, por todas as oportunidades oferecidas.

Ao Instituto de Química de São Carlos - USP, pela infraestrutura oferecida. Aos docentes do IQSC e IFSC, aos demais funcionários, pela qualidade de todos os serviços prestados, que contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.

Aos alunos e toda equipe do Colégio Objetivo Araraquara, pelo apoio e paciência, e por estarem contribuindo para minha formação pessoal e profissional.

Ao Laboratório de Caracterização Estrutural da Universidade Federal de São Carlos, ao Prof. Dr. Daniel Reinaldo Cornejo, do Instituto de Física, que gentilmente disponibilizaram equipamentos de caracterização necessários para a obtenção dos resultados apresentados e discutidos neste trabalho.

À Capes pela bolsa concedida.

À Capes, CNPq e Fapesp pelo apoio financeiro.

*"Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos.
Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo,
importa o que fazemos de nós."*

Chico Xavier

Resumo

Nanopartículas magnéticas (NPMs) de óxido de ferro tem sido amplamente utilizadas em diversas áreas da biotecnologia e biomedicina, tais como no tratamento de câncer, na entrega controlada de fármacos e como agentes de contraste em imagem por ressonância magnética. O intuito deste trabalho foi sintetizar nanopartículas magnéticas com magnetização de saturação intensificadas via processo do poliol modificado e modificar sua superfície afim de promover a biocompatibilização dos sistemas. Além da funcionalização de nanopartículas previamente biocompatibilizadas utilizando dois métodos: via ligação amida com moléculas de ácido fólico (AF) e com a encapsulação das nanopartículas com quitosana. A modificação de superfície deu-se via procedimentos de lavagem de superfícies, adição e/ou troca de ligantes utilizando moléculas de ácido ϵ -aminocapróico (EACA), aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) e ácido dimercaptosuccínico (DMSA). Através da microscopia eletrônica de transmissão (TEM), foi obtido que as nanopartículas magnéticas de magnetita obtiveram um diâmetro médio de 8 nm, em uma estreita distribuição de tamanho. A difração de raios-X (DRX) indicou a formação de magnetita em todos os sistemas em que o método do poliol modificado foi utilizado. As medidas de espectroscopia vibracional na região do infravermelho (FTIR) evidenciaram a presença de modos de vibração relacionados às macromoléculas e compostos inorgânicos utilizados na modificação de superfície das nanopartículas magnéticas e/ou funcionalização. A TEM das diferentes modificações de superfície mostram a formação de aglomerados dependendo da molécula utilizada. Os estudos de estabilidade coloidal foram necessários para que o meio biológico fosse simulado para uma possível aplicação destes sistemas como carreadores para tratamento via magnetohipertermia ou entrega controlada de NPMs para tratamento de câncer. A nanopartícula recoberta com DMSA apresentou melhores resultados de estabilidade coloidal. Com os sistemas funcionalizados com ácido fólico, o procedimento via ligação com carbodiimida na presença de NHS demonstrou ser eficaz na formação de ligação amida, confirmada por FTIR e quantificação de ligantes. A funcionalização com quitosana necessita de alguns ajustes, visto ser um novo procedimento, porém alguns sistemas em que foi utilizado o método da gelificação iônica possuíram bons resultados de nanocápsulas de quitosana formadas com nanopartículas biocompatibilizadas em seu interior.

Abstract

Magnetite, iron oxide, is a type of magnetic nanoparticles (NPMs) that is a widely adopted in several areas of biotechnology and biomedicine, such as in the treatment of cancer, controlled delivery of drugs and as contrast agents in magnetic resonance imaging. The purpose of this work is to synthesize magnetic nanoparticles with enhanced saturation magnetization via modified polyol process and modify its surface to promote a biocompatibilization in these systems. In addition, there was the aim to functionalize nanoparticles with modificate surfaces, using two methods: via amide bonding with folic acid molecules (AF) and encapsulation of nanoparticles with chitosan. Surface modification was done via surface washing, addition and / or exchange ligands using ϵ -aminocaproic acid (EACA), aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) and dimercaptosuccinic acid (DMSA) molecules. By transmission electron microscopy (TEM), it was obtained that the magnetite nanoparticles had an average diameter of 8 nm, in a narrow size distribution. X-ray diffraction (XRD) indicated formation of magnetite in all systems where modified polyol method was used. Infrared spectroscopy (FTIR) showed the presence of vibration modes related to macromolecules and inorganic compounds used in the surface modification of magnetic nanoparticles and / or functionalization. The TEM of different surface modifications showed the formation of agglomerates, depending on the molecule used. Colloidal stability studies were necessary to simulate a biological medium for a possible application of these systems as carriers for treatment via magnetohyperthermia or controlled delivery of NPMs for cancer treatment. Nanoparticles coated with DMSA showed better colloidal stability results. With folic acid functionalized systems, the procedure via carbodiimide linkage in the presence of NHS had been shown to be effective in FTIR-confirmed amide bond formation and ligand quantification. The functionalization with chitosan requires some adjustments, since it was a new procedure, however some systems using the ionic gelation method had good results of chitosan nanocapsules formed with biocompatibilized nanoparticles in structure.

Lista de abreviaturas e siglas

AF – Ácido Fólico

APTMS – 3-aminopropiltrimetoxisilano

D_p – diâmetro crítico de partícula

D_s – diâmetro crítico

DLS – *dynamic light scattering*

DMSO – dimetilsulfóxido

DMSA – ácido dimercaptosuccínico

DRX – difratometria de raios X

EACA – Ácido ϵ -aminocapróico

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

FTIR - infravermelho com transformada de Fourier

FM – ferromagnético

H_c - campo coercivo ou coercividade

H_{ci} – coercividade intrínseca

IRM – imagem por ressonância magnética

M_s – magnetização de saturação

M_R – magnetização remanente

M_D – múltiplos domínios

MET – microscopia eletrônica de transmissão

NHS – N-hidroxisuccinamida

NPMs – nanopartículas magnéticas

NPs - nanopartículas

PDI – índice de polidispersividade

SD – single domain

VSM – magnetometria de amostra vibrante

Índice de figuras

FIGURA 1 ORIGEM DOS MOMENTOS MAGNÉTICOS NO ÁTOMO, (A) MOVIMENTO ORBITAL (μ_L) E (B) MOVIMENTO DE SPIN ELETRÔNICO (μ_S).	21
FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO ELETRÔNICA NO ESTADO FUNDAMENTAL PARA OS ÁTOMOS DE FERRO (FE), COBALTO (CO) E NÍQUEL (NI) DEMONSTRANDO A PRESENÇA DE ELÉTRONS DESEMPARELHADOS E JUSTIFICANDO SEUS COMPORTAMENTOS MAGNÉTICOS	22
FIGURA 3 CURVA DE MAGNETIZAÇÃO VS CAMPO MAGNÉTICO PARA NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS (SPM) E FERROMAGNÉTICAS (FM). SÃO INDICADOS O CAMPO COERCITIVO (HC), A MAGNETIZAÇÃO DE SATURAÇÃO (MS) E DA MAGNETIZAÇÃO REMANENTE (MR)	23
FIGURA 4 VARIAÇÃO DA COERCIVIDADE INTRÍNSECA (H_{ci}) EM FUNÇÃO DO DIÂMETRO DA PARTÍCULA.	24
FIGURA 5 ILUSTRAÇÃO DO MECANISMO DE FORMAÇÃO DE PARTÍCULAS UNIFORMES BASEADO NO MODELO CLÁSSICO DE LAMER E DINEGAR.	29
FIGURA 6 MECANISMOS DE ESTABILIDADE COLOIDAL: REPULSÃO ESTÉRICA E ELETROSTÁTICA EM UMA NANOPARTÍCULA.	30
FIGURA 7 ESQUEMA DA REPRESENTAÇÃO DO SIGNIFICADO DE POTENCIAL ZETA.	31
FIGURA 8 ESQUEMA MOSTRANDO A TROCA E ADIÇÃO DE SURFACTANTES NA SUPERFÍCIE DA NPM, CONFERINDO À ELA UM CARÁTER HIDROFÍLICO.	33
FIGURA 9 ESQUEMA MOSTRANDO UMA NANOPARTÍCULA MAGNÉTICA COM DIVERSOS LIGANTES FUNCIONAIS POSSIBILITANDO MULTIFUNCIONALIDADE NUMA ÚNICA NANOPARTÍCULA.	35
FIGURA 10 ESQUEMA DE ENDOCITOSE DE FÁRMACO E AGENTE DE IMAGEM REALIZADA VIA RECEPTORES FOLATO.	37
FIGURA 11 POSSÍVEL MECANISMO DE ENTREGA CONTROLADA PELO PH DE NPMS PELA MATRIZ DE QUITOSANA.	38
FIGURA 12 ESQUEMA REPRESENTANDO O SISTEMA DA ENTREGA CONTROLADA DE FÁRMACOS VIA NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.	40
FIGURA 13 REPRESENTAÇÃO DO ESQUEMA DE APARATO EXPERIMENTAL UTILIZADO NA SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.	44
FIGURA 14 ESQUEMA DE RAMPA DE AQUECIMENTO UTILIZADO PARA A SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS VIA SÍNTESE DO POLIOL MODIFICADO.	44
FIGURA 15 CURVA ANALÍTICA REALIZADA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE 4-NITROBENZALDEÍDO PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO GRUPOS AMINO LIVRES NAS NPS RECOBERTAS.	54
FIGURA 16 CURVA ANALÍTICA REALIZADA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO FÓLICO PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LIGANTES FOLATO NAS NPS FUNCIONALIZADAS.	55
FIGURA 17 (A) E (B) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DA AMOSTRA DE MAGNETITA SINTETIZADA VIA MÉTODO DO POLIOL MODIFICADO. (C) HISTOGRAMA DA DISTRIBUIÇÃO DE	

TAMANHO COM AJUSTE GAUSSIANO PARA DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO MÉDIO DAS NANOPARTÍCULAS	59
FIGURA 18 - DRX OBTIDO A PARTIR DA AMOSTRA COMPARADO AOS PADRÕES JCPDS DAS FASES MAGNETITA E A-HEMATITA.	60
FIGURA 19 (A) ESPECTRO FTIR DA MAGNETITA; (B) CURVA DE MAGNETIZAÇÃO DE SATURAÇÃO DA MAGNETITA.	61
FIGURA 20 ESTRUTURA MOLECULAR DO BENZIL ÉTER (C ₁₄ H ₁₄ O).	62
FIGURA 21 (A) E (B) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DA AMOSTRA DE MAGNETITA SINTETIZADA VIA MÉTODO DO POLIOL MODIFICADO, COM PROCEDIMENTO DE SECAGEM DO BENZIL ÉTER. (C) HISTOGRAMA DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO COM AJUSTE LOG NORMAL PARA DETERMINAÇÃO DO TAMANHO	63
FIGURA 22 AMOSTRA DE MAGNETITA CÚBICA. (A) SAED, (B) HRTEM, (C) DRX	64
FIGURA 23 (A) E (B) FTIR DAS AMOSTRAS DE BENZILÉTER COM DIFERENTES TRATAMENTOS.	65
FIGURA 24 ANÁLISES DAS NPS LAVADAS EM METANOL A QUENTE. (A) E (B) MET DA NANOPARTÍCULA LAVADA. (C) FTIR COMPARATIVO ENTRE A MAGNETITA COMO SINTETIZADA E APÓS LAVADA (D) DRX	68
FIGURA 25 CURVA DE MAGNETIZAÇÃO DE SATURAÇÃO DA MAGNETITA APÓS LAVAGEM COM METANOL À QUENTE.	69
FIGURA 26 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO POR INTENSIDADE DA AMOSTRA DE MAGNETITA LAVADA COM METANOL.	69
FIGURA 27 HISTOGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO PELA PORCENTAGEM DE PARTÍCULAS DE MAGNETITA LAVADA COM METANOL.	70
FIGURA 28 ANÁLISES DAS NPS LAVADAS EM METANOL A QUENTE RECOBERTAS COM ÁCIDO AMINOCAPRÓICO. (A) E (B) MET. (C) FTIR (D) HISTOGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO	71
FIGURA 29 (A) ESTRUTURA DO EACA, QUE PARTICIPA DO MECANISMO DE TROCA COM MOLÉCULAS DA SUPERFÍCIE. (B) ESQUEMA DA FORMA COM QUE A SUPERFÍCIE DA MAGNETITA FICA PROTEGIDA PELO ÁCIDO OLEICO E OLEILAMINA E POSSÍVEL ESTRUTURA APÓS A TROCA DE LIGANTES.	73
FIGURA 30 (A) E (B) MET DA AMOSTRA DE MAGNETITA RECOBERTA COM ÁCIDO AMINOCAPRÓICO. (C) HISTOGRAMA DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO COM CURVA DE AJUSTE LOGNORMAL. (D) FTIR DESTA AMOSTRA.	74
FIGURA 31 ESPECTRO FTIR COMPARATIVO AS BANDAS EXISTENTES NAS AMOSTRAS DE MAGNETITA CONFORME SINTETIZADA, 1, 2, 2,5 E 3 HORAS DE REAÇÃO NO PROCEDIMENTO DE TROCA DE LIGANTES PARA MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE COM ÁCIDO AMINOCAPRÓICO.	75
FIGURA 32 RESULTADOS DA ANÁLISE DE ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO DA AMOSTRA DE MAGNETITA COM ÁCIDO AMINOCAPRÓICO. A) DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO PELA INTENSIDADE. B) HISTOGRAMA DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO PELA QUANTIDADE DE NPS.	76
FIGURA 33 AMOSTRA DE MAGNETITA CÚBICA RECOBERTA COM EACA (A) TEM (B) HRTEM (C) FTIR	77

FIGURA 34 (A) E (B) MET DA AMOSTRA DE MAGNETITA RECOBERTA COM APTMS. (C) HISTOGRAMA DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO COM CURVA DE AJUSTE LOGNORMAL. (D) FTIR DESTA AMOSTRA.	79
FIGURA 35 PROPOSTA MAIS ACEITA PELA LITERATURA CONFORMAÇÃO DO APTMS NA SUPERFÍCIE DA NP ⁹⁷	80
FIGURA 36 ANÁLISE DE DLS DA AMOSTRA DE MAGNETITA COM APTMS A) DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO PELA INTENSIDADE. B) HISTOGRAMA DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO PELO NÚMERO DE NPS	81
FIGURA 37 MET DAS NPS DE MAGNETITA RECOBERTAS COM DMSA (A) SEM PROCEDIMENTO DE DIÁLISE (B) COM PROCEDIMENTO DE DIÁLISE. (C) FTIR DA AMOSTRA SEM DIÁLISE. (D) HISTOGRAMA DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DA AMOSTRA SEM DIÁLISE.	82
FIGURA 38 – HISTOGRAMA DE DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO PELO NÚMERO DE CONTAGENS DA AMOSTRA DE MAGNETITA RECOBERTA COM DMSA.	83
FIGURA 39 RESULTADOS DE ENSAIOS DE HIPERTERMIA REALIZADOS COM AS NPS RECOBERTAS.	84
FIGURA 40 GRÁFICO DE POTENCIAL ZETA E MOBILIDADE ELETROFORÉTICA VERSUS PH, PARA ESTUDO DA ESTABILIDADE COLOIDAL DAS NPS RECOBERTAS COM EACA.	87
FIGURA 41 GRÁFICO DE POTENCIAL ZETA E MOBILIDADE ELETROFORÉTICA VERSUS PH, PARA ESTUDO DA ESTABILIDADE COLOIDAL DAS NPS RECOBERTAS COM APTMS.	88
FIGURA 42 GRÁFICO DE POTENCIAL ZETA E MOBILIDADE ELETROFORÉTICA VERSUS PH, PARA ESTUDO DA ESTABILIDADE COLOIDAL DAS NPS RECOBERTAS COM DMSA.	88
FIGURA 43 GRÁFICO DE POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO HIDRODINÂMICO VERSUS PH PARA CONFIRMAÇÃO DA REGIÃO DE ESTABILIDADE DO SISTEMA DE NPS RECOBERTAS COM EACA.	90
FIGURA 44 GRÁFICO DE DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E PDI VERSUS PH PARA CONFIRMAÇÃO DA REGIÃO DE ESTABILIDADE DO SISTEMA DE NPS RECOBERTAS COM EACA.	90
FIGURA 45 RESULTADOS DAS DISTRIBUIÇÕES DE DIÂMETRO HIDRODINÂMICO POR NÚMERO DA AMOSTRA DE NANOPARTÍCULA RECOBERTA COM EACA EM DIFERENTES PHs. (A) PH= 3,1 (B) PH= 11,8 (C) PH= 8,5.	91
FIGURA 46 DIÂMETRO HIDRODINÂMICO EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA O SISTEMA DE NPS RECOBERTAS COM EACA EM DIFERENTES SOLVENTES E CONCENTRAÇÕES.	92
FIGURA 47 DIÂMETRO HIDRODINÂMICO EM FUNÇÃO DO TEMPO EM SISTEMAS COM DIFERENTES SOLVENTES E CONCENTRAÇÕES DE NPS RECOBERTAS COM (A) APTMS (B) DMSA.	93
FIGURA 48 GRÁFICO DE POTENCIAL ZETA E DIÂMETRO HIDRODINÂMICO VERSUS PH PARA CONFIRMAÇÃO DA REGIÃO DE ESTABILIDADE DO SISTEMA DE NPS RECOBERTAS COM (A) APTMS (B) DMSA.	94
FIGURA 49 GRÁFICO DE DIÂMETRO HIDRODINÂMICO E PDI VERSUS PH PARA CONFIRMAÇÃO DA REGIÃO DE ESTABILIDADE DO SISTEMA DE NPS RECOBERTAS COM (A) APTMS (B) DMSA.	95
FIGURA 50 ESPECTROS NO UV-VIS PARA TESTE DE ESTABILIDADE COLOIDAL DE NPS DE MAGNETITA RECOBERTAS COM DMSA COM A) 4 HORAS B) 24 HORAS C) 28 HORAS DE REAÇÃO.	97
FIGURA 51 MICROSCOPIA TEM DAS AMOSTRAS DE NPS DE MAGNETITA RECOBERTAS COM DMSA COM A) 4 HORAS B) 28 HORAS DE REAÇÃO. C) FTIR DA AMOSTRA COM 28 HORAS DE REAÇÃO	98

FIGURA 52 GRÁFICOS CORRESPONDENTES ÀS ANÁLISES NO UV-VIS DA AMOSTRA DE MAGNETITA RECOBERTA COM DMSA EM PHS VARIADOS.	101
FIGURA 53 FOTOGRAFIA DAS AMOSTRAS DE MAGNETITA RECOBERTAS COM DMSA, COM PHS VARIADOS DE 2 A 12, APÓS 2 SEMANAS DE ESTOCAGEM.	101
FIGURA 54 MECANISMO DO PROCEDIMENTO DE FUNCIONALIZAÇÃO DA NP COM AF VIA REAÇÃO COM CARBODIIMIDA NA PRESENÇA DE NHS (1º PROCEDIMENTO)	104
FIGURA 55 MECANISMO DO PROCEDIMENTO DE FUNCIONALIZAÇÃO DA NP COM AF VIA REAÇÃO COM CARBODIIMIDA	105
FIGURA 56 ESQUEMA DA SUPERFÍCIE DA NP COM RECOBRIMENTO DE APTMS E FUNCIONALIZAÇÃO DE AF PROTEGIDO POR T-BOC	106
FIGURA 57 TEM DAS NPS FUNCIONALIZADAS COM AF VIA PROCEDIMENTO DE CARBODIIMIDA COM NHS. (A) E (B) UTILIZANDO NPS COM APTMS. (C) CORRELOGRAMA DAS AMOSTRAS COM AF E APTMS. (D) E (E) UTILIZANDO NPS RECOBERTAS COM EACA. (F) CORRELOGRAMA DAS AMOSTRAS COM AF E EACA.	107
FIGURA 58 FTIR DAS AMOSTRAS FUNCIONALIZADAS PARA A COMPROVAÇÃO DA LIGAÇÃO AMIDA NA SUPERFÍCIE DAS NPS	108
FIGURA 59 TEM DAS AMOSTRAS FUNCIONALIZADAS COM AF VIA PROCEDIMENTO DE CARBODIIMIDA (A) E (B) UTILIZANDO NPS RECOBERTAS COM APTMS. (C) CORRELOGRAMA DAS AMOSTRAS COM AF E APTMS. (D) E (E) UTILIZANDO NPS RECOBERTAS COM EACA. (F) CORRELOGRAMA DAS AMOSTRAS COM AF E EA	109
FIGURA 60 FTIR DAS AMOSTRAS FUNCIONALIZADAS PARA A COMPROVAÇÃO DA FUNCIONALIZAÇÃO DAS NPS	110
FIGURA 61 ESPECTROS DE FTIR DO T-BOC, AF E DO COMPOSTO FORMADO NO PROCEDIMENTO DE PROTEÇÃO.	111
FIGURA 62 ESPECTROS DE FTIR DO ACOMPANHAMENTO DA REAÇÃO DE FUNCIONALIZAÇÃO PELO PROCEDIMENTO DE PROTEÇÃO DO AF COM T-BOC. (A) 1 HORA DE REAÇÃO, (B) 2 HORAS DE REAÇÃO, (C) 3 HORAS DE REAÇÃO, (D) 4 HORAS DE REAÇÃO.	112
FIGURA 63 (A) E (B) MET DA AMOSTRA DE NPS RECOBERTAS COM APTMS E FUNCIONALIZADAS COM AF VIA MÉTODO DE PROTEÇÃO COM T-BOC.	112
FIGURA 64 (A) ESTRUTURA DA QUITOSANA E FORMAS ABREVIADAS DAS UNIDADES ESTRUTURAIS DA GLICOSAMINA (GLCN), DESTACANDO OS SÍTIOS MAIS SUSCETÍVEIS ÀS REAÇÕES DE CROSSLINKING. (B) REAÇÃO DE RETICULAÇÃO PELA INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA ENTRE ÍONS AMÔNIO DA CADEIA DA QUITOSANA E OS GRUPOS FOSFÓRICOS DO TPP, ENCAPSULANDO NPS QUE SÃO REPRESENTADAS PELOS PONTOS ESCUROS.	114
FIGURA 65 RESULTADOS DA AMOSTRA DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA FORMADAS PELO MÉTODO SEGUNDO CALVO ET AL. (A) E (B) MET (C) HISTOGRAMA DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO PELO NÚMERO DE PARTÍCULAS.	115

FIGURA 66 RESULTADOS DA ENCAPSULAÇÃO DE NPS DE MAGNETITA SEM TRATAMENTO PRÉVIO DE SUPERFÍCIE VIA PROCEDIMENTO ADAPTADO DE CALVO ET AL. (A) E (B) TEM DO SOBRENADANTE DO PROCEDIMENTO, (C) DLS DO SOBRENADANTE. (D) E (E) TEM DO PRECIPITADO, (F) DLS DO PRECIPITADO	116
FIGURA 67 RESULTADOS DA ENCAPSULAÇÃO DE NPS COM QUITOSANA SEGUNDO O MÉTODO ADAPTADO DE CALVO ET AL. AMOSTRA COM MAGNETITA RECOBERTA COM EACA (A) E (B) TEM (C) DLS. (E) E (F) TEM DA AMOSTRA COM MAGNETITA LAVADA COM METANOL.	117
FIGURA 68 FTIR DOS SISTEMAS OBTIDOS NOS PROCESSOS DE ENCAPSULAÇÃO DE NPS DE MAGNETITA DE DIVERSAS NATUREZAS SEGUNDO O MÉTODO ADAPTADO DE CALVO ET AL.	118
FIGURA 69 ENCAPSULAÇÃO DE NPS DE MAGNETITA COMO SINTETIZADA VIA PROCEDIMENTO VIA EMULSÃO ÓLEO/ÁGUA. (A) E (B) TEM DO SOBRENADANTE DO PROCEDIMENTO, (C) DLS DO SOBRENADANTE. (D) E (E) TEM DO PRECIPITADO DO PROCEDIMENTO, (F) DLS DO PRECIPITADO.	120
FIGURA 70 RESULTADOS DA ENCAPSULAÇÃO DE NPS DE MAGNETITA COM EACA VIA PROCEDIMENTO VIA EMULSÃO ÓLEO/ÁGUA. (A) E (B) TEM DAS PARTÍCULAS, (C) DLS DAS PARTÍCULAS.	121
FIGURA 71 FTIR DOS DIVERSOS SISTEMAS DE NPS ENCAPSULADAS COM QUITOSANA PELO MÉTODO DE EMULSÃO ÁGUA/ÓLEO.	122
FIGURA 72 RESULTADOS DA ENCAPSULAÇÃO DE NPS COM QUITOSANA VIA MÉTODO DE GELIFICAÇÃO IÔNICA. AMOSTRA COM MAGNETITA RECOBERTA COM EACA (A) E (B) TEM (C) DLS. MAGNETITA LAVADA COM METANOL (D) E (E) TEM (C) DLS.	124
FIGURA 73 TEM DO SISTEMA DE ENCAPSULAÇÃO DE NPS DE MAGNETITA RECOBERTAS COM DMSA.	125
FIGURA 74 ANÁLISE DE EDS DAS NANOCÁPSULAS FORMADAS NO PROCEDIMENTO UTILIZANDO NPS DE MAGNETITA RECOBERTAS COM DMSA.	125
FIGURA 75 NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA COM TPP FORMADAS A PARTIR DO MÉTODO DE GELIFICAÇÃO IÔNICA.	126
FIGURA 76 SISTEMAS DE ENCAPSULAÇÃO COM QUITOSANA VIA PROCEDIMENTO DE GELIFICAÇÃO IÔNICA. (A), (B) E (C) MET DAS NPS COM EACA FUNCIONALIZADAS COM AF. (D), (E) E (F) MET DAS NPS COM APTMS FUNCIONALIZADAS COM AF. (G) MEV DAS NPS COM EACA FUNCIONALIZADAS COM AF. (F) MEV DAS NPS COM APTMS FUNCIONALIZADAS COM AF.	127
FIGURA 77 (A) MECANISMO DA FORMAÇÃO DE IMINA NA NANOPARTÍCULA COM APTMS. (B) MECANISMO DA HIDRÓLISE DO RESPECTIVO SISTEMA	128
FIGURA 78 ESPECTROS DE ABSORÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA ANALÍTICA	130
FIGURA 79 ESPECTROS DE ABSORÇÃO DAS NPS RECOBERTAS COM APTMS E EACA E POSTERIORMENTE FUNCIONALIZADAS COM ÁCIDO FÓLICO.	131
FIGURA 80 DISTRIBUIÇÃO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO PELO NÚMERO DE NPS DOS SISTEMAS FUNCIONALIZADOS COM ÁCIDO FÓLICO.	132

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 TÉCNICAS DE SÍNTESES DE NPS DE FERRO E SUAS COMPARAÇÕES EM RELAÇÃO À MORFOLOGIA, VANTAGENS E DESVANTAGENS DAS TÉCNICAS.	26
TABELA 2 ALGUNS EXEMPLOS DE MOLÉCULAS UTILIZADAS NO RECOBRIMENTO DE NPS E SUAS PROPRIEDADES	34
TABELA 3 REAGENTES E QUANTIDADES NECESSÁRIOS PARA A PREPARAÇÃO DE 1 L DE TAMPÃO SBF.	47
TABELA 4 MÉTODOS UTILIZADOS NA ENCAPSULAÇÃO DE NPS DE MAGNETITA E SUAS VARIAÇÕES.	50
TABELA 5 VALORES DE POLIDISPERSIVIDADE E DE DIÂMETRO HIDRODINÂMICO MÉDIO DAS AMOSTRAS EM FUNÇÃO DOS PHs, OBTIDOS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE DLS. EM DESTAQUE, AS REGIÕES DE INSTABILIDADE COLOIDAL.	100
TABELA 6 VALORES DE ABSORBÂNCIA MÁXIMA NOS SISTEMAS DE NPS RECOBERTAS COM EACA E APTMS E SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES DE GRUPO AMINA LIVRE.	129
TABELA 7 VALORES DE ABSORBÂNCIA E CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO FÓLICO NAS NPS FUNCIONALIZADAS.	131

Sumário

1 Introdução.....	20
Fundamentação e Estado da Arte	21
1.1 Magnetismo	21
1.2 Magnetismo em nanoescala	22
1.3 Métodos de síntese de nanopartículas magnéticas	25
1.3 Estabilidade coloidal	29
1.5 Modificação de superfície de nanopartículas	31
1.6 Funcionalização da superfície das NPs	34
1.7 Aplicações das NPs recobertas	39
1.8 Justificativa do trabalho.....	41
2Objetivos	42
3 Procedimento experimental.....	43
3.1 Preparo das amostras	43
3.2 Síntese de nanopartículas de Fe ₃ O ₄ pelo método do poliol modificado ^{69, 70}	43
3.3 Modificação da superfície das NPs de magnetita	44
3.3.1 Lavagem da superfície da magnetita com metanol	44
3.3.2 Recobrimento com ácido aminocapróico (EACA) via troca de ligantes	45
3.3.3 Recobrimento com aminopropiltrimetoxissilano (APTMS) via adição de ligantes ⁷¹	45
3.3.4 Recobrimento com ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) via troca de ligantes ⁴³	46
3.4 Estabilidade coloidal das NPs de magnetita recobertas	46
3.5 Funcionalização das NPs de magnetita	48
3.5.1 Funcionalização das NPs de magnetita com ácido fólico (AF)	48
3.5.2 Funcionalização das NPs de magnetita via encapsulação com quitosana (QS)	50
3.6 Quantificação de ligantes na superfície das NPs de magnetita.....	52

3.6.1 Quantificação da concentração dos grupos amino livres na superfície das NPs	52
3.6.2 Quantificação da concentração dos grupos folato na superfície das NPs funcionalizadas	54
3.7 Procedimentos de caracterização e análises dos sistemas obtidos	55
3.7.1 Difractometria de raios X (DRX)	55
3.7.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	55
3.7.3 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	56
3.7.4 Medidas de estabilidade coloidal - DLS/Zeta	56
3.7.5 Magnometria de amostra vibrante (VSM)	57
3.7.6 Espectroscopia na região do UV-Vis	57
3.7.7 Espectroscopia de energia dispersiva de raios x (EDS)	57
3.7.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	57
4 Resultados e discussão	58
4.1 Síntese de nanopartículas de Fe ₃ O ₄ pelo método do poliol modificado ^{32, 70}	58
4.2 Modificação da superfície das NPs de magnetita	67
4.2.1 Lavagem da superfície com metanol	67
4.2.2 Recobrimento com ácido aminocaprílico (EACA) via troca de ligantes	72
4.2.3 Recobrimento com aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) via troca de ligantes ⁷¹	78
4.2.4 Recobrimento com ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) ⁴³	81
4.2.5 Ensaios de hipertermia das amostras de NPs recobertas	83
4.3 Estabilidade coloidal das NPs de magnetita recobertas	84
4.3.1 Estabilidade coloidal das NPs de magnetita recobertas com EACA, APTMS e DMSA	86
4.3.2 Estudos de estabilidade coloidal para otimização do tempo de reação no recobrimento com DMSA	95
4.3.3 Utilização da técnica de variação da transmitância para estudo da estabilidade coloidal	99
4.4 Funcionalização das NPs de magnetita com ácido fólico	101

4.4.1 1º procedimento: Funcionalização com ácido fólico via reação com carbodiimida na presença de NHS.....	106
4.4.2 2º procedimento: Funcionalização com ácido fólico via procedimento de interação direta com carbodiimida.....	109
4.4.3 3º procedimento: Funcionalização com AF protegido por t-boc	110
4.5 Funcionalização das NPs de magnetita via encapsulação com quitosana (QS)	113
4.5.1 Encapsulação de magnetita via procedimento adaptado de Calvo et al. ²⁸	114
4.5.2 Encapsulação de magnetita via processo emulsão água/óleo. ²⁹	119
4.5.3 Encapsulação de magnetita via processo de gelificação iônica ⁸²	122
4.6 Quantificação de ligantes na superfície das NPs de magnetita.....	127
4.6.1 Quantificação da concentração dos grupos amino livres na superfície das NPs	127
4.6.2 Quantificação da concentração dos grupos folato na superfície das NPs funcionalizadas	129
5 Conclusões e perspectivas	133
6 Referências	135

1 Introdução

Atualmente, nanopartículas (NPs) com propriedades funcionais tem se destacado e são estudadas para uma ampla gama de aplicações. Uma destas aplicações estudadas há cerca de 50 anos, é a síntese de nanopartículas magnéticas (NPMs) como agentes de contraste para diagnósticos *in vivo*. Porém, na última década, a síntese destes compostos se desenvolveu não somente para o interesse científico fundamental, mas também para aplicações tecnológicas na biomedicina como entrega controlada de fármacos, contraste de ressonância magnética nuclear, hipertermia magnética para terapia de câncer, separação e transporte controlados por campo magnético assistido, além de aplicações em outras áreas como a gravação magnética de ultra-alta densidade, e a síntese de materiais híbridos.¹⁻³

O desenvolvimento de NPs com aplicações biológicas deve-se ao fato de que as estas possuem vantagens em relação a outros materiais, como o custo relativo de produção, a estabilidade química e física do sistema, elevada razão área de superfície/volume, dentre outras.^{1,3} Uma vantagem das nanopartículas em comparação a partículas maiores é sua administração intravenosa: os menores capilares no corpo humano possuem diâmetros entre 5 e 6 μm , e o tamanho destas nanopartículas são significativamente menores que estes valores, garantindo que estas não causem embolia.⁴

Um desafio para a nanociência é desenvolver carreadores de fármacos “inteligentes”. Ao utilizar NPs funcionalizadas de modo que estas direcionem-se diretamente à célula cancerígena, obtém-se um sistema mais eficaz e com efeitos colaterais menos agressivos aos pacientes em comparação à quimioterapia.⁵⁻⁷ Cumprir com este desafio torna-se uma tarefa interdisciplinar entre físicos, químicos, biólogos, farmacêuticos e demais profissionais que permitam o desenvolvimento de sistemas coloidais de entrega.⁸

Fundamentação e Estado da Arte

1.1 Magnetismo

O magnetismo, do ponto de vista da teoria clássica, é resultado da existência dos movimentos dos elétrons nos átomos e consequentemente dos seus momentos magnéticos nos átomos individuais. Momentos magnéticos possuem duas origens: movimento orbital em torno do núcleo (μ_l), e movimento de spin em torno do próprio eixo de rotação do elétron (μ_s) (Figura 1).⁹

Figura 1 Origem dos momentos magnéticos no átomo, (a) movimento orbital (μ_l) e (b) movimento de spin eletrônico (μ_s).

Fonte: Autoria própria. Adaptado de Cullity, B. D.; Graham, C. D.⁹

Ao considerar apenas um átomo, os momentos magnéticos de orbital e de spin acoplam-se, cancelando totalmente ou dando origem a soma resultante destes. Assim, um átomo multi eletrônico possui como momento magnético total, a soma dos momentos magnéticos de todos os seus elétrons, incluindo as contribuições de spin e de orbital (Equação 1). O magnetismo observado nos átomos é uma consequência ou não do cancelamento destes momentos, e o não cancelamento leva ao momento magnético atômico resultante.

$$\mu_{atômico} = \sum_z (\vec{\mu}_l + \vec{\mu}_s) \quad (\text{Equação 1})$$

Segundo o princípio de exclusão de Pauli, somente dois elétrons de spins opostos podem ser alocados em cada orbital. Elétrons de spins opostos possuem momentos magnéticos também opostos, logo, seus números quânticos magnéticos de spin (m_s) devem ser diferentes em cada orbital, a fim de que seus momentos magnéticos se cancelem. Átomos que possuem subcamadas completamente preenchidas e aqueles que em todos os elétrons estão emparelhados, não apresentam magnetismo, seja ele permanente ou resultante.

Por outro lado, segundo a regra de Hund, nos átomos em que a subcamada não é totalmente preenchida, a distribuição eletrônica em uma mesma subcamada deve ser a que possua maior número de elétrons desemparelhados, caracterizando o estado de menor energia. Devido a isso, átomos com a camada de valência parcialmente preenchida podem exibir momento magnético permanente (Figura 2).^{9, 10}

Figura 2 - Distribuição eletrônica no estado fundamental para os átomos de ferro (Fe), cobalto (Co) e níquel (Ni) demonstrando a presença de elétrons desemparelhados e justificando seus comportamentos magnéticos

Fonte: Autoria própria.

1.2 Magnetismo em nanoescala

Uma das principais características de materiais em escala nanométrica é o fato de que algumas propriedades diferem das características de um sólido estendido, também conhecido como “efeito de tamanho”. Com relação a NPMs, são dois os efeitos de tamanho: o limite de monodomínio e o limite superparamagnético.¹¹

Em partículas de maior escala, existem regiões denominadas multidomínios, onde regiões de magnetização uniformes são separadas por paredes de domínio. A formação de paredes de domínio é um processo direcionado pelo equilíbrio entre a

energia magnetostática, que aumenta proporcionalmente com o volume dos materiais, e à energia das paredes de domínio, que aumenta proporcionalmente com a área interfacial entre os domínios. Reduzindo-se o tamanho da partícula, há um volume crítico abaixo do qual necessita-se de mais energia para criar paredes de domínio do que suportar a energia magnetoestática de um estado de monodomínio (*single domain*, SD). Como consequência, as nanopartículas possuem um diâmetro crítico D_c , em que abaixo deste não se exibem mais múltiplos domínios e as nanopartículas se exibem como SD. Este diâmetro crítico geralmente está na faixa de algumas dezenas de nanômetros e depende do material.¹¹

Assim, cada nanopartícula possui uma alta constante de momento magnético e se comporta como um grande átomo paramagnético, apresentando rápida resposta a um campo magnético aplicado, com remanência e coercividade insignificantes. A remanência é o magnetismo residual que permanece no circuito após a remoção do campo externo aplicado. A coercividade é o campo que deve ser aplicado para que não haja magnetização remanente (Figura 3). A ausência de remanência e coercividade tornam as NPMs um sistema interessante para aplicações biológicas, visto que a resposta magnética apenas com a aplicação de um campo externo reduz efeitos de aglomeração por interações de acoplamento magnético.¹¹

Figura 3 Curva de magnetização vs campo magnético para nanopartículas superparamagnéticas (SPM) e ferromagnéticas (FM). São indicados o campo coercitivo (H_C), a magnetização de saturação (M_S) e da magnetização remanente (M_R)

Fonte: Adaptado de Figuerola, A.; *et al.*¹²

Pelo gráfico observado na Figura 4 , nota-se que na região de multidomínios, a coercividade intrínseca aumenta à medida que o diâmetro da partícula diminui. O número de domínios magnéticos diminui conforme o tamanho da partícula diminui, e os domínios tornam-se fortemente acoplados, aumentando a coercividade intrínseca da partícula.

Figura 4 Variação da coercividade intrínseca (H_{ci}) em função do diâmetro da partícula.

Fonte: Adaptado de Cullity, B. D.; Graham, C. D. ⁹

Por dados experimentais, foi encontrado que para alguns materiais a dependência da coercividade intrínseca com o tamanho é dada aproximadamente pela Equação 2 , em que a e b são constantes fenomenológicas, relacionadas à polarização e despolarização magnética. ⁹

$$H_{ci} = a + \frac{b}{D} \quad \text{Equação 2}$$

Conforme já descrito qualitativamente, abaixo do diâmetro crítico D_c , a partícula torna-se um monodomínio e sua coercividade atinge um valor máximo. Cada partícula possui o comportamento de um ímã e os acoplamentos interpartículas acontecem de forma que o alinhamento depende da rotação da partícula toda e não mais das paredes de domínio, que podem rotacionar gradativamente. Ao diminuir ainda mais o tamanho da partícula, abaixo do diâmetro crítico, a coercividade da partícula diminui à medida que o diâmetro da partícula diminui de acordo com a Equação 3, onde g e h são constantes: ^{9, 13}

$$H_{ci} = g - \frac{h}{D^{3/2}} \quad \text{Equação 3}$$

A coercividade é nula quando se alcança o diâmetro crítico D_p . Nesta faixa de tamanho as partículas são chamadas superparamagnéticas. Em partículas compostas apenas por um monodomínio, a energia anisotrópica magnética, responsável em manter o momento magnético estabilizado em uma determinada direção, é expressa pela Equação 4, na qual V é o volume da partícula, K_{ef} é a constante anisotrópica e ϑ é o ângulo entre a magnetização e o eixo de fácil magnetização: ^{9, 13}

$$E(\theta) = K_{ef}V \sin^2 \theta \quad \text{Equação 4}$$

À medida que o diâmetro da partícula diminui, a energia anisotrópica $K_{ef}V$ também diminui até ser excedida pela energia térmica $k_B T$, onde k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura. Desta forma, quando $K_{ef}V < k_B T$, o limite superparamagnético é atingido. Estes materiais superparamagnéticos têm como principal característica o fato de não apresentarem histerese magnética (coercividade e remanência nulas). ^{9, 13}

1.3 Métodos de síntese de nanopartículas magnéticas

Nanopartículas magnéticas tem sido sintetizadas com variadas composições e fases, como nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4 e $\gamma-Fe_2O_3$), nanopartículas metálicas (Fe e Co), ferrimagnéticas ($MgFe_2O_4$ e $CoFe_2O_4$), entre outros. Várias rotas sintéticas eficientes são utilizadas na síntese destas nanopartículas, com controle morfológico (tamanho e forma), além de alta estabilidade e com característica de sistemas monodispersos.¹¹

Vários métodos de síntese de nanopartículas de ferro são conhecidos, como observado na Tabela 1, onde alguns destes são detalhados. ¹⁴ A escolha do método de síntese deve ser baseada no objetivo de aplicação de cada sistema, para que desta forma possa ser selecionado o melhor procedimento e morfologia das nanopartículas.

Tabela 1 Técnicas de sínteses de NPs de ferro e suas comparações em relação à morfologia, vantagens e desvantagens das técnicas.

	Técnicas		Morfologia resultante		Vantagens		Desvantagens		Referências
Física	Deposição em fase gasosa		Esferas regulares e irregulares		Fácil execução		Difícil controle de tamanho da partícula		¹⁵
	Litografia de feixe de elétrons		Esferas e bastões		Espaço interpartículas bem controlado		Requer equipamentos complexos e caros		¹⁶
Química	Método Sol-Gel		Esferas, esferas irregulares, com ou sem poros		Bom controle de forma, tamanho e estrutura		Baixa resistência ao desgaste, alta permeabilidade, ligações fracas		¹⁷
	Oxidação		Partículas alongadas e irregulares, esferas		Distribuição estreita e uniforme de tamanho		Ferritas coloidais de tamanho muito pequeno		¹⁸
	Coprecipitação		Esferas		Método simples e eficaz		Não é apropriada para sínteses que requerem boa proporção estequiométrica		¹⁹
	Decomposição térmica		Esferas, cubos, bastões		Estreita distribuição de forma e tamanho		Altas temperaturas, atmosfera controlada		^{20, 21}
	Hidrotermal		Partículas alongadas, esferas irregulares, formas variadas		Tamanho e forma de partícula facilmente controlados		Alta pressão e temperatura na síntese		²²
	Injeção de fluxo		Pequenos bastões, esferas irregulares, folhas, formas rômbricas		Homogeneidade, controle do procedimento e boa reprodutibilidade		Fluxo laminar em reator capilar requer que a mistura de reagentes seja segmentada		²³
	Eletroquímica		Nanopartículas esféricas, nanobastões, nanocristais hexagonais, facetados		Tamanho de partícula controlado		Difícil reprodução		¹⁷
	Aerosol		Monocristais mesoporosos, pequenas partículas		Produtos em larga escala		Requer temperaturas muito altas		²⁴

	Decomposição sonoquímica	Bipirâmides, esferas ou bastões truncados	Estreita distribuição de tamanho de partículas	Por enquanto é um mecanismo pouco compreendido	²⁵
	Método do fluido supercrítico	Monocristais mesoporosos, nanotubos irregulares	Síntese eficiente, sem utilização de solventes orgânicos	Necessita de altas temperaturas e pressões críticas	²⁶
	Utilizando nanoreatores	Nanopartículas esféricas e ocas	Possibilidade de controle específico de tamanho das nanopartículas	Condições dificultadas	²⁷
Biológica	Incubação microbiana	Pequenas plaquetas, esferas tipo haste, esferas irregulares	Boa reprodutibilidade em boa escala, baixo custo, alto rendimento	Síntese lenta e trabalhosa	²⁸

Fonte: Adaptado de Ali, A. et al. ¹⁴

Neste trabalho, foi selecionado o método de decomposição térmica para síntese das nanopartículas de magnetita. Métodos químicos envolvendo decomposição térmica de precursores orgânicos contendo o íon do metal de interesse têm demonstrado grande eficácia no controle de tamanho, morfologia, arranjos bi e tridimensionais, composição, entre outras propriedades desejadas das nanopartículas obtidas. Em sua grande maioria, tais métodos consistem na utilização direta ou com pequenas modificações do método conhecido como processo poliol.

Como importante vantagem do método do poliol, ressalta-se que os políols tornam-se redutores em elevadas temperaturas. Consequentemente, estas moléculas podem reduzir instantaneamente cátions metálicos dissolvidos no meio de síntese para formar nanopartículas metálicas. Durante este processo, as nanopartículas adquirem funcionalidade superficial e estabilizam-se no meio reacional com excesso de solvente. Devido a isso, a síntese via método do poliol pode ser considerada como uma reação de único recipiente em que vários recursos são combinados neste único procedimento. ²⁹

O método do poliol foi publicado inicialmente por Fievet et al. ²⁰, em 1989, utilizando etilenoglicol para a síntese de nanopartículas metálicas através da redução de íons em altas temperaturas. Porém, a difusão do método poliol foi realizada pelos trabalhos de Sun et al. ^{21, 30}, em que o etilenoglicol foi substituído por um alcanodiol de cadeia longa (1,2-hexadecanodiol), e baseia-se na decomposição térmica de um precursor metálico contendo o metal e/ou metais de interesse em um solvente orgânico

com alto ponto de ebulição, na presença de surfactantes. Tal procedimento resulta na formação de um sistema de nanopartículas monodispersas. Entre os precursores metálicos mais utilizados atualmente encontram-se os acetilacetonatos metálicos e complexos carbonílicos. Os surfactantes utilizados são compostos orgânicos de longa cadeia carbônica, tais como: ácido oléico, oleilamina e hexadecilamina.¹¹

Atualmente existem muitas variantes do método poliol e suas modificações são feitas principalmente na substituição dos precursores metálicos carbonílicos por precursores de menor toxicidade. A utilização de compostos carbonílicos em síntese como estas é dificultada pela necessidade de trabalho em altas temperaturas, pois a volatilidade destes compostos faz com que parte do reagente adicionado à síntese acabe não participando da reação, dificultando assim o controle sobre a composição das partículas. Neste ponto reside a maior vantagem da utilização de sais acetatos e acetilacetonatos como precursores metálicos, uma vez que por apresentarem volatilidade desprezível, o controle sobre a composição do produto final é amplamente facilitado. Seguindo esta linha de pesquisa, inúmeros trabalhos já foram publicados acerca da utilização de acetatos e acetilacetonatos, como os descritos por Varanda, L.C.^{31 32} Sun, S. et al.³³, Yu, W.W. et al.³⁴, dentre outros.

Os fatores determinantes neste método de síntese são o controle e a separação das fases de nucleação (formação inicial dos clusters atômicos de forma homogênea) e o crescimento. Tendo como base o diagrama de LaMer e Dinegar (Figura 5), alcança-se a monodispersividade quando, primeiramente, a nucleação ocorre rapidamente em um curto período de tempo, através de uma solução supersaturada seguida de uma etapa de crescimento lenta sem que ocorra nucleação significativa novamente. Tal mecanismo favorece a formação /de nanopartículas relativamente pequenas e monodispersas (processo I). Porém, partículas uniformes, mas com tamanhos maiores, também podem ser obtidas por múltiplas nucleações através de processos em que pequenas partículas se dissolvem para posterior redeposição sobre a superfície das partículas maiores, processo este conhecido por envelhecimento de Ostwald (processo III). Por este motivo, controla-se o tempo de síntese e interrompe-se após a formação das partículas, para evitar que ocorram processos de envelhecimento e agregação (processo II), é possível evitar a ocorrência de polidispersividade do sistema.^{11, 35, 36}

Figura 5 Ilustração do mecanismo de formação de partículas uniformes baseado no modelo clássico de LaMer e Dinegar.

Fonte: Adaptado de Tartaj, P. et al. ³⁵

1.3 Estabilidade coloidal

As propriedades das partículas magnéticas são os principais fatores para a determinação da estabilidade coloidal, incluindo todas as modificações de superfície que visem promover maior afastamento das nanopartículas e/ou aumentar o tempo na qual a mesma permanece em suspensão. As principais medidas usadas para melhorar a estabilidade de ferrofluidos, por exemplo, são o controle da superfície carregada (repulsão eletrostática) e a utilização de tensoativos específicos (repulsão estérica).²² (Figura 6)

Existem alguns fatores envolvidos na estabilidade coloidal. Na síntese de nanopartículas os fenômenos de agregação e crescimento das partículas resultam na diminuição de sua área de superfície, ocasionando diminuição de energia livre do sistema e fazendo com que estes processos sejam termodinamicamente favorecidos. Além disso, quando dispersas, as nanopartículas apresentam um movimento contínuo e aleatório que confere maior estabilidade a estas frente à agregação e precipitação, sendo este tipo de movimento denominado movimento browniano. Este movimento pode levar a um maior número de colisões entre partículas, em que, com energia suficiente para atraírem-se, pode dar origem a partículas de massas mais elevadas, consequentemente mais suscetíveis a ação da força gravitacional, originando os floculados, aglomerados ou agregados, o que torna o sistema não aplicável em biomedicina. Ao utilizar um recobrimento adequado, além de possibilitar um aumento

na estabilidade coloidal, é possível conciliar a presença de grupos funcionais livres na superfície das nanopartículas.³⁷

Figura 6 Mecanismos de estabilidade coloidal: repulsão estérica e eletrostática em uma nanopartícula.

Fonte: Autoria própria

De acordo com a DLVO (*Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek*), a estabilidade de uma partícula em solução é dependente da função da energia potencial (V_T). Essa teoria reconhece que essa energia é dependente da energia potencial do solvente (V_s), da força atrativa (V_A) e da força repulsiva (V_R), onde³⁸

$$V_T = V_s + V_A + V_R, \quad \text{Equação 5}$$

$$V_A = \frac{-A}{(12\pi D^2)} \quad \text{Equação 6}$$

$$V_R = 2\pi\epsilon a \zeta^2 e^{-(\kappa D)} \quad \text{Equação 7}$$

(D = separação das partículas, A = constante de Hamaker, π = permeabilidade do solvente, a = raio da partícula, ζ = potencial zeta, κ = função da composição iônica)

Logo, observa-se que as forças atrativas são dependentes da distância entre as partículas, e as forças repulsivas são dependentes da permeabilidade do meio, do potencial zeta (ζ) e da função da composição iônica. A teoria DLVO propõe que uma energia repulsiva impede que duas partículas aproximando-se uma da outra fiquem juntas. Mas se as partículas colidem com energia suficiente para quebrar esta barreira de energia, a força atrativa irá mantê-las em contato, fazendo com que estas fiquem aderidas forte e irreversivelmente. Desta forma, se as partículas possuem repulsão o suficiente, a dispersão irá resistir à floculação e o sistema coloidal será estável. Porém, se o mecanismo de repulsão não existe, a floculação irá ocorrer.³⁸

A camada de hidratação ao redor da partícula é dividida em duas partes: a camada mais interna (camada de Stern), onde os íons são fortemente atraídos, e uma exterior (camada difusa), onde estes íons são menos associados. Dentro da camada difusa há um

limite teórico interno no qual os íons e partículas formam uma unidade estável. Quando uma partícula se movimenta, os íons dentro deste limite tendem a se mover também. Estes íons além deste limite se mantêm no dispersante. A diferença de potencial neste limite (superfície do cisalhamento hidrodinâmico) é denominada potencial zeta. (Figura 7). A importância do valor deste potencial se dá no estudo da estabilidade coloidal de determinado sistema. Se todas as partículas em suspensão possuem um alto potencial zeta (seja este positivo ou negativo, denominado em maioria na literatura como um valor maior que +30 mV ou menor que -30mV), então estas tendem a se repelir e não há a tendência das partículas se atraírem. Caso este valor seja baixo, não há força para prevenir que as partículas estejam juntas e floculadas.³⁸

Figura 7 Esquema da representação do significado de potencial zeta.

Fonte: Adaptado de Malvern LTD ³⁸

1.5 Modificação de superfície de nanopartículas

As diversas aplicações das NPMs requerem que seus sistemas sejam monodispersos e estáveis em solventes de diversas polaridades. Conforme já descrito no item 1.3 deste trabalho, grande parte das rotas sintéticas de NPMs, incluindo a do poliol, possui a restrição de resultar em produtos com longas cadeias alifáticas, sendo estas não compatíveis com o meio biológico e aplicações *in vivo*. As rotas sintéticas

realizadas em fase aquosa geralmente resultam em nanopartículas com altas distribuições de tamanho e desempenho magnético reduzido.²

Além disso, sobre a biocompatibilidade e toxicidade das NPMs utilizadas, as partículas de óxido de ferro, como a magnetita, ou a sua forma oxidada, a maghemita, são as mais comumente empregadas para aplicações biológicas. Porém, a alta concentração local de Fe torna-se tóxica aos organismos, e estas podem ser evitadas pelo recobrimento destas NPMs.^{14,35}

Para aplicações *in vivo*, as NPMs devem ser recobertas com uma molécula biocompatível durante ou após a síntese para evitar a formação de grandes agregados, além de prevenir alterações em suas estruturas originais e a biodegradação quando expostas ao sistema biológico. Esta molécula, geralmente polimérica, permitirá a posterior funcionalização por ligação covalente, adsorção ou aprisionamento nas NPMs.³⁵ O revestimento adequado permite a entrega controlada do material, garantindo sua compatibilidade.¹⁴

Surfactantes e/ou polímeros são utilizados frequentemente para “passivar” a superfície das nanopartículas, durante ou após a síntese evitando sua aglomeração. Um surfactante iônico consiste de uma molécula que contém um segmento hidrofóbico e um componente hidrofílico. Como exemplos de surfactantes, pode-se destacar o uso de oleato de sódio, dodecilamina, carboximetil celulose. A biocompatibilização destes sistemas com estes revestimentos é dada por meio de adição ou troca de surfactantes, como observado na Figura 8^{22, 39,40}

O segmento hidrofóbico do surfactante forma uma estrutura de dupla camada com a cadeia de hidrocarbonetos original, enquanto os grupos hidrofílicos são expostos para o exterior das nanopartículas, o que permite sua dispersão em meio aquoso. A troca de surfactante é a substituição direta do surfactante original por um novo surfactante bifuncional. Este novo surfactante por sua vez tem um grupo funcional capaz de ligar-se a superfície da nanopartícula através de uma forte ligação química e o outro grupo funcional tem um lado polar de modo que a nanopartícula pode ser dispersa em água, ou sofrem funcionalizações adicionais.^{22, 39}

Figura 8 Esquema mostrando a troca e adição de surfactantes na superfície da NPM, conferindo à ela um caráter hidrofílico.

Fonte: Autoria própria

São inúmeros os materiais estudados e reportados na literatura que possuem como objetivo o recobrimento para biocompatibilização das NPs. Os materiais de recobrimento das NPs podem ser sintéticos (polietilenoglicol (PEG), álcool polivinílico (PVA), polivinil-pirrolidona (PVP) ¹⁷), ou naturais (gelatina, dextrana, quitosana ^{41, 42}). Podem ser citados exemplos de polímeros de lipídios, proteínas, dendrímeros, gelatina. Moléculas especiais, tais como ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA)⁴³, dopamina ⁴⁴ e silanos ⁴⁵ também foram estudados para este fim. É citado o estudo de silanos que foram empregados para a troca de ligantes hidrofóbicos na estrutura da ferritas magnéticas⁴⁵. O grupo terminal dos silanos (incluindo isociano, acrilato, tiol, amino e grupos carboxílicos) oferece extensão química na modificação de nanoestruturas.

De maneira geral, os ligantes que estabilizam as nanopartículas contra a agregação podem ser consistidas somente em uma cadeia molecular inerte (hidrocarbonetos, PEG) ou com alguma funcionalidade (geralmente com grupos funcionais ácido carboxílico), que estabilizam as nanopartículas por repulsão eletrostática e podem ser utilizados para uma conjugação posterior com outras moléculas. ⁴⁶

Os objetivos da utilização de recobrimentos variam desde a proteção do núcleo magnético contra a corrosão ou deterioração, até a adição de diferentes funções químicas e físicas para aplicações diversas. ¹⁴ Desta forma, a escolha do material a ser

utilizado no recobrimento das partículas deve ser feita conforme a aplicação a qual se destina o produto final. Neste contexto, a literatura apresenta inúmeras estratégias de recobrimento com materiais inorgânicos, poliméricos, surfactantes e biológicos.¹ Na Tabela 2 são apresentados exemplos de moléculas mais utilizados no recobrimento de nanopartículas magnéticas e suas respectivas características/funções.

Tabela 2 Alguns exemplos de moléculas utilizadas no recobrimento de NPs e suas propriedades

Natureza da molécula	Molécula	Propriedades importantes
Natural	Dextrana	Boa estabilidade, biocompatível
	Quitosana	Hidrofílica, biocompatível, apropriada para entrega de genes
	Amido	Biocompatível, apropriado para agente de contraste de RMN e entrega controlada
	Gelatina	Biocompatível, hidrofílica
Sintético	PEG	Boa estabilidade, hidrofílico, biocompatível
	PVA	Melhora a monodispersividade
	PLA	Biocompatível, biodegradável
	PMMA	Apropriado para entrega controlada e separação celular

Fonte: Adaptado de Ghazanfari, M. R. et al.⁴⁷

1.6 Funcionalização da superfície das NPs

A facilidade de modificação de superfície das NPs possibilita a inserção de grupos para serem conjugados, permitindo a segmentação específica destas para determinadas funcionalidades. Por exemplo, a conjugação de moléculas específicas para a entrega controlada de fármacos contra o câncer para uma maior eficácia terapêutica.⁴⁸

A funcionalização pode ser entendida como um novo recobrimento sobre o núcleo magnético previamente recoberto, realizado com moléculas biológicas tais como: anticorpos, proteínas, diversos agentes terapêuticos, DNA/RNA mediadores, agentes facilitadores de permeação, fármacos,⁴⁹ conferindo novas características e propriedades ainda mais específicas como biosseletividade e/ou funcionalidade às nanopartículas. Essas funcionalizações adicionais permitem que as nanopartículas

passem a reconhecer especificamente a membrana de determinadas células ou grupos ativos de certas proteínas.

As novas moléculas presentes no recobrimento são denominadas de ligantes funcionais⁵⁰, cuja eficiência dos processos para os quais as mesmas são utilizadas parece depender intimamente da natureza e de um rigoroso controle da quantidade dessas biomoléculas presentes na superfície das nanopartículas magnéticas. A presença dessas moléculas com funções específicas leva a uma classe ainda mais abrangente de nanopartículas multifuncionais, conforme mostrado na *Figura 9*, denominado de nanopartículas teranósticas, ou seja, capazes de realizar terapia e diagnóstico numa única plataforma.

Figura 9 Esquema mostrando uma nanopartícula magnética com diversos ligantes funcionais possibilitando multifuncionalidade numa única nanopartícula.

Fonte: Adaptado de Hyeon, T.⁵¹

A disponibilidade de grupos livres na etapa inicial de hidrofilição da superfície das NPs é o que dita a possibilidade de uma posterior funcionalização. Grupos carboxílicos podem reagir com aminas primárias por meio de uma reação de condensação para produzir ligações amidas. Para isso, uma carbodiimida solúvel em água (por exemplo 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, EDC) é comumente utilizada. Seu composto intermediário, contendo um grupo carboxílico ativado, é reativo em relação às aminas primárias (estas disponíveis na superfície da NP), e compostos de

ésteres ativos (N-hidroxi-succinimida, NHS) são utilizados para formar as ligações amida.

46

Por exemplo, o ácido fólico pode ser conjugado com moléculas que possuam grupos amino livres para atingir as propriedades de segmentação. A conjugação de folato nestas moléculas pode melhorar a transfecção de genes ou a promover a eficiência da internalização devido à absorção de folato promovida pelos receptores das células tumorais. Folatos, embora presentes em quantidades anormalmente elevadas em células cancerígenas, são raramente encontrados em superfícies de células normais. O ácido fólico é considerado um ligante alvo para alguns tipos de células cancerígenas, devido aos elevados níveis de receptores folatos contidos nestas, especialmente em câncer de ovário. Em contraste, a quantidade de receptores folato é comparativamente baixa em tecidos normais, um fato que faz uma abordagem seletiva de células positivas para receptores folato, o que permite a prevenção de efeitos colaterais em tecidos saudáveis.^{8,52}

Como o ácido fólico é estável, não imunogênico e possui baixo valor comercial, além de ter uma curta cadeia e um pequeno tamanho comparado com alguns anticorpos, ele é escolhido para sistemas multifuncionais, tendo células cancerígenas como alvo⁵³. A Figura 10 mostra um diagrama do processo de endocitose mediada pelo receptor folato das nanopartículas nas células alvo. Primeiramente o conjugado NP-folato se liga aos receptores folato para que seja fagocitado e internalizado na célula. Assim, a liberação do fármaco é iniciada pelo ambiente de pH baixo do endossoma, e posteriormente os agentes de imagem e/ou os fármacos são liberados para a célula e o receptor folato pode ser reciclado e retornado para a célula.⁵⁴

Figura 10 Esquema de endocitose de fármaco e agente de imagem realizada via receptores folato.

Fonte: Adaptado de ZWICKE, G. L.⁵⁴

Ligações covalentes de moléculas ou fármacos na superfície das nanopartículas são normalmente favorecidas devido à diferença na força de ligação. A ligação covalente entre a superfície da nanopartícula e o ácido fólico é preferida e pode ser realizada via ligação peptídica⁵⁵. Funcionalizando a superfície das nanopartículas através de uma ligação covalente, a liberação do ácido fólico em condições intravenosas não ocorrerá antes de atingir o alvo específico. A clivagem da ligação amida ocorre sob as condições no compartimento lisossômico, ou seja, baixo pH e na presença de lisoenzimas, um ambiente típico no interior das células cancerígenas.⁵⁶

Da mesma forma que nanopartículas podem ser revestidas por macromoléculas, estas mesmas podem passar por um método de encapsulação, que tem como objetivo a entrega direcionada destas nanopartículas funcionalizadas ou somente biocompatibilizadas. Um polímero muito utilizado e difundido na literatura neste método de encapsulação é a quitosana.^{57,58,59,60,61} A quitosana é um polissacarídeo biodegradável e bioadesivo, constituído por um copolímero de glucosamina e N-acetil-D-glucosamina conjugadas por ligações glucosídicas β (1,4). Por ser biocompatível, possuir baixa toxicidade, ter características bioadesivas e de permeabilidade, a quitosana tem sido utilizada na indústria farmacêutica e em áreas médicas a fim de que se realize a entrega de materiais terapêuticos, como: proteínas, oligonucleotídeos e genes. As nanopartículas de quitosana podem ser preparadas por vários métodos,

como: reticulação química, reticulação iônica, coalescência por emulsão de gotículas, micela reversa, modificação química.⁵⁸

Nanopartículas de quitosana são carreadores de fármacos com um amplo desenvolvimento e possuem a vantagem de uma liberação lenta e controlada destes, melhorando a solubilidade e a estabilidade do fármaco, aumentando sua eficácia e consequentemente reduzindo a toxicidade do sistema em meio biológico. Por conta de seu pequeno tamanho, estas nanopartículas são capazes de passar por barreiras biológicas *in vivo* e aumentar a eficácia da entrega de fármacos no local específico.⁶¹ A quitosana pode atuar diretamente em células tumorais, pois interfere no metabolismo celular, inibe o crescimento ou induz à apoptose celular. Ela também tem o papel de melhorar a imunidade antitumoral do corpo.⁶²

Estudos publicados na literatura comprovam a eficiência da entrega controlada do sistema contendo quitosana, sendo seu pH mais sensível à degradação igual a 4,0, corroborando com as características de células cancerígenas, que aumentam a acidez em suas barreiras.⁶³ Sob ação de enzimas, a quitosana é biodegradada produzindo água e dióxido de carbono, sem efeitos adversos.⁶¹ O possível mecanismo de entrega de NPMs controlado pelas nanopartículas de quitosana é esquematizado na *Figura 11*, deduzido através de evidências experimentais na literatura.⁶³

Figura 11 Possível mecanismo de entrega controlada pelo pH de NPMs pela matriz de quitosana.

Fonte: Adaptado de VIVEK, R. et al.⁶³

1.7 Aplicações das NPs recobertas

Conforme já mencionado, NPMs possuem diversas aplicações, e nesta seção serão abordadas suas utilizações em biomedicina. Nanopartículas magnéticas biocompatíveis tem sido estudadas para fins de aplicação em biomedicina em diversas áreas, como na melhoria de contraste em imagem por ressonância magnética, como agentes terapêuticos de liberação específica, além de uso em hipertermia e terapia por campo magnético assistido.⁶⁴

A biocompatibilidade e toxicidade de NPMs são critérios importantes a serem considerados para suas aplicações em biomedicina. Para determinar estes parâmetros, considera-se a natureza do componente, o tamanho final das NPs funcionalizadas e a estabilidade coloidal do sistema. Idealmente, as NPMs também devem possuir alta magnetização para que sua movimentação no fluxo sanguíneo pudesse ser controlada pelo campo magnético externo até se imobilizar no tecido patológico de interesse.⁶⁴

Nos sistemas convencionais de entregas de fármacos, seja por ingestão oral ou intravenosa, a distribuição destes é feita por todo o corpo através da circulação sanguínea. Para a maioria dos agentes terapêuticos convencionais, apenas uma pequena parcela da medicação atinge seu alvo e há uma difusão do medicamento através de barreiras biológicas que causam alta incidência de efeitos colaterais. A entrega vetorizada de fármacos reduziria este fato, visto que o objetivo é o de concentrar a medicação em tecidos de interesse, reduzindo sua concentração nos demais tecidos, pois seu mecanismo de interiorização nas barreiras biológicas visa uma estratégia de segmentação ativa.⁶⁵ Baseando-se em fármacos diretamente ligados à NPMs, o direcionamento destes por meio de um campo externo aplicado torna-se um método de tratamento promissor, pois evita efeitos colaterais, principalmente no caso da quimioterapia, pois reduz a distribuição sistêmica de fármacos e reduz as doses de compostos citotóxicos.^{64, 66} Na Figura 12 é mostrado o esquema deste tipo de entrega de fármacos, em que as NPMs concentram-se no tecido pois são direcionadas pelo campo magnético externo aplicado, acumulando-se no tumor alvo para que os fármacos sejam liberados.⁶⁷

Figura 12 Esquema representando o sistema da entrega controlada de fármacos via nanopartículas magnéticas.

Fonte: Adaptado de WEI, W. et al.⁶⁷

Além do mecanismo de entrega controlada de fármacos, a hipertermia magnética tem sido considerada uma boa alternativa para o tratamento de câncer. A hipertermia é o aquecimento de células na faixa de 41-47 °C, causando a morte preferencial de células tumorais.⁶⁷ Partículas magnéticas nestas condições são capazes de manter esta alta temperatura por 30 minutos ou mais.⁶⁵ Quando NPMs são submetidas à um campo magnético alternado, ou uma alta frequência oscilante (por volta de 1MHz), o aquecimento é resultado da combinação de flutuações internas do momento magnético, histerese e flutuações brownianas externas, que são todas características que dependem das propriedades magnéticas das NPs. Algumas dificuldades ainda são enfrentadas, como o aquecimento em temperatura muito elevada, dificultando a manutenção de temperatura nos tecidos saudáveis, devido a isto são desenvolvidos tratamentos de aquecimento localizado à células cancerígenas.^{64,67,}

1.8 Justificativa do trabalho

Diante do exposto acerca do estado da arte em pesquisas envolvendo NPMs para aplicações biomédicas, a intenção inicial deste trabalho é a de proporcionar biocompatibilidade à superfície das NPs de magnetita sintetizadas, conferindo à estas principalmente uma boa condição de estabilidade coloidal. A motivação baseia-se também em realizar procedimentos de recobrimento eficientes, simples e com custo e tempo de execução relativamente menores do que os já existentes na literatura, a fim de que seus resultados possam ser futuramente aplicados no objetivo final de produção de fármacos.

Nanopartículas de magnetita após as devidas etapas de recobrimento visam a sua ação em agentes alvo, e para isto buscou-se melhorar parâmetros e desenvolver sistemas que possibilitem esta funcionalização para fins específicos. Para isto, foi realizada a escolha do ácido fólico devido ao seu difundido uso na literatura, e também houve a intenção de conferir esta funcionalidade por meio de encapsulação destas nanopartículas em matrizes de quitosana, uma molécula que atualmente é fruto de muitos estudos para fins de entrega controlada de fármacos. Por ser este um desenvolvimento inédito, necessitou-se do estudo e modificação de alguns parâmetros para adaptação dos melhores sistemas.

2 Objetivos

Objetivo geral:

O trabalho tem como meta os procedimentos de recobrimento e estudo da estabilidade coloidal de NPs de magnetita para posterior funcionalização via ácido fólico ou encapsulação com quitosana.

Objetivos específicos:

- Promover a síntese de nanopartículas de magnetita com controle de composição, tamanho e forma;
- Adequar métodos de recobrimento para a obtenção de nanopartículas devidamente hidrofílicas em sistemas monodispersos;
- Caracterizar química e estruturalmente os sistemas obtidos, antes e após as modificações de superfície para que se estabeleçam metodologias de obtenção de sistemas com aplicações eficazes em biomedicina.
- Realizar o procedimento de lavagem das nanopartículas sintetizadas a fim da retirada parcial das moléculas orgânicas de ácido oleico e oleilamina de sua superfície, obtendo nanopartículas hidrofílicas em um procedimento simples e rápido.
- Estudar a estabilidade coloidal dos sistemas obtidos a fim de compreender na prática todos os fatores que a afetam.
- Encapsular nanopartículas magnéticas, obtendo-se cápsulas biopoliméricas de quitosana em tamanho reduzido e forma controlada.
- Controlar a quantidade de grupamentos livres e suas possíveis interações com futuras etapas de recobrimento.
- Investigar e adequar métodos eficazes de funcionalização com ácido fólico para otimizar a concentração deste ligante nas aplicações em biomedicina.

3 Procedimento experimental

3.1 Preparo das amostras

Todas as etapas constituintes dos procedimentos experimentais e análises dos sistemas foram realizadas com reagentes químicos com grau analítico e, quando realizado tratamento prévio, este foi indicado em cada etapa. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura (18 MΩ.cm) e/ou deionizada.

3.2 Síntese de nanopartículas de Fe_3O_4 pelo método do poliol modificado ^{69, 70}

Em um balão de 3 bocas foi adicionado: 1,0 mmol (0,3571 g) de acetilacetato de ferro(III), 5,5 mmol (1,4358 g) de hexadecanodiol, 3,0 mmol (1,05 mL) de ácido oleico, 4,0 mmol (1,41 mL) de oleilamina e 0,1 mol (20,2 mL) de benziléter. A síntese foi realizada em um aparato experimental conforme ilustrado na Figura 13.

O balão de três bocas (1) foi apoiado em uma manta de aquecimento (2) sob um agitador magnético (3), que promoveu a constante homogeneização do sistema. A manta de aquecimento foi acoplada a um controlador de temperatura (4) e a um termopar (5) imerso no meio reacional, que manteve a temperatura de acordo com a programação estabelecida. Toda a síntese foi realizada sob atmosfera de N_2 (6), com o balão acoplado a um condensador de *Graham* (7) conectado a um banho que manteve o fluxo de água constante.

Para a síntese de nanopartículas de magnetita, foi utilizada uma rampa de aquecimento descrita conforme a Figura 14. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, as nanopartículas resultantes foram lavadas com etanol, centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos, sendo este procedimento repetido por três vezes, e posteriormente foram estocadas em hexano.

Figura 13 Representação do esquema de aparato experimental utilizado na síntese de nanopartículas magnéticas.

Fonte: autoria própria

Figura 14 Esquema de rampa de aquecimento utilizado para a síntese de nanopartículas via síntese do poliálcool modificado.

Fonte: Autoria própria

3.3 Modificação da superfície das NPs de magnetita

3.3.1 Lavagem da superfície da magnetita com metanol

Foi desenvolvida em nosso grupo de pesquisa, uma etapa simples e rápida para a lavagem preliminar da superfície das NPs de magnetita. Em sistema de refluxo, conforme demonstrado na Figura 13, sob atmosfera de N_2 , foi realizada a lavagem das NPs com metanol a quente, por isso a temperatura do sistema foi aproximadamente a

temperatura de ebulição deste solvente, que foi evaporado completamente por três vezes. Posteriormente as partículas foram redispersas em etanol sob sonicação, lavadas e centrifugadas (10000 rpm por 10 minutos) consecutivas vezes com etanol e água, e finalmente estocadas em etanol para que posteriormente fosse utilizado algum procedimento adicional de recobrimento e/ou funcionalização sobre esta superfície.

3.3.2 Recobrimento com ácido aminocapróico (EACA) via troca de ligantes

Foi realizado o procedimento de troca de ligantes (ácido oleico e oleilamina, provindos da síntese via poliol modificado) por moléculas de ácido aminocapróico por meio de um procedimento desenvolvido em nosso grupo de pesquisa. Foram utilizados 10,0 mg de NPs de magnetita conforme sintetizadas, com superfície hidrofóbica, que foram posteriormente adicionadas a uma solução contendo 20,0 mg de ácido aminocapróico em 6,5 mL de HCl 0,1 mol L⁻¹ e 5,0 mg de NaCl. A mistura foi mantida em banho de ultrassom (*Soni Tech S403A*, frequência 40kHz, potência 100W) por aproximadamente 4 horas, lavada e centrifugada com água, e posteriormente redispersa e estocada em água.

3.3.3 Recobrimento com aminopropiltrimetoxissilano (APTMS) via adição de ligantes ⁷¹

Para o procedimento de recobrimento com APTMS, primeiramente foram adicionados em um erlenmeyer, 35,0 mg de NPs de magnetita conforme sintetizadas, com superfície hidrofóbica, em 10,0 mL de mistura metanol/tolueno com proporção 1:1 (v/v). O sistema foi aquecido a 95 °C sob agitação magnética constante até a diminuição do volume pela metade e completou-se novamente com mais 5,0 mL de metanol. O procedimento foi repetido por duas vezes. Aguardou-se o resfriamento até a temperatura ambiente, e então adicionou-se sob constante agitação 18,0 mL de hexano e 35,0 µL de ácido acético. Foram adicionados via gotejamento lento e constante, 1,4 mL de APTMS. O sistema reacional foi mantido sob agitação à temperatura ambiente por 18 horas. As partículas foram lavadas com etanol e separadas magneticamente, seguido por lavagem com etanol e centrifugação (10000 rpm por 10 minutos) 3 vezes para posterior armazenamento em água.

3.3.4 Recobrimento com ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) via troca de ligantes ⁴³

O procedimento realizado com o DMSA foi realizado através da troca de ligantes na superfície da magnetita esférica. Por ser um método bem difundido na literatura, seu procedimento não precisou ser adaptado para as NPs sintetizadas deste trabalho. 50 mg de NPs de magnetita conforme sintetizadas, com superfície hidrofóbica, foram adicionados a 20 mL de etanol para posteriormente serem sonificados e separados magneticamente. Estas NPs foram dispersas em 20 mL de tolueno, e a este sistema foi adicionada uma solução de 90 mg de DMSA solubilizados em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). O sistema foi mantido sob agitação por 28 horas e posteriormente lavado com etanol por 3 vezes e água por mais 3 vezes, sendo que em todas as etapas de lavagem, as partículas foram separadas magneticamente com o uso de um ímã. O pH foi então ajustado a 9 com solução de NaOH de concentração 1 mol/L.

3.4 Estabilidade coloidal das NPs de magnetita recobertas

Os testes de estabilidade coloidal foram realizados após as etapas de recobrimento das NPs de magnetita com as moléculas de APTMS, EACA e DMSA. Tal teste consistiu nas medidas de DLS (*Dynamic Light Scattering*), potencial Zeta (ζ) e mobilidade eletroforética, realizados no equipamento Zetasizer Nano ZS e processados no software Zetasizer. Além disso, foram realizados escaneamentos de absorção no UV-Vis com a variação do tempo no espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 35, a 37°C com auxílio do acessório *Peltier-thermostatable 9-Cell Changer*.

O procedimento realizado para a preparação de todos os sistemas de magnetita recobertas foi o mesmo: à 8 mL de solução de NaCl 10^{-3} mol. L⁻¹ foram adicionados 300,0 µL de suspensão de NPs recobertas (1,0 mg. mL⁻¹). Neste sistema, o pH foi variado de 2 a 12 com adição de soluções de NaOH e HCl 0,1 mol. L⁻¹. A presença do eletrólito nesta concentração teve como objetivo ajustar a força iônica do meio de modo a garantir que a mobilidade das partículas ocorresse por migração e o transporte de carga na solução ficasse a cargo do eletrólito de suporte.

Para o procedimento realizado com magnetita recoberta com DMSA, também foi estudado o ajuste de melhor tempo de reação baseando-se na estabilidade coloidal

do sistema. Foram retiradas alíquotas com 4, 24, 28, 48, 55 e 72 horas de reação. Todas as alíquotas foram lavadas com etanol e água, estocadas em água e o pH=10 foi ajustado com solução de NaOH.⁴³

Os sistemas também tiveram sua estabilidade coloidal testada em tampão SBF (*Simulated body fluid*), um tampão desenvolvido com concentração iônica semelhante a do plasma sanguíneo, utilizado para testes *in vitro*.⁷² Para o preparo de 1 L deste tampão, foram adicionados os reagentes nas quantidades descritas na Tabela 3, exatamente na mesma ordem e em banho de água a 36,5°C. O volume final foi ajustado com água deionizada.

Cabe aqui ressaltar que todas as medidas acima citadas foram realizadas em temperatura controlada de 37°C e todos os resultados que serão apresentados simulam o comportamento destes sistemas em temperatura próxima à corpórea.

Tabela 3 Reagentes e quantidades necessários para a preparação de 1 L de tampão SBF.

Reagente	Quantidade
<i>NaCl</i>	8,036 g
<i>NaHCO₃</i>	0,352 g
<i>KCl</i>	0,225 g
<i>K₂HPO₄. 5 H₂O</i>	0,230 g
<i>MgCl₂. 6 H₂O</i>	0,311g
<i>HCl 1,0 mol. L⁻¹</i>	40 mL
<i>CaCl₂</i>	0,293 g
<i>Na₂SO₄</i>	0,072 g
<i>TRIS*</i>	6,063 g
<i>HCl 1,0 mol. L⁻¹ **</i>	0,2 mL

* TRIS = tris(hidroximetil)aminometano

** Adição necessária somente para ajuste até pH=7,4

Fonte: Adaptado de Oyane, A. et al.⁷²

3.5 Funcionalização das NPs de magnetita

Neste trabalho, denomina-se etapa de funcionalização toda etapa realizada após a modificação da superfície. Tal denominação é dada devido ao fato de que as etapas de modificação são necessárias para conferir hidrofiliabilidade à superfície, ao passo que a funcionalização dá as características que a nanopartícula deve possuir para aplicações em meios biológicos. A literatura é vasta sobre o assunto e descreve vários métodos para tais funcionalizações, seja com a adição de fármacos ou com a adição de ligantes alvo ^{73, 74, 75}, sendo este último o foco deste estudo. Para a funcionalização das NPs lavadas com metanol, e as recobertas com EACA, APMTS e DMSA, foram utilizados: ácido fólico como ligante alvo ou procedimentos de encapsulação com quitosana.

3.5.1 Funcionalização das NPs de magnetita com ácido fólico (AF)

Conforme já citado, a literatura descreve inúmeros métodos de funcionalização com este ligante alvo. Para este trabalho foram escolhidos três procedimentos: reação com carbodiimida na presença de N-hidrosuccinamida (NHS), reação direta com carbodiimida e proteção do ácido fólico com di-terc-butil-dicarbonato (t-boc) ⁷⁶

3.5.1.1 1º procedimento – Reação com carbodiimida na presença de NHS ⁷⁷

Para a funcionalização utilizando o 1º procedimento, os reagentes utilizados foram: solução aquosa de 1% (m/v) de ácido fólico (AF), 4% (m/v) de EDC, 1% (m/v) de NHS.

A reação de formação da ligação amida foi realizada da seguinte forma: 5,0 mL da solução de AF foram adicionados a 4,0 mL da solução de EDC. Após 5 minutos, 4,0 mL da solução de NHS foi adicionada no meio reacional. Após 5 minutos, uma dispersão contendo 7,5 mg de NPs recobertas, foi adicionada ao sistema e o pH foi ajustado, com solução de 1,0 mol L⁻¹ de NaOH, até 8,0. Deixou-se o sistema agitando-se em banho de gelo por 24 horas. As dispersões foram lavadas com água, separadas com um ímã e submetidas a banho de ultrassom para redispersão. Então, centrifugou-se a 10000 rpm

por 10 minutos. Repetiu-se o procedimento até que se observou o sobrenadante sem coloração. As partículas resultantes foram estocadas em água.

3.5.1.2 2º procedimento – Reação direta com carbodiimida ⁷⁸

Para o segundo experimento, primeiramente, 4,5 mg de ácido fólico foram dissolvidos em 5,0 mL de DMSO e posteriormente, 4,5 mg de EDC foram adicionados à esta solução. A mistura foi mantida sob agitação magnética constante à temperatura e sob atmosfera de N₂ por 2 horas. Após este período de ativação do ácido fólico, as NPs recobertas foram adicionadas ao sistema, que foi mantido sob agitação magnética em atmosfera de N₂ por mais duas horas. As partículas resultantes foram lavadas com água e separadas com um ímã sucessivas vezes até o sobrenadante se tornar incolor, e depois foram estocadas em água.

3.5.1.3 3º procedimento – Proteção do ácido fólico com di-terc-butil-dicarbonato ⁷⁶

O terceiro procedimento foi adaptado da literatura ⁷⁶, e consiste em uma etapa preliminar para proteção da molécula de AF com a molécula de t-boc para posterior funcionalização da nanopartícula.

Para proteção do AF pela molécula de t-boc: foram dissolvidos 4,190 g de AF em 40 mL de DMSO e posteriormente adicionou-se 9,603g de t-boc. O sistema foi mantido sob agitação magnética por 2 horas. Separadamente, 18,02g de EDC e 2,141g de NHS foram dissolvidos em 200 mL de DMSO e mantidos sob agitação magnética por 18 horas. A solução de AF foi adicionada à solução de NHS e EDC e agitou-se até completa homogeneização. O AF foi precipitado com diclorometano e centrifugado. O produto foi seco até total eliminação do solvente.

Para funcionalização das NPs: 200 mg de NPs recobertas foram dispersas em 50 mL de DMSO com 75 mg de ácido fólico protegido. A mistura foi mantida sob sonicação a 60°C por 2 horas. As partículas foram lavadas uma vez com DMSO por centrifugação a 10000 rpm por 10 minutos e posteriormente lavadas com água e separadas com auxílio de um ímã por 5 vezes, e então estocadas em água.

3.5.2 Funcionalização das NPs de magnetita via encapsulação com quitosana (QS)

São conhecidos na literatura inúmeros métodos de formação de nanocápsulas de quitosana, sintetizadas para a encapsulação de diversos materiais, como proteínas, drogas, vitaminas, antioxidantes, etc. Porém, a utilização de NPs magnéticas biocompatíveis neste processo de encapsulação ainda é um procedimento escasso na literatura, necessitando ainda de métodos de adaptação e estudos.⁷⁹

Foram realizados três procedimentos adaptados da literatura de encapsulações de fármacos, conforme citados na Tabela4, onde consta também as variações dos métodos para abranger a maior parte das NPs recobertas sintetizadas no decorrer do projeto.

Tabela4 Métodos utilizados na encapsulação de NPs de magnetita e suas variações.

Método	Nanopartícula
Calvo et al.⁸⁰	Recoberta com EACA
	Lavada com metanol
	Sem recobrimento
	APTMS
Água/Óleo⁸¹	Recoberta com EACA
	Sem recobrimento
Gelificação iônica⁸²	Recoberta com EACA
	Lavada com metanol
	Recoberta com DMSA
	Recoberta com EACA e AF
	Recoberta com APTMS e AF

Fonte: Autoria própria

Antes de realizar-se todos os procedimentos, a quitosana comercial (Chitosan low molecular weight, Sigma Aldrich®, deacetylated 75-85%) foi purificada segundo procedimento de Signini e Campana⁸³, a fim da obtenção desta na forma neutralizada. 2g de quitosana foram dissolvidos em 600 mL de solução de ácido acético a 1% e o sistema foi mantido sob agitação por 18 horas. Posteriormente, filtrou-se a solução em

membranas de porosidades 5,0 μm e 0,8 μm e ao filtrado foi adicionado NH_4OH concentrado até a precipitação da quitosana. O precipitado foi filtrado, centrifugado e lavado sucessivas vezes com água e depois com metanol. A amostra purificada foi seca à temperatura ambiente em estufa à vácuo (-500 mmHg) e estocada em dessecador com sílica.

3.5.2.1 Encapsulação de magnetita via procedimento adaptado de Calvo et al.⁸⁰

Em um erlenmeyer, foram adicionados 5 mg de quitosana à uma solução de 5 mL de água com 23 μL de ácido acético. Esta mistura foi mantida sob agitação até total dissolução da quitosana. A esta solução foram adicionados 20 mg de NPs de magnetita e manteve-se sob agitação até a homogeneização. Em seguida, foram gotejados lentamente 2 mL de uma solução de tripolifosfato (TPP) de concentração 1,0 mg mL^{-1} . A mistura foi agitada por 40 minutos, adicionou-se novamente 2 mL da mesma solução de TPP e agitou-se por mais 40 minutos. O sistema resultante foi lavado com água sucessivas vezes e estocado em água.

Este procedimento foi realizado nos casos específicos descritos na *Tabela 4*: magnetita recoberta com ácido aminocapróico (item 3.3.2), magnetita lavada com metanol a quente (item 3.3.1), magnetita conforme sintetizada, sem recobrimento e de caráter hidrofóbico (item 3.2), e magnetita recoberta com APTMS (item 3.3.3).

3.5.2.2 Encapsulação de magnetita via processo de emulsão óleo-água⁸¹

Para este procedimento foram preparados separadamente dois sistemas distintos, denominados fase água e fase óleo, como descritos a seguir:

- 1) Fase água: Solução aquosa de quitosana (1,5% v/v): em um erlenmeyer, utilizou-se 20 mL de água e 0,3 g de quitosana. Esta solução foi mantida em agitação por 18 horas. Adicionou-se 0,21 mL de Tween 80® e agitou-se até a obtenção de uma mistura homogênea.
- 2) Fase óleo: em um erlenmeyer foi adicionado 5 mL de óleo de soja comercial e 25 μL de Spam 80®, que foram mantidos sob agitação e aquecimento a 50 °C por 2 horas. Resfriou-se à temperatura ambiente.

Os procedimentos citados na Tabela 4 para este caso diferem na etapa de adição das NPs. Tratando-se de NPs sem recobrimento (como sintetizadas), estas foram adicionadas à fase óleo; e assim respectivamente, no sistema em que se encapsulou previamente as NPs hidrofílicas, estas foram adicionadas à fase água.

Posteriormente, gotejou-se lentamente a fase óleo na fase água enquanto esta última foi mantida sob forte agitação magnética, a fim de obter a emulsão óleo-água. Gotejou-se lentamente à emulsão, 20 mL de solução de tripolifosfato de sódio (TPP) 0,5% (v/v). A mistura foi mantida sob agitação por 30 min, lavada com solução água/Tween 80® (0,1% v/v) e centrifugada a 10000 G por 15 minutos a 20 °C por sucessivas vezes e estocada em água.

3.5.2.3 Encapsulação de magnetita via processo de gelificação iônica ⁸²

Em um erlenmeyer foram adicionados 20 mL de água e 10 mg de quitosana, juntamente com 3,8 µL de ácido acético. Esta solução foi agitada por aproximadamente 18 horas, a temperatura ambiente, e o pH foi ajustado para 4,7 com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹. A solução foi então filtrada em uma membrana de porosidade 0,47 µm. 10 mL desta solução foram transferidos para um tubo de ensaio contido em um banho de água a 60 °C e foi mantido sob agitação por 20 minutos. Adicionou-se então 5 mg de NPs (devidamente recobertas, conforme informações da Tabela 4).

Separadamente, 3 mL de solução aquosa de TPP 0,5 mg mL⁻¹ foram mantidos sob agitação em banho de gelo e posteriormente, a solução de quitosana com NPs foi transferida para o banho de gelo, onde gotejou-se lentamente a solução de TPP, sob agitação. A reação foi então mantida por 10 minutos. O produto resultante foi lavado com água por consecutivas vezes e estocado em água.

3.6 Quantificação de ligantes na superfície das NPs de magnetita

3.6.1 Quantificação da concentração dos grupos amino livres na superfície das NPs

O procedimento de quantificação de grupos amino livres na superfície foi realizado o método proposto por Moon *et al.* ⁸⁴, com NPs que possuíam recobrimentos de APTMS e EACA.

Pesou-se aproximadamente 2 mg das amostras recobertas em frascos tipo “*eppendorf*”. Em seguida, a cada frasco adicionou-se 1,0 mL da solução de acoplamento (Solução 1: 5×10^{-3} mol L⁻¹ de 4-nitrobenzaldeído em solução de etanol absoluto e ácido acético (0,8% v/v)).

Centrifugou-se a amostra, retirou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento 3 vezes. Na última vez do procedimento, manteve-se o frasco em repouso por 30 minutos antes da centrifugação. Após a formação da ligação imina, adicionou-se 1,0 mL da solução de lavagem ao frasco (Solução 2 – etanol absoluto com 0,8% v/v de ácido acético). Centrifugou-se a amostra, retirou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento 4 vezes para retirar o excesso de 4-nitrobenzaldeído que não reagiu. A etapa final consiste em adicionar 1,0 mL da solução de hidrólise ao frasco (Solução 3 – mistura de 75 mL de água com 75 mL de etanol e 0,2 mL de ácido acético glacial). O material foi agitado e, após centrifugação, o sobrenadante foi retirado e colocado num balão volumétrico de 10 mL, ao qual o volume foi completado com a solução 3.

Para a quantificação da concentração do teor de amins na superfície das NPs, a curva padrão de absorção UV de 4-nitrobenzaldeído em solução de água, etanol absoluto e ácido acético (0,8% v/v) foi utilizada (Figura 15). O comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}} = 267$ nm) do 4-nitrobenzaldeído foi determinado pelo espectro de absorção obtido entre 235 nm e 400 nm, utilizando um espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 35. Assim, conhecendo a massa das amostras e o volume da solução utilizado nas medidas de absorbância, foi possível determinar indiretamente a concentração de grupos amino em função da massa da amostra.

Figura 15 Curva analítica realizada com diferentes concentrações de 4-nitrobenzaldeído para a determinação da concentração grupos amino livres nas NPs recobertas.

Fonte: Autoria própria

3.6.2 Quantificação da concentração dos grupos folato na superfície das NPs funcionalizadas

A quantificação de grupos folato ligados nas NPs funcionalizadas foi realizada de maneira direta, partindo do princípio que a baixa solubilidade do ácido fólico em meio aquoso seria um empecilho em quaisquer procedimentos.

Sabe-se que vários métodos têm sido desenvolvidos para a quantificação de ácido fólico, principalmente em formulações da indústria farmacêutica. Uma forma simples de quantificação é a utilização de uma detecção volumétrica via radiação UV.⁸⁵ Assim, tendo um volume conhecido e uma quantidade conhecida de ácido fólico totalmente dissolvida, pode elaborar-se uma curva de calibração para a determinação direta da concentração de ácido fólico no sistema.

O procedimento utilizado foi a confecção de uma curva de calibração em pH 9. Os dados da literatura apontam melhores valores de solubilidade em pH básico, além de maior facilidade de detecção de λ_{max} nesta condição, já que o composto apresenta variação de perfil conforme a variação do pH.⁸⁵

A curva analítica foi realizada com concentrações conhecidas de ácido fólico: 18 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, 15 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, 10 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ e 1 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, determinando-se o comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{max}} = 255 \text{ nm}$) tendo-se o espectro de 500 a 220 nm.

Posteriormente, massas conhecidas de NPs funcionalizadas e dialisadas foram dispersas em água, a pH 9 (ajustado com solução de NaOH 0,1 mol. L⁻¹) para leituras de absorção no comprimento de onda máximo já determinado.

Figura 16 Curva analítica realizada com diferentes concentrações de ácido fólico para a determinação da concentração de ligantes folato nas NPs funcionalizadas.

Fonte: Autoria própria

3.7 Procedimentos de caracterização e análises dos sistemas obtidos

3.7.1 Difratometria de raios X (DRX)

A difratometria de raios X (DRX) foi utilizada para a identificação das fases cristalográficas da magnetita utilizando o difratômetro D8 Advance da Bruker operando com radiação K α do cobre ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Preparou-se as amostras gotejando a dispersão de nanopartículas em hexano para formar um filme sobre um substrato de vidro, sendo o solvente evaporado a temperatura ambiente.

3.7.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros no infravermelho, FTIR, foram realizados para analisar as ligações dos recobrimentos sobre a superfície das nanopartículas de magnetita. Utilizou-se um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier IRPrestige-21 da

Shimadzu. As amostras foram preparadas na forma de pastilhas com cerca de 100mg de brometo de potássio, KBr, e uma pequena quantidade das nanopartículas previamente secas. Os espectros foram obtidos no intervalo entre 400 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} com uma resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras. Também foram realizadas medidas neste mesmo equipamento utilizando o acessório MIRacle™ ATR Accessory, equipado com cristal Diamante/ZnSe onde gotejou-se aproximadamente $10\text{ }\mu\text{L}$ de dispersão da amostra, e esta foi realizada contra um branco do mesmo solvente. Foram obtidos espectros entre 650 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} resolução de 4 cm^{-1} e 32 varreduras.

3.7.3 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Para análise de tamanho, distribuição, morfologia e homogeneidade das amostras, foram realizadas microscopias eletrônicas de transmissão (MET). Para esta análise, foi utilizado um microscópio eletrônico Jeol modelo JEM-2100, operando a 200kV. Para todos os casos, a preparação das amostras foi semelhante, em que uma pequena porção de nanopartículas foi redispersa em seu respectivo solvente de estocagem, e foi mantida em ultrassom por aproximadamente. A amostra foi então gotejada sobre um suporte de cobre previamente recoberto por um fino filme de carbono depositado por *sputtering*. O solvente deste suporte foi evaporado lentamente, a pressão e temperatura ambientes. Para as dispersões em água, as amostras foram secas sob vácuo. O diâmetro médio (d) e o desvio-padrão (SD) das nanopartículas obtidas foram determinados estatisticamente pela contagem de aproximadamente 120 partículas de cada uma das amostras.

3.7.4 Medidas de estabilidade coloidal - DLS/Zeta

Os ensaios de distribuição de tamanho foram realizados por espalhamento de luz dinâmica (*dynamic light scattering* – DLS) utilizando o instrumento Malvern Zetasizer Nano ZS. Amostras foram preparadas em faixas de pH de 2 a 12 em solução de NaCl $10^{-3}\text{ mol. L}^{-1}$ e dispostas em cubetas de poliestireno a 37°C . Cada procedimento foi realizado com tempo de equilíbrio de 30 segundos e as leituras foram replicadas por 10 vezes por análise, e cada corrida foi replicada por 5 vezes independentemente, para uma consistência dos resultados. Análises de potencial zeta seguiram o mesmo procedimento e foram realizadas em cubeta específica.

3.7.5 Magnometria de amostra vibrante (VSM)

As curvas de magnetização por campo externo aplicado foram obtidas através da técnica de magnetometria de amostra vibrante (VSM) utilizando um magnetômetro de amostra vibrante convencional, em cooperação com o Prof. Dr. Daniel Reinaldo Cornejo do Departamento de Física dos Materiais e Mecânica do Instituto de Física da USP de São Paulo. A preparação das amostras foi realizada colocando-se uma massa conhecida do analito no interior de uma cápsula de medicamento vazia a qual foi devidamente centralizada no compartimento de medida em ambos os equipamentos. O campo magnético aplicado foi variado entre 20 e -20 kOe e as medidas realizadas à temperatura de 300 K.

3.7.6 Espectroscopia na região do UV-Vis

As análises de espectroscopia no UV-Vis foram realizadas em um espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 35 no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 700 nm, com velocidade de varredura de 400 nm.min⁻¹.

Para análises simples a varredura correspondeu a um único ciclo, e para ensaios de estabilidade coloidal, cada amostra foi submetida a 20 ciclos de varredura, completando 20 minutos de análise. Para todas as amostras, um branco de cada respectivo meio foi utilizado para maior precisão de valores de absorbância.

3.7.7 Espectroscopia de energia dispersiva de raios x (EDS)

Análises de espectroscopia de energia dispersiva de raios X (energy-dispersive X-ray spectroscopy - EDS) foram realizadas no microscópio JEOL JEM-2100, obtidas com um detector OXFORD X-MaxN 80 T.

3.7.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em um microscópio Leo, Modelo 440 para observação da morfologia das partículas encapsuladas com quitosana. Amostras foram analisadas após secas e adicionadas a um suporte tipo “*stub*”, que foi devidamente metalizado com camada de ouro.

4 Resultados e discussão

4.1 Síntese de nanopartículas de Fe_3O_4 pelo método do poliol modificado ^{32, 70}

Nos últimos anos, diversas rotas sintéticas para a obtenção de nanopartículas com tamanho, morfologia, composição química e estrutural controlados, parâmetros esses que influenciam diretamente em suas propriedades, vêm sendo propostos na literatura. Dentre elas, destacam-se as sínteses via processo poliol também denominado de decomposição térmica. Este processo foi inicialmente proposto em 1989 por Fiévet *et al.*²⁰, mas modificado e amplamente difundido por Sun *et al.*^{21, 30, 33}. No primeiro procedimento, sais metálicos eram reduzidos em altas temperaturas, na presença de um poliol, utilizado tanto como solvente como um agente redutor. O trabalho original utilizava etilenoglicol e a reação proposta se dava segundo a :

Assim, em temperatura elevada ocorre a desidratação do etilegoglicol com formação de um aldeído, o qual atua como agente redutor. Na presença de íons metálicos (M(II)), o aldeído é oxidado reduzindo o metal, tendo como produto de reação outro forte agente redutor, o H_2 , que se permanecido dissolvido na solução, pode auxiliar na redução, ou pode ser eliminado através da presença de um gás de arraste no sistema. Sun adaptou o processo utilizando um diol de cadeia mais longa, o 1,2-hexadecanodiol, para que a reação de óxido-redução fosse favorecida no aspecto cinético, uma vez que esta molécula possui grupos hidroxila terminais mais suscetíveis à desidratatação. Observando o diagrama de LaMer na Figura 5, favorecendo-se a etapa de nucleação por uma cinética acelerada, o resultado são partículas com menores dimensões, sendo esta a principal diferença do processo poliol original.

Uma posterior modificação do processo poliol foi proposta por Varanda *et al.*⁸⁶, quando foi substituído o precursor metálico. Nos trabalhos de Sun *et al.*, era utilizado o ferro pentacarbonil, que possui alta volatilidade, facilitando assim seu arraste juntamente ao gás de arraste do sistema, além de possuir alta toxicidade. A modificação

proposta utiliza acetilacetionato de ferro (III), que possui vantagens como: solubilidade em solventes orgânicos, maior controle composicional e menor custo e toxicidade.

O método poliol modificado pode resultar em nanopartículas de diferentes composições e tamanho de acordo com a variação do precursor de íon metálico que é utilizado e a proporção dos reagentes ^{33, 31, 32, 42, 69}. Neste trabalho, um dos objetivos é obter nanopartículas de Fe₃O₄ com diâmetro de aproximadamente 10 nm, baixo grau de polidispersividade e alta magnetização de saturação. Os resultados da síntese são mostrados nas microscopias eletrônicas de transmissão e seu respectivo histograma de distribuição de tamanho com ajuste gaussiano (Figura 17). Foram obtidas nanopartículas com controle de forma, diâmetro médio de 8,48 nm e bom grau de polidispersividade, que pode ser observado nas micrografias da Figura 17 (a) e (b), caracterizando um sistema com ausência de NPs aglomeradas, sendo assim um sistema com características necessárias para dar prosseguimento aos estudos.

Figura 17 (a) e (b) Microscopia eletrônica de transmissão da amostra de magnetita sintetizada via método do poliol modificado. (c) Histograma da distribuição de tamanho com ajuste gaussiano para determinação do diâmetro médio das nanopartículas

Fonte: Autoria própria

Realizando uma análise detalhada acerca da composição das nanopartículas formadas, comprova-se que as nanopartículas sintetizadas são de magnetita. Foi realizada a análise por difratometria de raios X (DRX) Figura 18, e comparou-se o resultado com o padrão (JCPDS) de sinais das fases cristalinas deste material e também de outro possível produto da síntese, a α -hematita. De acordo com os resultados de DRX é possível inferir que o produto formado é magnetita, e que não houve deslocamento dos picos do difratograma com relação ao padrão, evidenciando que a estrutura cristalina não sofreu alterações, como substituições de átomos em sítios da célula unitária.

Figura 18 - DRX obtido a partir da amostra comparado aos padrões JCPDS das fases magnetita e α -hematita.

Fonte: Autoria própria

Outras análises realizadas para o estudo das nanopartículas formadas foram a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e a magnetização de amostra vibrante (VSM). Pelo FTIR é possível que sejam caracterizadas as ligações presentes nas nanopartículas, principalmente em sua superfície. Como é possível observar na Figura 19, o espectro apresenta banda de vibração em 588 cm^{-1} , que pode ser atribuída a características de ligações Fe-O em sítios octaédricos e tetraédricos da estrutura cúbica de espinélio inverso da magnetita ⁸⁷. A presença de ácido oleico e

oleilamina sobre a superfície das nanopartículas é principalmente comprovada pelas bandas centradas em 2923 cm^{-1} e 2851 cm^{-1} , características, respectivamente, dos estiramentos assimétrico e simétrico de grupos ($-\text{CH}_2-$) presentes nas cadeias orgânicas alifáticas⁸⁸, e a presença do ácido oleico também pode ser atribuída pela presença da banda em 1635 cm^{-1} , devido ao estiramento da ligação $\text{C}=\text{O}$.

O resultado da análise de VSM também é mostrado na Figura 19. O valor de magnetização de saturação obtido é relativamente alto (aproximadamente 63 emu g^{-1}) para sistemas em escala nanométrica, sendo o valor do material *bulk* ao redor de 85 emu g^{-1} . O valor de magnetização remanente da amostra é cerca de 60 emu. g^{-1} e isso caracteriza, juntamente com o baixo valor de coercividade ao redor de $0,05\text{ kOe}$, um comportamento muito próximo ao superparamagnético, o que é essencial ao objetivo deste trabalho.

Figura 19 (a) Espectro FTIR da magnetita; (b) Curva de magnetização de saturação da magnetita.

Fonte: Autoria própria

Observando o comportamento das sínteses no decorrer do trabalho, foi possível notar que durante o procedimento de refluxo, havia a formação de uma névoa branca intensa no balão de reação. Levantou-se a hipótese desta névoa tratar-se de água contida no sistema por meio de contaminação de algum reagente. Ao analisar os componentes da síntese de nanopartículas por decomposição térmica, houve a ideia de que o benzil éter, por ser uma molécula levemente polar devido ao oxigênio ligado a dois anéis aromáticos (Figura 20), seria a molécula com maior afinidade a absorver água do ambiente. Outro fator relevante foi que este reagente estava estocado em prateleira, sem controle de umidade e temperatura.

Sendo assim, a partir deste momento do trabalho, as sínteses foram realizadas com o benzil éter previamente colocado em estufa a vácuo a 80°C por 12 horas, a fim de eliminar esta possível quantidade de água do sistema. O restante do procedimento foi realizado exatamente conforme descrito experimentalmente (item 3.2).

Figura 20 Estrutura molecular do benzil éter (C₁₄H₁₄O).

Fonte: Autoria própria

Neste procedimento, não foi observada a névoa branca que estava presente no sistema sem a etapa prévia de secagem do benzil éter, confirmando a hipótese levantada. Porém, ao término da síntese e posterior lavagem, ao estocar-se as nanopartículas, observou-se a não dispersão destas em hexano. Foi realizada a microscopia eletrônica de transmissão para que se observasse possíveis diferenças das nanopartículas formadas neste procedimento de síntese (Figura 21)

Figura 21 (a) e (b) Microscopia eletrônica de transmissão da amostra de magnetita sintetizada via método do poliol modificado, com procedimento de secagem do benzil éter. (c) Histograma da distribuição de tamanho com ajuste log normal para determinação do tamanho

Fonte: Autoria própria

Conforme observado nas imagens de TEM, foram obtidas nanopartículas com forma cúbica e realizando o procedimento de medidas de tamanho de acordo com a diagonal principal dos cubos, foi obtido um tamanho médio de 53,80 nm. A distribuição morfológica não foi satisfatória, pois observa-se que algumas nanopartículas esféricas de menor tamanho também estão presentes no sistema.

Para uma investigação acerca da composição das nanopartículas formadas, foram realizadas análises por DRX, de difração de elétrons de área selecionada (SAED) e microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM), que confirmam a formação de magnetita pela indexação das fases (Figura 22).

Figura 22 Amostra de magnetita cúbica. (a) SAED, (b) HRTEM, (c) DRX

Fonte: Autoria própria

Além disso, foram realizadas análises por FTIR do reagente para uma possível explicação da mudança de forma das nanopartículas com a mudança desta variável. Foram analisadas três amostras de benzil éter: uma amostra pura, estocada sob atmosfera de N_2 , com pressão e temperatura controladas, além das amostras utilizadas nas sínteses: com e sem secagem prévia. Os resultados estão na Figura 23. Observando os três espectros, conclui-se que todas as regiões de bandas do benzil éter são coincidentes. As bandas observadas em 3030 cm^{-1} e as múltiplas bandas contidas no intervalo de 1600 a 1452 cm^{-1} são características respectivamente de estiramentos C-H e C=C dos anéis aromáticos. Em 2857 cm^{-1} é observada uma banda também de

estiramento C-H, porém do grupo metila ligado ao anel aromático, além de múltiplas bandas entre 1350 e 1480 cm^{-1} que caracterizam o dobramento das ligações -C-H também destes grupos. Caracterizando o grupo éter da molécula, tem-se a banda de forte intensidade em 1069 cm^{-1} estiramento C-O, típica do grupo éter.⁸⁹

Figura 23 (a) e (b) FTIR das amostras de benziléter com diferentes tratamentos.

Fonte: Autoria própria

Observa-se que a única diferença é o aparecimento de uma banda, conforme destacado na Figura 23 (b). Esta banda localizada na região de 1703 cm^{-1} é inexistente no reagente que possui controle de atmosfera de estocagem, sendo de baixa intensidade no reagente usualmente utilizado na síntese (somente estocado em prateleira ao abrigo da luz), e de maior intensidade e com um desdobramento de banda em 1715 cm^{-1} na amostra que passou pela etapa de secagem e originou em sua síntese, as nanopartículas cúbicas. Pela literatura ⁸⁹, sabe-se que a região de identidade de compostos oxigenados está ao redor de $1810\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$, e que a banda localizada em 1703 cm^{-1} , existente em duas amostras, pode ser atribuída ao estiramento C=O em ácidos carboxílicos. Além disso, a banda que possui um indício de formação em 1715 cm^{-1} pode identificar a presença de estiramentos C=O também de cetonas na amostra que passou pelo processo de secagem. Logo, como a carbonila não era observada na amostra inicial e posteriormente observou-se a formação ácidos carboxílicos e cetonas, há a evidência de oxidação gradual deste sistema.

Segundo a literatura ⁹⁰, éteres reagem lentamente com o oxigênio, passando por um processo denominado auto-oxidação. Tal processo origina peróxidos e/ou hidroperóxidos. Ao manter-se estocado em prateleira, o benziléter passa por este lento processo, porém ao ser aquecido para que fosse retirado o excesso de água do meio, a auto-oxidação foi acelerada.

O mecanismo da alteração de forma das nanopartículas formadas deve ser melhor investigado, porém como análise prévia, pode-se atribuir esta alteração ao fato de que o aumento do grau de oxidação do meio reacional o torna um agente redutor com características diferentes das iniciais, afetando o processo de redução do precursor metálico e consequentemente afetando diretamente as etapas de nucleação e crescimento destas.

4.2 Modificação da superfície das NPs de magnetita

As modificações de superfície foram feitas com o intuito de proporcionar uma característica hidrofílica à superfície das NPs sintetizadas via método do poliol modificado. Conforme demonstrado pelo espectro FTIR na seção 4.1, estas NPs possuem em sua superfície, moléculas de ácido oleico e oleilamina. Tais moléculas são longas cadeias apolares, que proporcionam a hidrofobicidade às NPs de magnetita sintetizadas.

Com diferentes ligantes disponíveis nas superfícies, pôde-se realizar etapas de funcionalização e testes de estabilidade coloidal para cada sistema.

4.2.1 Lavagem da superfície com metanol

O objetivo deste procedimento foi proporcionar uma superfície hidrofílica à nanopartícula de magnetita de forma relativamente rápida e simples. O procedimento é constituído por uma lavagem à quente com metanol, em que as moléculas de ácido oleico e oleilamina que ficam adsorvidas na superfície da NPs após a síntese são retiradas de forma que estes formam compostos de cadeias carbônicas menos extensas, tornando a superfície menos hidrofóbica.

A limpeza da superfície foi confirmada pelo fato das NPs resultantes serem facilmente dispersas em água e em etanol. Para comprovar a eficácia do processo, foram realizadas medidas de FTIR e análise em microscopia eletrônica de transmissão. Além disso, realizou-se a análise de DRX para comprovar se houve mudança na fase cristalina inicialmente formada (Figura 24).

Figura 24 Análises das NPs lavadas em metanol a quente. (a) e (b) MET da nanopartícula lavada. (c) FTIR comparativo entre a magnetita como sintetizada e após lavada (d) DRX

Fonte: Autoria própria

Pelos resultados, pode-se observar que mesmo após a lavagem as partículas encontram-se com um bom grau de polidispersividade, tamanho e formas controlados. Além disso, pelo espectro infravermelho (FTIR), as bandas características dos estiramentos do ácido oleico e da oleilamina presentes na superfície existem em menor intensidade após a lavagem (região de 3000 cm⁻¹ e 1500 cm⁻¹).⁹¹ Pelo DRX nota-se que os picos característicos das fases de magnetita permanecem mesmo após a lavagem, confirmando que o tratamento de superfície a quente não alterou a fase cristalina da partícula.

Segundo a caracterização magnética, a amostra com lavagem de superfície apresentou resultados de magnetização de saturação igual a 56 emu/g e coercividade de 0,08 kOe, demonstrando um comportamento muito próximo ao superparamagnético. (Figura 25) A magnetização de saturação possui uma pequena diferença da apresentada pela magnetita como sintetizada (63 emu/g). Tal diferença provavelmente deve-se a uma leve oxidação de superfície com formação de fases não estequiométricas com comportamento magnético inferior ao da magnetita. Por se tratar de uma mudança na superfície do óxido, as técnicas de análise são pouco

eficientes para caracterizar a sua presença, sendo notada apenas nas medidas de magnetização.

Figura 25 Curva de magnetização de saturação da magnetita após lavagem com metanol à quente.

Fonte: Autoria própria

Valores de polidispersividade variam de zero a um. Quanto mais próximo a um, mais próximo ao comportamento polidisperso da amostra. Quanto mais polidispersa é uma amostra, mais agregados e menos interessante para aplicações em sistemas biológicos.³⁸

Sobre os dados de DLS obtidos na análise desta amostra em pH = 7,0 (Figura 26), observa-se que no gráfico de tamanho pela intensidade de sinal, a amostra apresenta duas distribuições de tamanho, porém com índice de polidispersividade (PDI) igual a 0,077, evidenciando um sistema monodisperso. Tais informações são inconsistentes e provavelmente devem-se à presença de aglomerados de partículas que acabam interferindo no real valor de polidispersividade da amostra.

Figura 26 Distribuição de tamanho por intensidade da amostra de magnetita lavada com metanol.

Fonte: Software Zetasizer

Considerando os dados mostrados pelo software das medidas (*Zetasizer Software*, Malvern Instruments Ltd.), obteve-se o tamanho médio de diâmetro hidrodinâmico de 1065 nm. De acordo com o correlograma, que mostra a correlação da flutuação da intensidade com o tempo de medida da amostra, nota-se que existem partículas maiores ou aglomerados de partículas, já que existem ruídos em sua linha de base. O histograma da distribuição de diâmetro hidrodinâmico pelo número de partículas é observado na Figura 27, em que observa-se o diâmetro médio dado pelo software. A diferença do tamanho obtido pela contagem das NPs na microscopia TEM e nas medidas de espalhamento de luz é justificada pelo raio de hidratação destas, principalmente por tratarem-se de superfícies hidrofílicas. Além do mais, as medidas de DLS foram realizadas após aproximadamente um mês de estocagem destas NPs dada a demanda para utilização do equipamento, o que pode ter resultado em aglomerados maiores devido à alta energia de superfície. Outro fator que influencia o elevado diâmetro observado é a presença de moléculas de ácido oleico e oleilamina ainda presentes nas superfícies, o que não se consegue observar pela microscopia TEM, porém ainda pode estar presente nesta.

Figura 27 Histograma de distribuição de tamanho pela porcentagem de partículas de magnetita lavada com metanol.

Fonte: Autoria própria

Conclui-se que a lavagem com metanol a quente é um meio efetivo de garantir que a nanopartícula magnética sintetizada tenha superfície com maior caráter

hidrofílico, o que elimina algumas etapas de recobrimentos para que esta partícula seja estável em meio fisiológico. A disponibilidade de uma superfície hidrofílica auxilia nos posteriores recobrimentos, garantindo que estes sejam mais eficientes.

Foram testados alguns recobrimentos com esta nanopartícula, porém sem sucesso, talvez pela presença de algumas moléculas de ácido oleico e oleilamina ainda presentes em sua superfície. Houve uma tentativa que resultou em partículas relativamente estáveis e dispersas em água, recobertas com ácido aminocapróico. Porém, de acordo com a Figura 28, onde o resultado das microscopias TEM é mostrado, observa-se que as NPs possuíam duas distribuições de tamanho Figura 28 (d). Isso se decorre do fato que este recobrimento só foi possível ao utilizar um sonicador (*Sonics Vibra Cell*, VCX 750), com a programação: tempo de 1 hora, com pulso de 20s ligado e 40s desligado e amplitude de 25% (10J/pulso). Apesar do bom resultado de estabilidade desta nanopartícula em meio aquoso, concluiu-se que o método foi agressivo e não foi interessante ao propósito do trabalho.

Figura 28 Análises das NPs lavadas em metanol a quente recobertas com ácido aminocapróico. (a) e (b) MET. (c) FTIR (d) Histograma de distribuição de tamanho

Fonte: Autoria própria

4.2.2 Recobrimento com ácido aminocapróico (EACA) via troca de ligantes

O ácido aminocapróico (ou ácido ϵ -aminohexanoico, ou EACA) é um composto derivado do aminoácido lisina. Este ácido possui atividade anti-fibrinolítica, reduzindo a ação da enzima que degrada coágulos de fibrina (plasmina), o fibrinogênio e outras proteínas plasmáticas, incluindo procoagulantes V e VII.⁹² Sendo assim, este composto é utilizado no tratamento e profilaxias de hemorragias, inclusive hemorragias induzidas (para a dissolução de coágulos) e pós-cirúrgicas, pois pode prevenir a formação de lipoproteínas, um grande fator de risco para doenças vasculares.^{92, 93}

A utilização do EACA para fins medicinais motivou sua utilização para conferir às NPs de magnetita um caráter hidrofílico. Além disso, sua estrutura com um grupamento ácido carboxílico e um grupamento amino, ambos livres para realizarem ligações e/ou interações com esta superfície, motivou seu uso e estudo neste sistema.

Baseando-se no fato que existem moléculas de ácido oleico e oleilamina adsorvidas na superfície das NPs de magnetita, foi realizado um procedimento para que estas moléculas fossem trocadas por moléculas de EACA a fim de proporcionar um caráter hidrofílico à esta superfície.

O banho de ultrassom auxiliou para que as partículas estivessem em constante movimento, garantindo boa homogeneização no mecanismo e facilitando a cinética da troca de ligantes. Foi realizado o teste em meio ácido (HCl) que contou com a adição de pequena quantidade de NaCl para que este reagisse com o ácido oleico do meio, formando oleato de sódio, o que possivelmente auxiliaria a lavagem das partículas e na eliminação deste.

O procedimento resultou em NPs estáveis, dispersas em água, com pH final de aproximadamente 6. Na Figura 29, observa-se a estrutura do ácido aminocapróico e um esquema de uma possível estrutura após a troca de ligantes de ácido oleico e oleilamina pelas moléculas do ácido, de caráter mais polar. Observando o esquema, é possível notar que a molécula de ácido possui em suas extremidades grupamentos ácido e amina. Desta forma, nota-se que existem duas possibilidades de ligação na superfície do óxido de ferro: pelo grupamento ácido ou pelo grupamento amino, resultados futuramente confirmados pelos valores de potencial zeta (item 4.3.3.1)

Figura 29 (a) Estrutura do EACA, que participa do mecanismo de troca com moléculas da superfície. (b) Esquema da forma com que a superfície da magnetita fica protegida pelo ácido oleico e oleilamina e possível estrutura após a troca de ligantes.

Fonte: Autoria própria

Durante a lavagem destas amostras com água, foi observada a formação de espuma, o que pode ser uma evidência da presença de ácido oleico no meio, formando oleato de sódio, um tensoativo. Desta forma, o procedimento de lavagem foi repetido por diversas vezes, até que não fosse mais notada a presença desta espuma, evidenciando uma possível eliminação do oleato de sódio. O resultado é mostrado nas micrografias da Figura 30, onde é observado que o sistema foi constituído por NPs aglomeradas (principalmente devido ao fato das amostras de microscopia terem sido preparadas em meio aquoso), porém com bom controle de forma e tamanho, conforme esperado devido ao resultado da síntese. No histograma de distribuição de tamanho (Figura 30 (c)), observa-se que não houve alteração no diâmetro médio das NPs após esta etapa de recobrimento.

Figura 30 (a) e (b) MET da amostra de magnetita recoberta com ácido aminocapróico. (c) Histograma da distribuição de tamanho com curva de ajuste LogNormal. (d) FTIR desta amostra.

Fonte: Autoria própria

Na Figura 30 também observa-se o espectro infravermelho da amostra. Existem duas bandas provenientes da deformação axial de C-O e da deformação angular de O-H, localizadas em 1390 cm^{-1} e em 1467 cm^{-1} . Além disso, em 1730 cm^{-1} , pode-se constatar a presença de uma banda proveniente de grupos carboxilas livres. As bandas em 2925 e 2854 cm^{-1} podem ser atribuídas aos estiramentos simétrico e assimétrico dos grupos $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$ em estruturas ácidas, provavelmente providas de ácido oleico presente no sistema, ou moléculas de EACA que tenham se adsorvido na superfície da NPs pela amina, deixando o grupamento ácido livre. Existe a possibilidade de sinal da função amina nestas amostras, mesmo que o esperado em meio ácido fosse a disponibilidade somente de grupamentos carboxilatos. Pode-se notar que em 1557 cm^{-1} existe o sinal da deformação angular simétrica no plano de H-N-H. A banda em 1080 cm^{-1} pode ser associada a ligações C-N não conjugadas.⁹¹

A fim de adaptar o procedimento para um recobrimento mais efetivo possível, foi estudado o tempo de reação das amostras. Para este estudo, foram coletadas

alíquotas das amostras com tempos de 1, 2, 2,5 e 3 horas de reação no banho de ultrassom que posteriormente foram analisadas via espectroscopia no infravermelho (Figura 31).

Através da interpretação dos dados de FTIR, observa-se que os tempos entre 2 e 3 horas de reação obtiveram bons resultados na troca de ligantes, visto que no espectro de uma hora de reação, ainda há indícios das bandas que caracterizam a presença de ácido oleico e oleilamina na superfície da nanopartícula (1635 e 1400 cm^{-1}). Para um resultado mais satisfatório, foi delimitado o tempo de 3 horas de reação para todos os sistemas empregando ácido aminocapróico como recobrimento.

Figura 31 Espectro FTIR comparativo as bandas existentes nas amostras de magnetita conforme sintetizada, 1, 2, 2,5 e 3 horas de reação no procedimento de troca de ligantes para modificação de superfície com ácido aminocapróico.

Fonte: Autoria própria

Pelas análises de DLS, pode-se concluir que trata-se de uma amostra monodispersa, conforme mostrado pelo gráfico de intensidade em função da distribuição de tamanho, em que observa-se que a abertura da curva é estreita, o que caracteriza esse tipo de dispersão (Figura 32 a). O índice de polidispersividade fornecido pelas medidas foi de 0,010, novamente confirmando de maneira satisfatória a monodispersividade da amostra. Desta forma, o diâmetro médio hidrodinâmico obtido

foi de 942,6 nm. Tal resultado é confirmado no histograma de distribuição de tamanho pela contagem de partículas. (Figura 32 b).

Figura 32 Resultados da análise de espalhamento de luz dinâmico da amostra de magnetita com ácido aminocapróico. a) distribuição de tamanho pela intensidade. b) histograma da distribuição de tamanho pela quantidade de NPs.

Fontes: a) Zetasizer Software; b) Autoria própria

Apesar do alto valor de diâmetro hidrodinâmico da amostra, o fato do sistema ser caracterizado com uma estreita distribuição de tamanho, demonstrando ser um sistema monodisperso, é um bom resultado para as aplicações biológicas visadas no trabalho. Vale ressaltar que as medidas de DLS foram realizadas após um tempo de estocagem de aproximadamente um mês, o que pode ter levado a este diâmetro de hidratação ter aumentado, e mesmo assim ainda sendo caracterizado como um sistema de boa estabilidade.

Todos os resultados desta troca de ligantes com EACA apresentados até o momento, são correspondentes às NPs de magnetita esféricas, sintetizadas sem o procedimento de tratamento do benziléter antes da síntese. Porém, houve a troca de ligantes também com a magnetita de forma cúbica, sintetizada a partir do precursor acetilacetato de ferro(III) e do benziléter após processo de oxidação (item 4.1). O resultado deste recobrimento foi satisfatório, visto a boa dispersão da amostra como

observado na microscopia TEM (Figura 33) e a eficácia do recobrimento, conforme observado no espectro de FTIR (Figura 33 b). Neste último, confirma-se a ligação das moléculas de EACA na superfície das NPs de magnetita, onde a banda em 3416 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento N-H, o dobramento N-H é observado em 1625 cm^{-1} , além do estiramento C-N em 1049 cm^{-1} . As bandas localizadas na região de 1400 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento C=O do ácido carboxílico que sofreu conjugação na superfície, além disso, em 1721 cm^{-1} , tem-se a banda que caracteriza o estiramento deste grupamento livre na superfície da NP.⁸⁹

Figura 33 Amostra de magnetita cúbica recoberta com EACA (a) TEM (b) HRTEM (c) FTIR

Fonte: Autoria própria

4.2.3 Recobrimento com aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) via troca de ligantes ⁷¹

O recobrimento de NPs com aminosilanos é um procedimento bem difundido na literatura. No procedimento adaptado ⁷¹, as NPs possuem uma etapa preliminar de lavagem por apresentarem impurezas e resíduos de reagentes provenientes da síntese em sua superfície. Porém, as NPs de magnetita resultantes do método do poliol modificado não possuem essa desvantagem. Por este motivo, a lavagem preliminar realizada com tolueno e metanol a quente foi uma etapa rápida e simples. Posteriormente, o sistema teve seu volume completado com hexano, seguida de uma leve acidificação com ácido acético, e o APTMS foi lentamente gotejado às NPs. Foi constatado que a dispersão em hexano da magnetita após a lavagem foi menor em comparação à sua dispersão após a síntese, evidenciando que alguns grupamentos polares estariam mais expostos na superfície destas, como grupamentos -OH provenientes da superfície de óxido de ferro. Após o tempo de reação, foi observado que as NPs não estavam mais dispersas em meio apolar, evidenciando a troca de ligantes em sua superfície.

Na Figura 34 é possível observar os resultados de TEM para estas NPs recobertas. Observa-se que não houve alteração na morfologia destas após o recobrimento, apenas um maior estado de agregação devido ao fato da amostra de TEM ter sido preparada em meio aquoso, o que faz com que haja maior interação entre as moléculas de sua superfície. O diâmetro médio obtido na contagem difere do obtido na contagem da magnetita após a síntese, mas isso pode ter ocorrido devido a fontes de erro como: erros na contagem, no manuseio do software, além do fato de serem sínteses realizadas em momentos diferentes e pode ter havido uma ligeira diferença de tamanho nestas.

Figura 34 (a) e (b) MET da amostra de magnetita recoberta com APTMS. (c) Histograma da distribuição de tamanho com curva de ajuste LogNormal. (d) FTIR desta amostra.

Fonte: autoria própria

Ao observar-se o espectro de FTIR (Figura 34 d), pode-se atribuir a banda presente em 1642 cm^{-1} à amina adsorvida sobre a superfície das NPs⁹⁴. Esta pode estar sobreposta à banda referente ao estiramento simétrico de grupos carboxilatos ($-\text{COO}^-$), também adsorvidos à superfície⁸⁸. A modificação de superfície pode ser comprovada pelo aparecimento de uma forte banda de absorção na região entre 1000 e 1100 cm^{-1} , atribuída à condensação de grupos siloxanos (Si-O-Si) nas NPs.^{95,96} As bandas observadas em 3423 cm^{-1} , 1642 cm^{-1} e 1442 cm^{-1} são características, respectivamente, de estiramentos vibracionais em ligações N-H, deformações angulares em grupos $-\text{NH}_2$ e estiramentos vibracionais em ligações C-N, o que comprova a presença de grupos amino livres sob a superfície das NPs.^{91,96}

Dadas as atribuições de bandas no FTIR, pode-se constatar a presença de grupos silano condensados na superfície das NPs, enquanto estas moléculas também disponibilizam grupamentos amina livres para uma posterior funcionalização. Sendo assim, algumas estruturas de ligações após a troca de ligantes podem ser consideradas. Segundo a literatura⁹⁷, uma das conformações mais favorável energeticamente é semelhante a apresentada na Figura 35.

Figura 35 Proposta mais aceita pela literatura conformação do APTMS na superfície da NP⁹⁷

Fonte: Autoria própria

Analisando os dados de DLS em pH = 7,0, observa-se que existe uma faixa estreita de distribuição de tamanho pela intensidade de contagens (Figura 36 a), porém existe diferença entre as curvas plotadas, evidenciando o resultado de um sistema polidisperso, já que um sistema estável e monodisperso resultaria em curvas coincidentes em todas as varreduras realizadas. Corroborando a isto, o índice de polidispersividade desta amostra foi de 0,572, e o raio hidrodinâmico médio de 1197 nm, valores ligeiramente acima do esperado para amostras monodispersas. Na Figura 36 b é observado o histograma de distribuição de tamanho pelo número de partículas na contagem. De acordo com os dados obtidos, tais resultados não seriam satisfatórios para aplicações biológicas, visto a baixa estabilidade, formando um sistema floculado e com partículas que agravariam o risco de embolias venosas, por exemplo. Porém, cabe ressaltar que tais análises foram realizadas após certo tempo de estocagem e que estas NPs recobertas servirão para futuras funcionalizações, e sua boa dispersão neste meio é o importante para o resultado final do sistema.

Figura 36 Análise de DLS da amostra de magnetita com APTMS a) distribuição de tamanho pela intensidade. b) histograma da distribuição de tamanho pelo número de NPs

Fontes: a) Zetasizer Software; b) Autoria própria

4.2.4 Recobrimento com ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) ⁴³

O ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) tem sido estudado desde meados dos anos 70 como finalidade de agente quelante para a descontaminação por metais pesados, como mercúrio, arsênio e cádmio. Por ser hidrossolúvel, o DMSA possui a vantagem de ser um poderoso quelante de via oral.⁹⁸ Por possuir uma baixa toxicidade ao organismo humano e já possuir utilizações medicinais, a utilização do DMSA como recobrimento de NPs aumenta a chance de sua biocompatibilização como futura utilização em fármacos.

O procedimento realizado foi adaptado com relação à literatura devido ao fato de que as NPs utilizadas por Salas *et al.*⁴³ serem provenientes de outro tipo de síntese e por isso possuíam características de superfície diferentes, requerendo mais tempo de lavagem e de reação para um recobrimento efetivo (72 horas), além de um procedimento de diálise das partículas resultantes. De acordo com resultado mostrado na Figura 37, a diálise não foi necessária para este sistema, já que os resultados de dispersão das partículas antes e após o processo são semelhantes.

Os testes com diferentes tempos de reação serão apresentados discutidos na seção contendo dados de estabilidade coloidal dos sistemas (item 4.3.3). Foram utilizadas amostras diluídas e todas com pH=9 (pH definido de acordo com melhores resultados de estabilidade coloidal). A olho nu pode observar-se que as partículas recobertas com DMSA são altamente estáveis em meio aquoso, visto que não foi observada floculação destas, somente a longo prazo (alguns meses).

De acordo com Salas et al., o recobrimento é composto por etapas como: substituição do ácido oleico ligado à superfície da magnetita por moléculas de DMSA, seguida da alcalinização para o aumento da carga superficial, aumentando estabilidade coloidal entre os grupos -COO^- . Os grupos tiol que não estão envolvidos em pontes de enxofre e estão desprotonados no pH básico resultam em grupos tiol que possuem afinidade por átomos de ferro e acabam direcionando parcialmente a substituição na superfície das NPs.

Figura 37 MET das NPs de magnetita recobertas com DMSA (a) sem procedimento de diálise (b) com procedimento de diálise. (c) FTIR da amostra sem diálise. (d) Histograma da distribuição de tamanho da amostra sem diálise.

Fonte: Autoria própria

No espectro de FTIR (Figura 37 c) pode-se atribuir as bandas de intensidade fraca em 2200 cm^{-1} e de intensidade moderada em 1200 cm^{-1} à compostos sulfurados. As demais bandas são atribuídas a grupamentos ácidos e também à ligação Fe-O da magnetita.⁹¹ Conclui-se então que o DMSA está ligado à superfície da magnetita, não há aglomeração das partículas, caracterizando um bom sistema para que prossiga-se com estas condições para nas próximas etapas.

Na Figura 38, observa-se o resultado dos dados de DLS no pH= 9,0. Comparado a resultados de outros recobrimentos, este é o que apresenta menor valor de raio hidrodinâmico (142,9 nm) e faixa mais estreita de distribuição de tamanho por número de contagens e consequentemente menor índice de polidispersividade (0,405). Tais resultados demonstram que este é um sistema que se aproxima ao comportamento de monodispersividade, possuindo características interessantes para possíveis aplicações em sistemas biológicos.

Figura 38 – Histograma de distribuição de tamanho pelo número de contagens da amostra de magnetita recoberta com DMSA.

Fonte: Autoria própria

4.2.5 Ensaios de hipertermia das amostras de NPs recobertas

As NPs sintetizadas possuíam comportamento superparamagnético à temperatura ambiente, conforme já discutido. Por não apresentarem remanência, valores muito baixos de coercividade, e terem atingido valores de magnetização com baixos valores de campo magnético aplicado, as NPs possuíam características necessárias para aplicações em sistemas biológicos. A aplicação em hipertermia depende principalmente desta última característica, pois requer que as partículas

tenham resposta magnética quando submetidas a campos magnéticos externos aplicados.

Foram realizados ensaios de hipertermia com todas as NPs recobertas, inclusive a de forma cúbica. Os resultados são mostrados na Figura 39 e ao observá-los pode-se concluir que a amostra recoberta com DMSA possui maior resposta ao campo aplicado. Observa-se também que as flutuações neste sistema foram menores que as demais, evidenciando a maior estabilidade.

Apesar da resposta ao campo magnético, os resultados não foram satisfatórios devido ao longo tempo necessário para o aumento de aproximadamente 10°C. Além disso, embora fossem esperados melhores resultados de hipertermia para as NPs cúbicas, estas apresentaram o pior comportamento. Por este motivo, nas demais etapas do projeto, foram utilizadas as NPs esféricas.

Figura 39 Resultados de ensaios de hipertermia realizados com as NPs recobertas.

Fonte: Autoria própria

4.3 Estabilidade coloidal das NPs de magnetita recobertas

A estabilidade coloidal é um fator muito importante a ser levado em consideração quando trata-se de aplicações biológicas para as NPs magnéticas. Embora existam diferentes formas de dosagem e aplicações, alguns problemas de estabilidade

são comuns para todas estas, como a sedimentação, a aglomeração ou o crescimento de cristais (no caso de NPs de fármacos). Por exemplo, a aglomeração de partículas pode causar grandes problemas em medicamentos pulmonares, uma vez que esta afeta a quantidade de deposição e a eficácia do medicamento. Ou também pode causar a embolia em casos de administração intravenosa.⁹⁹

O potencial zeta não é uma medida possível de se realizar diretamente, assim utiliza-se a mobilidade eletroforética para que seja feita a medida indireta deste. A mobilidade nada mais é do que o quociente da velocidade de deslocamento pelo campo elétrico aplicado na medida, e relaciona-se com o potencial zeta de acordo com a expressão:

$$U_E = \frac{2\varepsilon Z f(\kappa a)}{3\eta},$$

em que U_E é a mobilidade eletroforética, z é o potencial zeta, ε é a constante dielétrica, η é a viscosidade do dispersante e $f(\kappa a)$ é a função de Henry.³⁸

A estabilidade coloidal do meio é obtida por basicamente dois fatores: a repulsão estérica, que neste caso é garantida devido à adição de recobrimentos na superfície da nanopartícula, o que garante que mesmo que fina, a camada de recobrimento é suficiente para que as partículas sejam mantidas separadas e as forças atrativas de van der Waals são muito fracas para causar a adesão entre as partículas. Outro fator é a repulsão eletrostática, que é o estudado no caso da variação do pH, já que o efeito de adesão das partículas é causado pela distribuição de carga das espécies carregadas no sistema.

A magnitude do potencial zeta dá a informação do potencial de estabilidade do sistema coloidal. Em valores iguais a zero ou muito baixos, não há força para prevenir que as partículas estejam juntas e floculadas. Aumentando-se estes valores, as partículas tendem a se repelir e não há tendência destas partículas sofrerem atração entre si.³⁸

Os resultados de estabilidade obtidos pela medida de potencial zeta podem ser confirmados ao interpretar os resultados de DLS das amostras através dos valores de diâmetros hidrodinâmicos ($Z_{average}$) e índices de polidispersividade (PDI). Regiões de instabilidade coloidal apresentam maiores índices de polidispersividade e maiores

valores de diâmetro hidrodinâmico, já que apresentam aglomerados de NPs, com ineficiência nos fatores estéricos e eletrostáticos.

4.3.1 Estabilidade coloidal das NPs de magnetita recobertas com EACA, APTMS E DMSA

4.3.1.1 Medidas de potencial zeta e mobilidade eletroforética

Primeiramente, observando os valores de potencial zeta da amostra recoberta com EACA, contidos no gráfico da Figura 40, pode-se observar que em regiões de pH entre 4,5 e 9,5, há uma nítida tendência a valores de potencial ζ iguais ou próximos a zero. Conforme já discutido, esta é a característica que determina a estabilidade de um sistema. Com valores de carga na superfície iguais a zero, ou muito próximos a este, há a maior condição de atração entre as NPs recobertas, causando assim a maior condição de floculação destas. Observando o gráfico, nota-se que este sistema possui condições de estabilidade em meio ácido (pH=4) e em meio básico (pH= 10 e 11), demonstrando assim que por tratar-se de uma molécula contendo grupamentos ácido carboxílico e amina, existe um comportamento de que algumas moléculas foram ligadas pelo grupamento ácido, deixando o grupamento amino livre e vice-versa. No gráfico constam também os valores de mobilidade eletroforética da amostra, grandeza medida para determinação indireta do potencial ζ , e seus valores próximos e concordantes demonstram a eficiência da medida, bem como os baixos valores de índices de erro representados, exceto no pH=12 em que o erro foi maior, evidenciando não ser uma medida tão confiável, principalmente devido à instabilidade do sistema neste pH.

Figura 40 Gráfico de potencial zeta e mobilidade eletroforética versus pH, para estudo da estabilidade coloidal das NPs recobertas com EACA.

Fonte: Autoria própria

Analisando o sistema de NPs recobertas com APTMS e realizando as medidas de mobilidade e potencial zeta, tem-se o gráfico mostrado na Figura 41. Neste sistema, observa-se que o ponto isoeletrônico foi medido no pH=5,13, em que o valor de ζ é igual a zero, ou seja, em pH=5,13 a carga total de superfície da molécula de recobrimento é nula, e o sistema possui seu mais alto índice de sedimentação, sendo assim sua região mais instável. Observa-se também que o sistema com APTMS possui regiões de estabilidade coloidal somente em valores de pH próximos a 10 e 11, limitando assim as suas aplicações e etapas de posteriores funcionalizações. Ressalta-se aqui a quantidade de valores que aparentemente apresentam erros de medidas, tais como o pH = 7,7, em que seu valor de potencial ζ não possuiu a mesma tendência dos demais valores, e também a grande diferença entre os valores de mobilidade e potencial ζ no pH= 11,8. Tais erros podem ser devido a falha no preparo das amostras ou regiões de instabilidade coloidal, bem como erros de leitura do equipamento e no ajuste manual de pH de cada amostra.

Figura 41 Gráfico de potencial zeta e mobilidade eletroforética versus pH, para estudo da estabilidade coloidal das NPs recobertas com APTMS.

Fonte: Autoria própria

No sistema de NPs recobertas com DMSA, é possível observar menores fontes de erro conforme já citadas. Observa-se pela tendência das medidas que o ponto isoeletrônico deste sistema encontra-se em pH próximo a 5,9. Também é possível notar que em regiões de pH inferiores a 4 e superiores a 7, trata-se de um sistema estável, evidenciando ser um bom recobrimento para atuar em várias etapas posteriores de funcionalização. (Figura 42). Tal região de estabilidade se dá pela uniforme ligação da molécula de DMSA na superfície da nanopartícula, deixando livres para funcionalizações alguns grupamentos hidroxila, resultante de um eficaz processo de recobrimento.

Figura 42 Gráfico de potencial zeta e mobilidade eletroforética versus pH, para estudo da estabilidade coloidal das NPs recobertas com DMSA.

Fonte: Autoria própria

Desta forma, observa-se que para todos os sistemas, os valores de potenciais encontrados próximos ao pH fisiológico (pH entre 6,0 e 8,0) não são altos o suficiente para haver a dispersão (e não agregação) das nanopartículas. Apenas no sistema com recobrimento de DMSA os valores são aceitáveis, acima de -30 mV, caracterizando-se o melhor sistema para as devidas aplicações.

4.3.1.2 Medidas de diâmetro hidrodinâmico

Conforme já discutido no início desta seção, os valores de diâmetro hidrodinâmico podem ser diretamente relacionados a regiões de estabilidade ou instabilidade dos sistemas, concordando também com valores de potencial zeta e, consequentemente de seus índices de polidispersividade.

Pelo gráfico contido na Figura 43 que correlaciona os valores de potencial ζ e de diâmetro hidrodinâmico obtidos nos diferentes valores de pH, pode-se observar exatamente o comportamento já citados: em casos de estabilidade coloidal (potencial zeta maior ou menor que ± 30), tem-se os menores valores de diâmetros hidrodinâmicos. Conclui-se então que a região cujas NPs recobertas com EACA possuem menor estado de agregação, e consequentemente menor valor de diâmetro. Assim, as regiões de estabilidade das nanopartículas recobertas com EACA são: entre os pHs 3 e 4, e entre 10 e 12.

O gráfico da Figura 44 que correlaciona os valores de pH com os diâmetros hidrodinâmicos e o índice de polidispersividade (PDI) demonstra a relação direta entre as duas variáveis dependentes. Conforme o valor de diâmetro hidrodinâmico aumenta, o caráter monodisperso da amostra também aumenta, caracterizando sistemas floculados, com aglomerados de NPs que demonstram um sistema não estável.

Figura 43 Gráfico de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico versus pH para confirmação da região de estabilidade do sistema de NPs recobertas com EACA.

Fonte: Autoria própria

Figura 44 Gráfico de diâmetro hidrodinâmico e PDI versus pH para confirmação da região de estabilidade do sistema de NPs recobertas com EACA.

Fonte: Autoria própria

Outra maneira de observar graus de estabilidade em diferentes sistemas é a interpretação do formato da distribuição de tamanho pelo número (porcentagem de partículas). A análise de DLS se dá a partir de uma correlação do movimento browniano das partículas em suspensão: para pequenas partículas há uma rápida flutuação devido ao rápido movimento browniano, gerando uma correlação lenta e consequentemente

uma distribuição mais larga e de menor valor de diâmetros hidrodinâmicos. O inverso ocorre para partículas maiores: a correlação é mais lenta devido a flutuação mais lenta, ocasionando uma menor diferença entre estes movimentos com o tempo, consequentemente gerando uma distribuição mais estreita de partículas com maior diâmetro hidrodinâmico.¹⁰⁰ Na Figura 45 estão contidos os histogramas de distribuição de tamanho pelo número das regiões de estabilidade (Figura 45(a) e (b)) e de instabilidade (Figura 45(c), confirmando o que já foi interpretado: distribuições largas, relativamente simétricas e de baixo diâmetro hidrodinâmico caracterizam sistemas estáveis (pHs 3,1 e 11,8), enquanto uma estreita distribuição e assimétrica caracterizam sistemas instáveis (pH 8,5).

Figura 45 Resultados das distribuições de diâmetro hidrodinâmico por número da amostra de nanopartícula recoberta com EACA em diferentes pHs. (a) pH= 3,1 (b) pH= 11,8 (c) pH= 8,5.

Fonte: Autoria própria

Para a conclusão do estudo de estabilidade coloidal pelas medidas de DLS, foram realizados testes com concentrações variadas em diferentes solventes: água e tampão SBF. Sendo a medida de DLS diretamente ligada à viscosidade do solvente devido a influência do movimento browniano das partículas, foi necessário testar os valores de

diâmetro hidrodinâmico em um meio que mimetiza o plasma sanguíneo para que fossem medidas próximas a um comportamento real no caso de uma possível aplicação em biomedicina.

Para este teste, foram realizados 15 ciclos com duração de 60 segundos cada, para acompanhar valores de diâmetro hidrodinâmico em cada um. Foram realizadas variações de concentração das NPs em SBF e com uma concentração fixa das NPs dispersas em água.

Na Figura 46, é possível observar o comportamento da amostra recoberta com EACA. Observa-se que em água há o melhor comportamento da amostra, com comportamento próximo a valores constantes de diâmetro hidrodinâmico, apesar da concentração relativamente alta de partículas no sistema. Nos sistemas em SBF, observa-se que não há constância nos valores, exceto na concentração de $10 \mu\text{g. mL}^{-1}$. O comportamento pode ser justificado pela alta concentração salina no tampão, que influencia a força iônica do meio, de modo altera-se a mobilidade das partículas e o transporte de carga na solução. Nota-se então que a uma concentração de $10 \mu\text{g. mL}^{-1}$, NPs de magnetita recobertas com EACA, há um bom índice de estabilidade coloidal no sistema.

Figura 46 Diâmetro hidrodinâmico em função do tempo para o sistema de NPs recobertas com EACA em diferentes solventes e concentrações.

Fonte: autoria própria

Os estudos de estabilidade coloidal com as NPs recobertas com APTMS e DMSA apresentaram as mesmas análises e características das discutidas acima com o EACA,

conforme observado na Figura 47. O resultado das partículas recobertas com APTMS torna-se interessante visando a aplicação em biomedicina, já que demonstra que mesmo com concentrações salinas semelhantes ao plasma sanguíneo, ao longo de 15 minutos observa-se um comportamento de satisfatória estabilidade coloidal. Já no sistema com DMSA, observa-se que o comportamento deste é semelhante ao sistema com EACA, em que há bons resultados de estabilidade coloidal em baixas concentrações de NPs quando trata-se do SBF como meio dispersante.

Figura 47 Diâmetro hidrodinâmico em função do tempo em sistemas com diferentes solventes e concentrações de NPs recobertas com (a) APTMS (b) DMSA.

Fonte: Autoria própria

Confirmando resultados de potenciais zeta, observa-se na Figura 48 (a) e (b), os resultados comparativos ao potencial zeta e diâmetros hidrodinâmicos em diferentes

pHs nos sistemas recobertas com APTMS e DMSA, respectivamente. Para o sistema com APTMS, conforme observado nos valores de potencial zeta, conclui-se que a região de maior estabilidade é aquela em que os potenciais estão em regiões acima de + 30 mV e – 30 mV, ou seja, somente acima de pH = 11, em que é relacionado aos menores valores de diâmetros hidrodinâmicos. O mesmo ocorre com o sistema recoberto com DMSA, em que a região de estabilidade ocorre a partir de pH = 7, acentuando-se em 9, em que há menor valor de diâmetro.

Figura 48 Gráfico de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico versus pH para confirmação da região de estabilidade do sistema de NPs recobertas com (a) APTMS (b) DMSA.

Fonte: Autoria própria

Já nos resultados em que se relaciona o índice de polidispersividade com o diâmetro hidrodinâmico, pode-se observar na Figura 49 (a) que o sistema contendo APTMS em sua superfície possui valores mais coerentes, em que o PDI está diretamente relacionado aos valores do diâmetro. No sistema com DMSA (b), observa-se

incoerências nestes dados, talvez por tratar-se de regiões de alta instabilidade coloidal, o que interfere no espalhamento da luz em regiões de alta aglomeração de partículas.

Figura 49 Gráfico de diâmetro hidrodinâmico e PDI versus pH para confirmação da região de estabilidade do sistema de NPs recobertas com (a) APTMS (b) DMSA.

Fonte: Autoria própria

4.3.2 Estudos de estabilidade coloidal para otimização do tempo de reação no recobrimento com DMSA

Segundo o procedimento citado no item 3.3.4, o recobrimento com DMSA foi realizado por 28 horas para um resultado efetivo. Nesta seção será discutido como chegou-se neste período de tempo necessário, já que a metodologia é adaptada da

literatura ⁴³, na qual as partículas resultantes possuem em sua superfície uma quantidade maior de ligantes e resíduos de síntese, necessitando então de 72 horas para o recobrimento satisfatório. No final do estudo, concluiu-se que menos tempo é necessário nas NPs de magnetita utilizadas, sendo então a metodologia devidamente aplicada para um recobrimento eficaz.

Foram recolhidas amostras com 4, 24, 28, 48, 55 e 72 horas de reação. Todas foram lavadas, diluídas na mesma concentração e tiveram pH ajustado a 9, conforme os resultados de estabilidade coloidal em função do pH que já foram citados. A olho nu pode ser observado que as partículas recobertas com DMSA são altamente estáveis em meio aquoso, visto que não é observada sedimentação e/ou floculação destas. Baseando-se nisso, foram realizadas medidas de UV-Vis, varrendo comprimentos de onda para observar a variação de transmitância da amostra em determinado tempo. Foi realizada a leitura durante 20 minutos, com a duração de 1 minuto por ciclo. O raciocínio para realizar o teste de estabilidade coloidal neste sistema é que a variação de transmitância representa a sedimentação (ou a floculação) das partículas no sistema aquoso. Quanto menor a variação de transmitância, menor será o estado de sedimentação da amostra, e conseqüentemente, mais estável será a dispersão coloidal. Desta forma, na Figura 50 pode-se observar que as amostras com 4 horas e com 28 horas de reação apresentaram bons resultados de variação de transmitância.

Através da microscopia eletrônica de transmissão e da espectroscopia no infravermelho, conciliados com estes resultados prévios de UV-Vis pôde-se concluir que a melhor amostra foi a com 28 horas de reação.

Figura 50 Espectros no UV-Vis para teste de estabilidade coloidal de NPs de magnetita recobertas com DMSA com a) 4 horas b) 24 horas c) 28 horas de reação.

Fonte: Autoria própria

Observa-se que apesar de na análise de UV-Vis o resultado ter sido satisfatório para a amostra com 4 horas de reação devido baixíssima variação de transmitância, a microscopia não apresentou um bom resultado devido ao estado de agregação das partículas. Na Figura 51(b) observa-se a micrografia da amostra com 28 horas de reação, com estado de agregação satisfatório, bom controle de forma e de tamanho de partículas.

Figura 51 Microscopia TEM das amostras de NPs de magnetita recobertas com DMSA com a) 4 horas b) 28 horas de reação. C) FTIR da amostra com 28 horas de reação

Fonte: Autoria própria

No espectro de FTIR pode-se atribuir as bandas de intensidade fraca em 2200 cm⁻¹ e de intensidade moderada em 1200 cm⁻¹ à compostos sulfurados. As demais bandas são atribuídas a grupamentos ácidos e também à ligação Fe-O da magnetita.⁹¹ Conclui-se então que com 28 horas de reação, o DMSA está ligado à superfície da magnetita, não há aglomeração das partículas, e o sistema possui baixa variação de transmitância a 37 °C, caracterizando um bom sistema para que prossiga-se com estas condições para nas próximas etapas.

4.3.3 Utilização da técnica de variação da transmitância para estudo da estabilidade coloidal

Sendo o estudo da estabilidade coloidal de todos os sistemas obtidos um dos objetivos deste trabalho, além das técnicas convencionais análise, DLS e potencial zeta, foram realizadas análises no UV-Vis para comprovação desta.

Após a confirmação da eficácia desta análise no estudo da estabilidade no sistema de NPs recobertas com DMSA, esta foi realizada nos diversos sistemas de estudo deste projeto. Trata-se de uma técnica preliminar para ajuste da estabilidade coloidal.

Conforme já discutido, esta técnica parte do princípio de varredura dos comprimentos de onda em ciclos de 60 segundos, repetidos por 20 vezes. Sendo assim, consegue-se uma variação dos valores de transmitância, indicando uma possível sedimentação de NPs que antes encontravam-se na dispersão coloidal. Foi estudado o sistema com melhores resultados de estabilidade coloidal obtidos no projeto: NPs de magnetita recobertas com DMSA. Os dados de DLS /PDI em função do pH são descritos na Tabela 5. São observados os PDI de cada uma das amostras. Conforme já discutido, os índices de polidispersividade nas regiões de instabilidade coloidal (entre pH 5 e 6) são maiores que os observados nas demais regiões. Os valores de diâmetro hidrodinâmico médio são representados na tabela, porém cabe aqui ressaltar que se tratando de amostras com índice de polidispersividade muito altos, as medidas de diâmetro carregam muitas fontes de erro e não devem ser consideradas para efeito comparativo. Porém, por exemplo, na amostra de pH= 9,4, há um bom valor de índice de polidispersividade, uma boa distribuição de tamanho de diâmetro hidrodinâmico, passível de ser comparado a dados da espectroscopia no UV-Vis. Assim, estes valores e os dados de potencial zeta discutidos no item 4.3.2 são suficientes para a validação deste método.

Tabela 5 Valores de polidispersividade e de diâmetro hidrodinâmico médio das amostras em função dos pHs, obtidos através da técnica de DLS. Em destaque, as regiões de instabilidade coloidal.

pH	1,97	3,19	3,96	5,35	6,39	7,11	8,08	9,4	10,02	10,74	11,29
PDI	0,777	0,476	0,278	0,865	0,809	0,312	0,454	0,38	0,465	0,342	0,424
D médio (nm)	523,8	715,3	1308	906,9	2377	476,2	436,3	146,1	423,7	136	187,2

Fonte: Autoria própria

Comparando estes valores com os gráficos obtidos pelo procedimento de varredura no UV-Vis, observa-se que os resultados concordam: quanto maior o valor de variação da transmitância do sistema, maior o PDI e o diâmetro médio, além de corresponder a valores de potencial zeta próximos ou iguais a zero. Na Figura 52 pode-se constatar os resultados em valores de pH fisiológicos, e não-fisiológicos: em valores de pH próximos a 7 e 8, observa-se variações de transmitância dos ciclos com valores ao redor de 1,5%, além disso, em valores de pH básico (pH= 10), a variação de transmitância também possui um baixo valor (1,53%). O mesmo não ocorre no ponto isoeletrônico do sistema (pH = 6), em que se observa a variação total de transmitância ao redor de 30%, indicando grande sedimentação das partículas floculadas. E por fim, concordando com os conceitos e dados da espectroscopia no UV-Vis, na Figura 53 observa-se o comportamento do sistema após duas semanas de repouso, demonstrando que valores intermediários de pH correspondem às regiões de instabilidade coloidal das NPs recobertas com DMSA.

Figura 52 Gráficos correspondentes às análises no UV-Vis da amostra de magnetita recoberta com DMSA em pHs variados.

Fonte: Autoria própria

Figura 53 Fotografia das amostras de magnetita recobertas com DMSA, com pHs variados de 2 a 12, após 2 semanas de estocagem.

Fonte: Autoria própria

4.4 Funcionalização das NPs de magnetita com ácido fólico

As aplicações de imagem por ressonância magnética (IRM) e liberação controlada de fármacos podem ser associadas com os sistemas de NPs magnéticas funcionalizadas com biomoléculas, possibilitando o diagnóstico e a terapia de um tumor. NPs com propriedades superparamagnéticas servem como um agente de melhoramento de contraste na técnica de IRM, enquanto moléculas presentes em sua

superfície podem ser usadas como carregadores para células-alvo. Para que o objetivo seja cumprido, é necessário conjugar o sistema da nanopartícula com moléculas biológicas ou químicas de baixa massa molar que tenham elevada afinidade com as células-alvo e elevada eficiência na internalização celular das NPs.⁵⁶

O ácido fólico é reconhecido como um efetivo agente alvo para tumores. Os receptores folato estão expressos nas membranas celulares de muitas células cancerígenas, tais como, de ovário, de endométrio, de mama, de colo-retal, de pulmão, carcinomas de células renais e carcinomas neuroendócrinos.^{37,38}

Receptores folato existem em grandes quantidades em inúmeros tipos de células cancerígenas e são raramente encontrados em células saudáveis. Além disso, compostos conjugados (funcionalizando NPs, por exemplo) de folato são ligados covalentemente através da γ -carboxila, e devido a isto há a ligação nos receptores folato da mesma forma com que ocorrem as ligações por compostos de folato livres.⁸

A literatura apresenta diferentes tipos de carbodiimida como moléculas de acoplamento para a formação da ligação amida entre a o grupamento amina livre (disponível na molécula do recobrimento) e os ácidos carboxílicos¹⁰¹. Neste trabalho foi utilizado o cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilamino) carbodiimida devido a sua solubilidade em meio aquoso.⁷⁷ A reação entre a carbodiimida e os grupos carboxílicos formam um anidrido misto o-acilisourea, molécula que pode sofrer racemização formando a N-aciluréia. Este último é um composto estável e pode impedir a formação da ligação amida. Para evitar esta racemização, utiliza-se um agente nucleofílico, neste caso o NHS, que reage com o o-acilisourea para formar um éster intermediário ativo e um subproduto da ureia. Este éster ativo é suficientemente ativo para acoplar com a amina na superfície das NPs para a formação da amida.¹⁰¹ O banho de gelo e o longo tempo de reação são fatores que influenciam a etapa lenta da reação e, consequentemente, a formação do produto desejado. (Figura 54)

No segundo procedimento, a ativação do ácido fólico com carbodiimida segue o procedimento semelhante como já descrito. Porém, a diferença do tempo de reação e no procedimento com utilização de banho de gelo se dá devido ao fato de que não houve a ligação direta do ácido fólico ao grupo amina, mas sim pela interação lateral com as cadeias de APTMS ou EACA. (Figura 55)

Sendo assim, a ausência do NHS no segundo procedimento pode diminuir o rendimento desta reação, diminuindo também a concentração de ligantes folato na superfície das NPs. Porém, foi escolhido trabalhar-se com este procedimento devido a rapidez do procedimento (4 horas) em comparação ao primeiro (24 horas), comparando-se os resultados de ambos, foi possível avaliar se estes benefícios foram satisfatórios.

No terceiro procedimento, o ácido carboxílico livre é esterificado para um éster succinimidal, que permite a amidação aquosa do ácido fólico devido a disponibilidade da amina primária em suspensão aquosa, contida nas nanopartículas. Para esta reação ocorrer preferencialmente, o grupo amino do ácido fólico é protegido com t-boc, um grupo protetor que permite esta amidação. A cinética do procedimento foi acelerada pela temperatura do banho e pela constante agitação e choque de moléculas-partículas, garantindo o alto rendimento de funcionalização.⁷⁶ Neste projeto não foi desenvolvida a etapa seguinte a este procedimento, que é a desproteção da molécula de ácido fólico, para tornar este sistema funcional à interação de ligantes folato nas células. Na Figura 56, observa-se um esquema da NP com as moléculas de funcionalização.

Figura 54 Mecanismo do procedimento de funcionalização da NP com AF via reação com carbodiimida na presença de NHS (1º procedimento)

Figura 55 Mecanismo do procedimento de funcionalização da NP com AF via reação com carbodiimida

★ = folato ativado

Magnetita funcionalizada

Figura 56 Esquema da superfície da NP com recobrimento de APTMS e funcionalização de AF protegido por t-boc

4.4.1 1º procedimento: Funcionalização com ácido fólico via reação com carbodiimida na presença de NHS

Foi realizado o 1º procedimento utilizando-se as amostras recobertas com APTMS e EACA. Os resultados de microscopia de transmissão são mostrados da Figura 57.

É possível observar que são sistemas com certo grau de aglomeração de partículas, porém este comportamento é esperado pelos seguintes motivos: a amostra foi dispersa em água para preparo do *grid* de microscopia, possuindo o processo de evaporação lento na preparação da amostra de microscopia. Além disso, há o aumento da energia de superfície nas moléculas funcionalizadas devido a presença do ácido fólico no sistema.

Na observação dos correlogramas das amostras pela análise de DLS (Figura 57 (c) e (f)), este grau de aglomeração é confirmado devido aos ruídos presentes na linha de base destes. Esta variação se dá devido a diferença de tamanhos de partículas no sistema: partículas menores possuem movimento browniano facilitado e rápido, e seu coeficiente de correlação permanece praticamente constante na leitura com o tempo. Partículas maiores (aglomerados) possuem movimento browniano lento, ocasionando flutuações em seus coeficientes de correlação, logo ocasionando ruídos.

Figura 57 TEM das NPs funcionalizadas com AF via procedimento de carbodiimida com NHS. (a) e (b) utilizando NPs com APTMS. (c) correlograma das amostras com AF e APTMS. (d) e (e) utilizando NPs recobertas com EACA. (f) correlograma das amostras com AF e EACA.

Fonte: Autoria própria

Uma forma de confirmação da eficiência da funcionalização com ácido fólico é através da análise por FTIR. Anteriormente recobertas com moléculas de EACA ou APTMS, estas nanopartículas possuíam em seu espectro, bandas atribuídas à grupos amino livres. Estes

grupos são os responsáveis pela reação peptídica para formação da amida, que caracteriza a eficácia da funcionalização (Figura 58)

Figura 58 FTIR das amostras funcionalizadas para a comprovação da ligação amida na superfície das NPs

Fonte: Autoria própria

A funcionalização de ambos os sistemas pode ser confirmada devido a presença de bandas atribuídas a ligação amida I e II (-C(=O) e -NH-). A banda na frequência 1689 cm^{-1} corresponde ao estiramento -C=O , e a deformação -N-H é representada pelas bandas nas frequências entre 1603 e 1510 cm^{-1} . Ambos os espectros são semelhantes, indicando que este método é eficaz na etapa de funcionalização e que ambos os sistemas são eficientes na disponibilidade de grupamentos amina para a reação.⁹¹

4.4.2 2º procedimento: Funcionalização com ácido fólico via procedimento de interação direta com carbodiimida

Da mesma forma que o 1º procedimento, não é possível concluir algo acerca da qualidade da amostra tratando-se da análise da microscopia TEM. Conforme observa-se na Figura 59, tanto no sistema de NPs recobertas com APTMS quanto nas NPs recobertas com EACA, há um considerável grau de aglomeração do sistema devido a energia de superfície das NPs com ácido fólico.

Na observação dos correlogramas das amostras (Figura 59(c) e (f)), observa-se que o grau de aglomeração observado na microscopia TEM pode ser confirmado em análises de DLS, com maior quantidade de ruídos na linha de base para a amostra recoberta com APTMS.

Figura 59 TEM das amostras funcionalizadas com AF via procedimento de carbodiimida (a) e (b) utilizando NPs recobertas com APTMS. (c) correlograma das amostras com AF e APTMS. (d) e (e) utilizando NPs recobertas com EACA. (f) correlograma das amostras com AF e EA

Fonte: (a), (b), (d), (e) Autoria própria; (c) (f) Zetasizer Software

Nos espectros (Figura 60) são observadas as bandas correspondentes aos estiramentos -C=O e à deformação -N-H como no espectro do procedimento anterior. Porém, por tratar-se

de interações laterais entre as moléculas, observa-se também as bandas correspondentes a estas: uma banda desdobrada em 1074 e 958 cm^{-1} para o APTMS e uma banda em 1082 cm^{-1} para o EACA. Estas bandas são atribuídas à estiramentos -C-O-C- das cadeias laterais. ⁷⁸

Figura 60 FTIR das amostras funcionalizadas para a comprovação da funcionalização das NPs

Fonte: Autoria própria

4.4.3 3º procedimento: Funcionalização com AF protegido por t-boc

Por tratar-se de um procedimento que requeria uma etapa posterior de desproteção da NP, este procedimento foi realizado somente com a NP recoberta com APTMS. Assim, esta etapa do trabalho foi importante para acompanhar a cinética da reação de funcionalização.

A primeira etapa deste procedimento foi a proteção do ácido fólico com o t-boc e para comprovar a reação, foi realizado o espectro no IV para comprovar que o composto AF-tboc havia sido empregado na etapa de funcionalização. O resultado é apresentado na Figura 61 e pode-se observar que houve a formação de um composto diferente do AF e do t-boc isolados.

Figura 61 Espectros de FTIR do t-boc, AF e do composto formado no procedimento de proteção.

Fonte: Autoria própria

Para estudo do procedimento de funcionalização, foram coletadas alíquotas do sistema com 1, 2, 3 e 4 horas de reação. Estas alíquotas foram lavadas e posteriormente analisadas por FTIR e os resultados são contidos na Figura 62. O que é observado com o passar do tempo de reação é que a banda ampla em 1619 cm^{-1} , que corresponde ao intermediário carboxilato, sofre alteração pois conforme há a ligação do ácido fólico, a absorbância passa a ser atribuída às bandas duplas correspondentes a ligação de amida primária em regiões próximas a 1630 e 1504 cm^{-1} .⁷⁶

Pela microscopia TEM (Figura 63), novamente foi observado um sistema com aglomerados de NPs, mas provavelmente devido à preparação da amostra para microscopia. A aglomeração do sistema de NPs em meio aquoso é um fato recorrente em trabalhos que utilizam-se destes materiais e deve ser algo a ser melhorado em uma futura etapa de trabalho.

Figura 62 Espectros de FTIR do acompanhamento da reação de funcionalização pelo procedimento de proteção do AF com t-boc. (a) 1 hora de reação, (b) 2 horas de reação, (c) 3 horas de reação, (d) 4 horas de reação.

Fonte: Autoria própria

Figura 63 (a) e (b) MET da amostra de NPs recobertas com APTMS e funcionalizadas com AF via método de proteção com t-boc.

Fonte: Autoria própria

4.5 Funcionalização das NPs de magnetita via encapsulação com quitosana (QS)

O procedimento de encapsulação, de forma geral, protege moléculas ativas em diversas condições severas, como luz e ambientes quimicamente ativos, ou seja, reduz a perda de agentes ativos. O encapsulante geralmente atua como um carreador para a entrega controlada sob condições específicas, prolongando a atividade deste sistema.⁸¹

A quitosana é um polímero natural e possui vantagens como a capacidade mucoadesiva, é atóxica e biodegradável, sendo um dos carreadores mais adequados para vários materiais.^{81, 105}

Estudos na literatura demonstram que NPs de quitosana tem a vantagem das suas características de biodegradabilidade por diversos processos, como catálise enzimática e variações de pH, tornando-as importantes para a administração de fármacos.^{62, 63, 106}

Todos os procedimentos realizados nas etapas de encapsulação de NPs de magnetita com ou sem modificações na superfície, foram realizados a partir de métodos de síntese de NPs de quitosana reportados na literatura. Os métodos foram adaptados incluindo as NPs de magnetita em etapas julgadas importantes nas reações de reticulação da quitosana com o tripolifosfato.¹⁰⁷

A reação de reticulação ocorre pela interligação de cadeias poliméricas lineares ou ramificadas por ligações iônicas, no caso do tripolifosfato de sódio. O processo de reticulação resulta em ligações cruzadas, produzindo polímeros tridimensionais com alta massa molar (Figura 64). Sabendo que a quitosana é um polieletrólito catiônico, a indução do processo de formação das NPs é o controle da sua interação com o TPP. Assim, sabendo-se as interações e ligações inter e intramoleculares criadas entre o TPP e os grupos amino de cargas positivas da quitosana são responsáveis pelos bons resultados neste processo.⁸⁰

Quanto maior a massa molar deste polímero formado, menos solúvel em água esta estrutura de quitosana será, o que a inutiliza para fins biológicos. Por isso o objetivo desta etapa do projeto é produzir nanocápsulas de quitosana com baixa massa molecular, para as aplicações biológicas já citadas na introdução deste trabalho.

Figura 64 (a) Estrutura da quitosana e formas abreviadas das unidades estruturais da glicosamina (GlcN), destacando os sítios mais suscetíveis às reações de crosslinking. (b) Reação de reticulação pela interação eletrostática entre íons amônio da cadeia da quitosana e os grupos fosfóricos do TPP, encapsulando NPs que são representadas pelos pontos escuros.

Fonte: Soares et al.¹⁰⁸

4.5.1 Encapsulação de magnetita via procedimento adaptado de Calvo et al.²⁸

O procedimento publicado por Calvo é pioneiro na síntese de NPs de quitosana e seu trabalho é desenvolvido a fim de encontrar melhores condições de concentração de ácido acético, concentração de tripolifosfato (TPP), volume de solução de TPP, bem como a concentração de quitosana em meio ácido. Na adaptação do método, realizou-se o procedimento com as melhores condições observadas no trabalho: concentração de TPP = 0,21 mg mL⁻¹, concentração de quitosana = 1 mg mL⁻¹, concentração de ácido acético = 1,75 mg mL⁻¹.

Foram realizados procedimentos semelhantes para NPs de magnetita com três naturezas diferentes: sem recobrimentos, com ácido aminocapróico na superfície, e com superfície lavada com metanol.

Como etapa inicial, realizou-se o procedimento da formação de NPs de quitosana, afim de testar a eficácia do método e para efeito de comparação com os futuros sistemas formados. Seus resultados são mostrados na *Figura 65*, e observa-se que houve a formação de NPs de aproximadamente 60 nm, com valores de diâmetro hidrodinâmico de 115,8 nm e baixo índice de polidispersividade ($PDI=0,380$). Apesar dos valores satisfatórios para o objetivo do trabalho, pelas micrografias observa-se que a formação de NPs não é homogênea, o que demonstrou que para etapas de encapsulação, a etapa de homogeneização do sistema e a adição lenta de TPP seriam fatores determinantes.

Figura 65 Resultados da amostra de nanopartículas de quitosana formadas pelo método segundo Calvo et al. (a) e (b) MET (c) Histograma da distribuição de tamanho pelo número de partículas.

Fonte: Autoria própria

Nos demais procedimentos, a adição de NPs foi realizada na etapa inicial de homogeneização na solução de quitosana para posterior gotejamento da solução de TPP. Por tratar-se do agente de reticulação da reação, sua adição compromete diretamente à formação das desejadas nanocápsulas de quitosana com magnetita.

Os experimentos foram realizados nas mesmas condições, a fim de efeitos comparativos da eficácia do método.

Para o teste realizado com as NPs sem recobrimento, observou-se que o procedimento não foi satisfatório para encapsular a magnetita. Na Figura 66, é possível observar em maior parte a formação de micropartículas de quitosana isoladas, sem partículas de magnetita em

seu interior, tanto no precipitado (Figura 66(a) e (b)) quanto no sobrenadante (Figura 66 (d) e (e)). Porém no sobrenadante é possível observar que formou-se uma grande matriz de quitosana (justificada pelo excesso de reagente com relação à quantidade de NPs utilizadas) e nela a formação de algumas cápsulas de quitosana com as NPs em seu interior. A dupla distribuição de tamanho nos dados de DLS justifica a ineficácia do procedimento, pois pode-se atribuir menores diâmetros hidrodinâmicos às NPs sem recobrimento (presentes em maior número de contagens nos histogramas), e maiores diâmetros às matrizes de quitosana formadas. A ineficácia pode ser justificada pela instabilidade destas NPs na solução inicial de quitosana, não garantindo a homogeneidade do sistema.

Figura 66 Resultados da encapsulação de NPs de magnetita sem tratamento prévio de superfície via procedimento adaptado de Calvo et al. (a) e (b) TEM do sobrenadante do procedimento, (c) DLS do sobrenadante. (d) e (e) TEM do precipitado, (f) DLS do precipitado

Fonte: Autoria própria

Procedimentos realizados com NPs de caráter hidrofílico criam a expectativa de melhores resultados justamente pelo fato de serem bem dispersas em meio aquoso. Os resultados são mostrados na Figura 67.

Figura 67 Resultados da encapsulação de NPs com quitosana segundo o método adaptado de Calvo et al. Amostra com magnetita recoberta com EACA (a) e (b) TEM (c) DLS. (e) e (f) TEM da amostra com magnetita lavada com metanol.

Fonte: Autoria própria

A análise dos dados de TEM possibilitam a conclusão de que o procedimento acima descrito é uma boa alternativa para a formação de nanocápsulas, porém necessita de novas adaptações para melhor controle de forma, tamanho e eficácia de recobrimento. Foi observado que de forma geral as amostras não possuíam regiões uniformes de nanocápsulas com as mesmas características, porém a análise de DLS com distribuições uni modais de tamanho referem-se a um bom índice de bom comportamento de estabilidade coloidal dos sistemas.

No caso específico das NPs lavadas com metanol, observou-se formação de matrizes de quitosana separadamente à magnetita, evidenciando que não houve encapsulação efetivo.

A investigação acerca das ligações formadas nos procedimentos foi realizada via espectroscopia no infravermelho (FTIR) e os resultados são mostrados na *Figura 68*. A adsorção dos grupos de amina primária da quitosana na superfície das NPs via ligação de hidrogênio e ligações covalentes podem ocorrer. A banda acentuada em 3553 cm^{-1} presente somente no sistema contendo NPs recobertas com APTMS são características de estiramentos de grupos -OH e -NH, provavelmente vindos de moléculas de quitosana que não sofreram reação de reticulação. Os demais sistemas possuem bandas nas regiões de 1640, 1580 e 1380

cm^{-1} , que caracterizam amidas primárias, secundárias e terciárias, respectivamente. Estas podem ser provindas das ligações nas superfícies da magnetita, ou da própria reação de reticulação com o TPP. Tais bandas são observadas em todos os sistemas, exceto no que consiste da magnetita lavada com metanol, o que evidencia o não encapsulação conforme já descrito. O sistema contendo somente partículas de quitosana possui uma banda em 1410 cm^{-1} que pode ser atribuída a deformação simétrica de $-\text{CH}$ nos grupos $-\text{CH}_2\text{OH}$ do esqueleto da estrutura da quitosana. Todos os casos possuem bandas bem definidas nas regiões entre 1150 e 1050 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento $-\text{C}-\text{O}-$ e $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ nos anéis de monossacarídeos. Na região de $890-900 \text{ cm}^{-1}$ existe uma banda correspondente ao dobramento $-\text{C}-\text{H}$ da ligação glicosídica que liga os monossacarídeos na cadeia principal da quitosana.⁵⁸

Figura 68 FTIR dos sistemas obtidos nos processos de encapsulação de NPs de magnetita de diversas naturezas segundo o método adaptado de Calvo et al.

Fonte: Autoria própria

4.5.2 Encapsulação de magnetita via processo emulsão água/óleo. ²⁹

O procedimento neste caso inicialmente foi reportado na literatura a fim de encapsular um fármaco. Devido a isto, o método foi escolhido para ser adaptado, já que as cápsulas formadas na literatura possuem estudos de aplicação biológica satisfatórios. Além disto, o método foi selecionado devido ao custo: trata-se de método relativamente barato, já que sua fase óleo é composta por óleo de soja comercial. Sendo assim, foram testados alguns procedimentos a fim de observar se a encapsulação seria mais eficaz com as NPs de caráter hidrofílico ou hidrofóbico.

Por tratar-se de um método constituinte de duas fases distintas, foi possível a boa dispersão das NPs em ambas as fases, sendo este um ponto positivo do método.

Ressalta-se também a presença de dois surfactantes neste procedimento, que auxiliam na lavagem final, além de estabilizarem melhor os meios reacionais, dando mais homogeneidade ao sistema.

Procedimento para encapsulação de NPs de magnetita sem recobrimento: Segundo a característica da natureza da magnetita utilizada neste procedimento, esta foi adicionada à fase óleo do sistema. De forma semelhante ao procedimento realizado com a magnetita de caráter hidrofílico, este procedimento visa primeiramente formar as gotas de óleo na água (incluindo as NPs) via formação de emulsão. Posteriormente, o agente de reticulação é adicionado para que as gotas formadas sejam solidificadas pela reticulação iônica da quitosana, encapsulando-as com TPP. ¹⁰⁹

Algumas dificuldades foram encontradas com a adaptação deste método, principalmente na lavagem final da amostra, em que se observou duas fases distintas: precipitado esbranquiçado, e sobrenadante escuro. Tal análise qualitativa indica a presença de partículas de caráter hidrofóbico presentes no sobrenadante, visto que a densidade do óleo é menor. Assim, foi observado que grande parte da fase óleo não encontrava-se na parte interior das cápsulas de quitosana conforme o esperado.

Nos resultados mostrados na Figura 69, observa-se que a formação de possíveis cápsulas de quitosana com magnetita só foi possível no sobrenadante. O precipitado possuía apenas micropartículas de quitosana e NPs de magnetita dispersas de forma aleatória.

Os dados de DLS não são conclusivos. A amostra do sobrenadante resultou em um diâmetro hidrodinâmico muito pequeno, o que não corresponde ao tamanho de cápsulas observadas no TEM. Isto se deve ao fato da amostra estar muito floculada, com agregados e partículas muito pequenas, caracterizando um sistema com um grau de polidispersividade muito grande, e uma correlação que não pôde ser ajustada corretamente. Os dados de DLS do precipitado correspondem praticamente ao tamanho do diâmetro hidrodinâmico das NPs, visto que estas não foram encapsuladas. Observa-se uma pequena distribuição de tamanhos maiores presente no histograma, justificado pelas demais unidades de quitosana formadas.

Figura 69 Encapsulação de NPs de magnetita como sintetizada via procedimento via emulsão óleo/água. (a) e (b) TEM do sobrenadante do procedimento, (c) DLS do sobrenadante. (d) e (e) TEM do precipitado do procedimento, (f) DLS do precipitado.

A não encapsulação da magnetita pela quitosana pode ser atribuído a alguns fatores, como por exemplo, a concentração de quitosana no meio. É sabido que NPs formam-se em condições ácidas ideais, já que existe repulsão eletrostática entre as moléculas de quitosana e os grupos amino protonados, mas existem interações de ligações de hidrogênio entre as cadeias das moléculas de quitosana, o que leva-se à conclusão de que em certa concentração desta, a atração intermolecular da ligação de hidrogênio e as repulsões eletrostáticas encontram-se em equilíbrio, não prejudicando a formação de partículas. Além disso, as longas cadeias hidrofóbicas de ácido oleico e oleilamina ainda presentes na superfície da magnetita contribuem para a repulsão eletrostática dos grupamentos das cadeias laterais da quitosana, fazendo com que estas tenham repulsão entre si.

Encapsulação de magnetita com ácido aminocapróico via processo emulsão água/óleo:

Repetindo o procedimento anterior, porém utilizando-se a magnetita com recoberta com EACA, foi realizado o procedimento em que estas foram adicionadas à fase aquosa do sistema. Os resultados não foram satisfatórios, porém neste caso analisou-se somente o precipitado que era escuro, e descartou-se a fase de sobrenadante, que não possuía indícios da presença de NPs.

Foi dito que os resultados ainda não foram satisfatórios, pois conforme observado na microscopia TEM (Figura 70) apesar de terem sido formadas algumas unidades com aproximadamente 400 nm contendo magnetita em seu interior, foram formadas também matrizes de quitosana sem controle de forma e sem NPs, e observa-se um grande número de NPs dispersas nestas matrizes. A dificuldade do método também esteve na lavagem do produto final.

O resultado de DLS indicou duas distribuições de tamanho, o que pode ser justificado pelas distribuições das NPs não encapsuladas e das encapsuladas. Não foi obtido um sistema monodisperso, e a correlação indicou grande presença de aglomerados e produtos sedimentados durante a leitura.

Figura 70 Resultados da encapsulação de NPs de magnetita com EACA via procedimento via emulsão óleo/água. (a) e (b) TEM das partículas, (c) DLS das partículas.

Fonte: Autoria própria

Para confirmar as ligações formadas nos sistemas citados, foi realizada a análise por FTIR e seus resultados foram organizados na Figura 71. Observa-se que os sistemas contidos em fase aquosa possuem bandas coincidentes, diferentemente do sistema em meio oleoso. As bandas nas regiões entre 1750 e 1500 cm^{-1} são características das amidas primárias, secundárias e terciárias formadas no sistema. A atribuição das bandas nas regiões de menores números de onda ($1230\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$) se dá por conta na formação de complexos pela interação eletrostática entre grupos fosfato e amônio.⁸¹ O aparecimento de bandas na região de 2900 cm^{-1} nas partículas em meio oleoso pode ser relacionado a algum resquício de óleo de soja que não foi retirado do sistema nas lavagens, pois é uma região relacionada a estiramentos - C-H em alcanos.

Figura 71 FTIR dos diversos sistemas de NPs encapsuladas com quitosana pelo método de emulsão água/óleo.

Fonte: Autoria própria

4.5.3 Encapsulação de magnetita via processo de gelificação iônica⁸²

O procedimento utiliza um processo de gelificação iônica, que é um processo não tóxico, sem utilização de solventes orgânicos, trata-se de um método conveniente e controlável. A gelificação iônica é baseada nas interações iônicas entre os grupamentos amina-primária carregados positivamente da quitosana e os grupamentos negativos do poliânion (TPP). Trata-

se de um processo de reticulação físico, que evita o uso de agentes químicos de reticulação e agentes de emulsão que geralmente são tóxicos ao corpo humano.⁸²

Para tal procedimento foram utilizadas somente NPs de magnetita com algum tratamento na superfície, ou seja, de caráter hidrofílico, já que a boa dispersão das NPs é um dos fatores essenciais para garantir a encapsulação destas.

Neste caso também houve uma variação diferente das já testadas nos demais encapsulações: a variação de temperatura da solução de quitosana e do meio reacional para a reação de reticulação. De acordo com os testes realizados na literatura⁸⁰, o tamanho da partícula tende a diminuir quando a temperatura da solução de quitosana aumenta, bem como a polidispersividade do sistema diminui consideravelmente. A viscosidade intrínseca da solução de quitosana diminui com o aumento da temperatura, pois a taxa de rotação das moléculas diminui e as ligações de hidrogênio da água de hidratação são reduzidas, diminuindo o volume específico da molécula de quitosana. Estes efeitos facilitam a aproximação de moléculas de quitosana e formam uma estrutura compacta durante a reticulação, consequentemente diminuindo o tamanho da partícula. Assim como também reportado na literatura⁸², a baixa temperatura ambiente resulta na melhora da monodispersividade das partículas. Depois da adição da solução fria de TPP na solução quente de quitosana, ambas as soluções possuem uma variação brusca de temperatura. Enquanto a temperatura da solução de quitosana diminui, o volume específico desta molécula aumenta e a flexibilidade da cadeia diminui. Com a temperatura ambiente baixa (no caso, utiliza-se banho de gelo para a reação de reticulação ocorrer), a taxa de resfriamento é alta e as interações de ligação de hidrogênio entre a quitosana e as moléculas de água de hidratação aumentam, então as NPs formadas possuem uma camada de hidratação assim que se formam, estabilizando-as.⁸²

Utilizando-se das NPs de caráter hidrofílico, para a adaptação do método reportado na literatura, adicionou-se as NPs à solução filtrada de quitosana para que posteriormente fosse adicionado o agente de reticulação à esta suspensão. Foram utilizadas todas as NPs de caráter hidrofílico obtidas no decorrer do projeto: recobertas com EACA, APTMS e DMSA, lavadas com metanol a quente, e funcionalizadas com AF. Tal gama de aplicações foi escolhida por tratar-se de um procedimento que preliminarmente apresentou melhores resultados de encapsulação.

Nos resultados observados nas Figura 72, nota-se que há indícios de formação de nanocápsulas com o sistema recoberto com EACA. Porém não há controle de forma e tamanho, visto o histograma que apresenta duas distribuições de tamanho.

Já no sistema com partículas lavadas com metanol a quente, observa-se formações do tipo casca-carço, em que a encapsulação com quitosana envolveu NPs individuais, apresentando um resultado próximo ao esperado. Sua distribuição bimodal de tamanho resultante do DLS pode ser atribuída à contagem destas NPs encapsuladas e outras diferentes unidades formadas por resquícios de quitosana e TPP do meio, conforme observado na Figura 72(e).

Assim, valores de diâmetro hidrodinâmico médio e PDI destas amostras não são valores a serem considerados pois os histogramas gerados são resultantes de variadas flutuações de intensidade, gerando correlogramas com flutuações que interferem nos valores finais de PDI e $Z_{average}$.

Figura 72 Resultados da encapsulação de NPs com quitosana via método de gelificação iônica. Amostra com magnetita recoberta com EACA (a) e (b) TEM (c) DLS. Magnetita lavada com metanol (d) e (e) TEM (c) DLS.

Fonte: Autoria própria

Foram utilizadas NPs recobertas com DMSA. Este sistema, conforme já estudado, apresenta boa estabilidade coloidal, além de ser quimicamente estável. Porém, sua molécula liga-se na superfície da magnetita de forma que disponibilize grupos carboxila livres, o que não permite funcionalização com moléculas de ácido fólico. O procedimento de encapsulação seria uma boa alternativa para fornecer alguma funcionalização a este sistema.

Os resultados para este experimento estão contidos na Figura 73, onde é possível observar a formação de um sistema homogêneo, com estruturas esféricas de diâmetro com aproximadamente 100 nm. Observando estas estruturas, foi possível notar que tratavam-se de NPs de magnetita em seu interior, incluídas em uma matriz reticulada de quitosana.

Figura 73 TEM do sistema de encapsulação de NPs de magnetita recobertas com DMSA.

Fonte: Autoria própria

Foi realizada a análise de EDS sobre uma nano cápsula para a investigação da sua composição, e esta foi confirmada. Na Figura 74, observa-se que existem picos atribuídos à presença de Fe, confirmando a presença de magnetita, além de picos atribuídos ao fósforo e ao carbono, confirmando assim a rede de reticulação da quitosana com o TPP. São observados picos com alta intensidade de Cu e Si, que correspondem ao material do *grid* que continha a amostra e do detector do equipamento, respectivamente. Picos atribuídos ao Cr são resultados de alguma impureza do sistema.

Figura 74 Análise de EDS das nanocápsulas formadas no procedimento utilizando NPs de magnetita recobertas com DMSA.

Fonte: Autoria própria

Além de estruturas contendo magnetita em seu interior, foram observadas NPs como a observada na Figura 75: esféricas, homogêneas, mas aparentemente sem estrutura de encapsulação. Pela literatura ¹¹⁰ trata-se de NPs formadas pela reticulação da quitosana com o TPP, porém sem a magnetita, evidenciando um resultado mais satisfatório quando comparado às NPs de quitosana formadas pelos métodos anteriores.

Figura 75 Nanopartículas de quitosana com TPP formadas a partir do método de gelificação iônica.

Fonte: Autoria própria

Por fim, foram realizados procedimentos de encapsulação das NPs funcionalizadas com ácido fólico. Ambas as amostras utilizadas foram funcionalizadas com o método de reação com carbodiimida e NHS (item 3.5.1.1). O intuito da encapsulação de NPs já funcionalizadas é o de garantir estabilidade química a este sistema.

Na Figura 77, constam os resultados das NPs recobertas com EACA e APTMS e funcionalizadas. Estas primeiras (Figura 76 (a), (b) e (c)) apresentam melhores resultados, em que se observa a formação de sistemas encapsulados, porém sem muito controle de tamanho e forma. Já no sistema com NPs recobertas com APTMS e funcionalizadas, formaram-se estruturas encapsuladas, porém com morfologia semelhantes à bastões, além de um grande número de NPs de quitosana e TPP (Figura 76 (e)). Os resultados podem ser comparados e observados nas micrografias de MEV, apresentadas na Figura 76 (g) e (h).

NPs funcionalizadas com ácido fólico possuem maior energia de superfície e a dificuldade na etapa de encapsulação já era aguardada. Apesar dos altos estados de agregação observadas na primeira etapa de funcionalização, os resultados destas encapsulações podem ser melhorados com adaptações de métodos, visto que em comparação aos demais procedimentos descritos neste trabalho, estes sistemas apresentaram bons resultados.

Figura 76 Sistemas de encapsulação com quitosana via procedimento de gelificação iônica. (a), (b) e (c) MET das NPs com EACA funcionalizadas com AF. (d), (e) e (f) MET das NPs com APTMS funcionalizadas com AF. (g) MEV das NPs com EACA funcionalizadas com AF. (f) MEV das NPs com APTMS funcionalizadas com AF.

Fonte: Autoria própria

4.6 Quantificação de ligantes na superfície das NPs de magnetita

4.6.1 Quantificação da concentração dos grupos amino livres na superfície das NPs

Para esta determinação, utilizou-se o método proposto por Moon *et al.*¹¹¹, que consiste na reação entre um aldeído e grupos amino na superfície das NPs, formando ligações iminas. Iminas são muito instáveis em meio aquoso, sofrendo hidrólise para formar aldeído e amina. A determinação por espectroscopia no UV-Vis do 4-nitrobenzaldeído após a hidrólise das iminas permite a determinação indireta da concentração de aminas na superfície das NPs. Na Figura 77 (a) e (b) é esquematizado o mecanismo da formação de imina na nanopartícula

com APTMS, porém o mecanismo com nanopartícula recoberta com EACA é semelhante, já que a reação ocorre no grupo amina livre de cada molécula.

Figura 77 (a) Mecanismo da formação de imina na nanopartícula com APTMS. (b) Mecanismo da hidrólise do respectivo sistema

Com a obtenção dos espectros de cada sistema de NPs recobertas, foi obtido o valor de absorbância no máximo comprimento de onda do 4-nitrobenzaldeído ($\lambda_{\text{máx}} = 267 \text{ nm}$) para o cálculo da concentração de grupos amino livres. Os resultados estão contidos na Tabela 6.

Tabela 6 Valores de absorbância máxima nos sistemas de NPs recobertas com EACA e APTMS e suas respectivas concentrações de grupo amina livre.

Amostra	Massa	A (em $\lambda = 267 \text{ nm}$)	Concentração de amina livre ($\mu\text{mol.mg}^{-1}$)
Magnetita recoberta com EACA	2,0 mg	0,02054	31,87
Magnetita recoberta com APTMS	2,0 mg	0,02943	75,72

Fonte: Autoria própria

Observando os resultados, a amostra recoberta com APTMS demonstrou possuir um valor superior na concentração de grupo amina livre. Tal resultado pode ser justificado pelo fato de que, conforme observado nos espectros de FTIR e nos valores de estabilidade coloidal, as NPs recobertas com EACA podem possuir não só grupos amino livre, mas também grupos ácidos carboxílicos em sua superfície. Observando o mecanismo da ligação imida, é imprescindível a presença de uma amina livre para que haja a quantificação.

Considerando os valores apresentados, pode-se concluir que o recobrimento com APTMS possui maior eficácia para uma posterior funcionalização, visto que a ligação com ácido fólico é realizada via ligação peptídica, pela interação de grupos amino livres do recobrimento com grupos ácido carboxílico do ácido fólico.

4.6.2 Quantificação da concentração dos grupos folato na superfície das NPs funcionalizadas

Conforme já discutido, a importância da funcionalização com o ácido fólico se dá por inúmeros fatores, mas principalmente pela interiorização das NPs magnéticas nas células cancerígenas devido a interação desta molécula com receptores folato.¹¹²

O desenvolvimento de um procedimento rápido e simples para obter uma estimativa da concentração de ácido fólico funcionalizado em NPs recobertas, hidrofílicas e

biocompatíveis é necessário para que sejam possíveis futuras adaptações de métodos visando a adaptação de metodologias para resultados de interiorização mais satisfatórios.

Foi feita a varredura de comprimentos de onda pela absorbância de todas as concentrações, conforme mostrado na Figura 78 e assim foi observado o comprimento de onda correspondente à maior absorção. Por isso, foi utilizado o $\lambda = 255$ nm para extrapolação para confecção da curva analítica.

Figura 78 Espectros de absorção do ácido fólico em diferentes concentrações para construção da curva analítica

Fonte: Autoria própria

Cabe aqui ressaltar que todas amostras que foram submetidas à esta quantificação passaram pelo processo de diálise até que fosse observado o sobrenadante incolor (aproximadamente 28 horas), demonstrando que a maior parte possível do ácido fólico não ligado às partículas havia sido retirado do meio.

Foram realizadas quantificações apenas das NPs recobertas com EACA e APTMS funcionalizadas via método da ligação direta via ligação amida devido aos bons resultados nesta última etapa. As NPs funcionalizadas via reação com carbodiimida não foram quantificadas devido à baixa concentração de amostra, que não atingiu o limite de detecção do UV-Vis. Já as NPs funcionalizadas via proteção com *t-boc*, apesar do bom resultado, não foram quantificadas pois ainda necessita-se do estudo da etapa de desproteção da molécula de ácido fólico.

Os resultados do espectro de absorção das amostras funcionalizadas estão contidos na Figura 79, e na Tabela 7, tem-se os resultados da quantificação.

Figura 79 Espectros de absorção das NPs recobertas com APTMS e EACA e posteriormente funcionalizadas com ácido fólico.

Fonte: Autoria própria

Tabela 7 Valores de absorbância e concentrações de ácido fólico nas NPs funcionalizadas.

Amostra	A (EM λ = 255 NM)	Concentração AF ($\mu\text{g. ml}^{-1}$)	Concentração AF ($\mu\text{mol. ml}^{-1}$)
Magnetita com EACA funcionalizada com AF	0,3749	6,56	0,1486
Magnetita com APTMS funcionalizada com AF	0,3249	5,65	0,1280

Fonte: Autoria própria

Ao contrário do observado na quantificação de grupos amino livre, na quantificação de ácido fólico nas amostras, observa-se que o sistema com recobrimento de EACA possuiu maior concentração desta molécula.

A quantificação da disponibilidade de grupamentos amina livre está diretamente relacionada a comparação da eficácia da posterior etapa de funcionalização, porém por tratar-

se de um sistema que pode conter grupamentos carboxílicos livres, a funcionalização pode ter ocorrido via ligação amida destes com grupamentos amina da molécula do ácido fólico. Outro motivo desta variação pode ser devido a adsorção de mais de uma molécula de ácido fólico em sítios ativos não específicos (cadeias laterais, por exemplo) de algumas moléculas. Além disso, os resultados tendem a uma conclusão de que talvez o ácido fólico atinja uma concentração limite na superfície das nanopartículas funcionalizadas, o que deve ser estudado em etapas posteriores a este trabalho.

Foi realizada a medida de DLS dos sistemas funcionalizados para comparação dos diâmetros hidrodinâmicos. Os resultados constam na Figura 80, em que é possível observar que os diâmetros obtidos pela funcionalização seguindo o segundo procedimento (via reação direta com carbodiimida) apresentam diâmetros inferiores, muito próximos aos da nanopartícula somente com recobrimento, evidenciando a baixa (ou inexistente) concentração de ácido fólico nestas superfícies. Também é possível confirmar os valores de quantificação tratando-se das amostras funcionalizadas pelo segundo procedimento, em que o resultado de maior concentração esteve no sistema com EACA, que também apresenta maior diâmetro hidrodinâmico.

Figura 80 Distribuição do diâmetro hidrodinâmico pelo número de NPs dos sistemas funcionalizados com ácido fólico.

Fonte: Zetasizer® software

Todos os resultados do trabalho encaminham as discussões à melhores condições e sistemas reacionais para serem aplicados para fins biológicos, demonstrando que boa parte dos objetivos iniciais foram cumpridos.

5 Conclusões e perspectivas

A síntese via método do poliol modificado mostrou-se um bom método devido à reprodutibilidade com controle de forma, tamanho e composição das nanopartículas obtidas. A alteração da natureza do meio reacional com a oxidação do benziléter resultou em nanopartículas de forma cúbica, tamanho aumentado e composição controlada. Devido ao bom resultado, o estudo do mecanismo de formação deste tipo de NP torna-se uma perspectiva para futuros trabalhos.

Sobre a lavagem da superfície de nanopartículas de magnetita observa-se que o método em que utiliza-se metanol a quente é relativamente simples, rápido e é eficaz na retirada do excesso de ligantes (ácido oleico e oleilamina) e garante à superfície um caráter hidrofílico, sendo este interessante para as aplicações biológicas citadas neste trabalho. A troca de ligantes com EACA, APTMS e DMSA tem resultados satisfatórios de nanopartículas estáveis e com bom controle de tamanho de diâmetro hidrodinâmico e PDI. Os recobrimentos com EACA e APTMS apresentam bons resultados, porém seus valores de potencial zeta em meios fisiológicos os comprometem com relação à aplicação em biomedicina. Foi observado que em meio de tampão SBF, o sistema de NPs recobertas com APTMS e concentração de partículas de 10 mg.mL^{-1} apresentou o melhor resultado em comparação aos demais sistemas.

O recobrimento com DMSA garantiu amostras estáveis em meio aquoso, com baixo teor de floculação quando em condições de estabilidade coloidal. Foi observado que o ponto isoeletrônico da amostra encontra-se ao redor de 5,9, e o seu pH ótimo é 9, embora seja observada uma boa estabilidade do sistema a partir do pH 7.

Apesar do resultado não muito satisfatório para os sistemas com EACA e APTMS, funcionalizações adicionais permitem que estes tenham aplicabilidade em biomedicina. Funcionalizações adicionais, com ligação de moléculas de AF ou encapsulação com quitosana, são etapas que delimitam a utilidade das NPs nas mais diversas aplicações biológicas. As NPs recobertas com DMSA, apesar de demonstrar ser um sistema com mais estabilidade e mais interessante para tais aplicações, não possuem grupos amino livres para a ligação amida que permite a ligação do ácido fólico à superfície. Porém, na etapa de encapsulação, foi a NP recoberta que apresentou melhor resultado.

As etapas de ligação via carbodiimida na presença de NHS e da encapsulação via gelificação iônica foram os procedimentos que apresentaram melhores resultados na funcionalização.

Como perspectiva para futuros trabalhos, encontra-se a possibilidade de adaptação do método de encapsulação, estudando-se a faixa de pH do meio, e com maiores variações de concentração dos reagentes neste método, para garantir a uniformidade das nanocápsulas formadas.

Além disso, visa-se como perspectiva a realização dos ensaios de estabilidade coloidal de todos os sistemas funcionalizados, bem como os testes de citotoxicidade e biocompatibilidade *in vitro* dos melhores sistemas obtidos.

6 Referências

1. WU, W.; WU, Z.; YU, T.; JIANG, C.; KIM, W. S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 16, n. 2, p. 023501, 2015.
2. WANG, X.; TILLEY, R. D.; WATKINS, J. J. Simple ligand exchange reactions enabling excellent dispersibility and stability of magnetic nanoparticles in polar organic, aromatic, and protic solvents. **Langmuir**, v. 30, n. 6, p. 1514-1521, 2014.
3. BERRY, C. C.; CURTIS, A. S. G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, n. 13, p. R198, 2003.
4. SINGH, R.; LILLARD, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 86, n. 3, p. 215-223, 2009.
5. FENG, S. S. Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy. **Expert Review of Medical Devices**, v. 1, n. 1, p. 115-125, 2004.
6. BHATTACHARYA, R.; PATRA, C. R.; EARL, A.; WANG, S.; KATARYA, A.; LU, L.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; YASZEMSKI, M. J.; GREIPP, P. R.; MUKHOPADHYAY, D.; MUKHERJEE, P. Attaching folic acid on gold nanoparticles using noncovalent interaction via different polyethylene glycol backbones and targeting of cancer cells. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 3, n. 3, p. 224-238, 2007.
7. EBRAHIMNEJAD, P.; DINARVAND R FAU - SAJADI, A.; SAJADI A FAU - JAAFARI, M. R.; JAAFARI MR FAU - NOMANI, A. R.; NOMANI AR FAU - AZIZI, E.; AZIZI E FAU - RAD-MALEKSHAHI, M.; RAD-MALEKSHAHI M FAU - ATYABI, F.; ATYABI, F. Preparation and in vitro evaluation of actively targetable nanoparticles for SN-38 delivery against HT-29 cell lines. **Nanomedicine**, v. 6 n.3, p. 478-485, 2010
8. RATA-AGUILAR, A.; SÁNCHEZ-MORENO, P.; JÓDAR-REYES, A. B.; MARTÍN-RODRÍGUEZ, A.; BOULAIZ, H.; MARCHAL-CORRALES, J. A.; PEULA-GARCÍA, J. M.; ORTEGA-VINUESA, J. L. Colloidal stability and “in vitro” antitumor targeting ability of lipid nanocapsules coated by folate–chitosan conjugates. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 27, n. 4, p. 388-404, 2012.
9. CULLITY, B. D.; GRAHAM, C. D. **Introduction to magnetic materials**. New York: Wiley-IEEE Press, 2008. 568 p.
10. CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, D. G. **Materials science and engineering : an introduction**. 2010. 992 p.

11. LU, A. H.; SALABAS, E. L.; SCHUTH, F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1222-1244, 2007.
12. FIGUEROLA, A.; DI CORATO, R.; MANNA, L.; PELLEGRINO, T. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 126-143, 2010.
13. CULLITY, B. D.; GRAHAM, C. D. **Introduction to magnetic materials**. Hoboken: John Wiley, 2009. 544 p.
14. ALI, A.; ZAFAR, H.; ZIA, M.; UL HAQ, I.; PHULL, A. R.; ALI, J. S.; HUSSAIN, A. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 9, p. 49-67, 2016.
15. CUENYA, B. R. Synthesis and catalytic properties of metal nanoparticles: Size, shape, support, composition, and oxidation state effects. **Thin Solid Films**, v. 518, n. 12, p. 3127-3150, 2010.
16. LIN, X.-M.; SAMIA, A. C. S. Synthesis, assembly and physical properties of magnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 305, n. 1, p. 100-109, 2006.
17. LAURENT, S.; FORGE, D.; PORT, M.; ROCH, A.; ROBIC, C.; VANDER ELST, L.; MULLER, R. N. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 6, p. 2064-2110, 2008.
18. WOO, K.; HONG, J.; CHOI, S.; LEE, H.-W.; AHN, J.-P.; KIM, C. S.; LEE, S. W. Easy synthesis and magnetic properties of iron oxide nanoparticles. **Chemistry of Materials**, v. 16, n. 14, p. 2814-2818, 2004.
19. WU, S.; SUN, A.; ZHAI, F.; WANG, J.; XU, W.; ZHANG, Q.; VOLINSKY, A. A. Fe₃O₄ magnetic nanoparticles synthesis from tailings by ultrasonic chemical co-precipitation. **Materials Letters**, v. 65, n. 12, p. 1882-1884, 2011.
20. FIEVET, F.; LAGIER, J. P.; BLIN, B.; BEAUDOIN, B.; FIGLARZ, M. Homogeneous and heterogeneous nucleations in the polyol process for the preparation of micron and submicron size metal particles. **Solid State Ionics**, v. 32, p. 198-205, 1989.
21. SUN, S. Recent advances in chemical synthesis, self-assembly, and applications of FePt nanoparticles. **Advanced Materials**, v. 18, n. 4, p. 393-403, 2006.
22. WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, n. 11, p. 397-415, 2008.

23. SALAZAR-ALVAREZ, G.; MUHAMMED, M.; ZAGORODNI, A. A. Novel flow injection synthesis of iron oxide nanoparticles with narrow size distribution. **Chemical Engineering Science**, v. 61, n. 14, p. 4625-4633, 2006.
24. LING, D.; HYEON, T. Chemical design of biocompatible iron oxide nanoparticles for medical applications. **Small**, v. 9, n. 9-10, p. 1450-1466, 2013.
25. UNSOY, G.; YALCIN, S.; KHODADUST, R.; GUNDUZ, G.; GUNDUZ, U. Synthesis optimization and characterization of chitosan-coated iron oxide nanoparticles produced for biomedical applications. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 11, p. 964, 2012.
26. TEJA, A. S.; KOH, P.-Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, v. 55, n. 1, p. 22-45, 2009.
27. THOREK, D. L. J.; CHEN, A. K.; CZUPRYNA, J.; TSOURKAS, A. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle probes for molecular imaging. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 34, n. 1, p. 23-38, 2006.
28. NARAYANAN, K. B.; SAKTHIVEL, N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 156, n. 1, p. 1-13, 2010.
29. DONG, H.; CHEN, Y. C.; FELDMANN, C. Polyol synthesis of nanoparticles: status and options regarding metals, oxides, chalcogenides, and non-metal elements. **Green Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 4107-4132, 2015.
30. SUN, S.; MURRAY, C. B.; WELLER, D.; FOLKS, L.; MOSER, A. Monodisperse FePt nanoparticles and ferromagnetic FePt nanocrystal superlattices. **Science**, v. 287, n. 5460, p. 1989, 2000.
31. BECK, W.; SOUZA, C. G. S.; SILVA, T. L.; JAFELICCI, M.; VARANDA, L. C. Formation mechanism via a heterocoagulation approach of FePt nanoparticles using the modified polyol process. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 21, p. 10475-10482, 2011.
32. VARANDA, L. C.; JAFELICCI, M.; TARTAJ, P.; O' GRADY, K.; GONZÁLEZ-CARREÑO, T.; MORALES, M. P.; MUÑOZ, T.; SERNA, C. J. Structural and magnetic transformation of monodispersed iron oxide particles in a reducing atmosphere. **Journal of Applied Physics**, v. 92, n. 4, p. 2079-2085, 2002.
33. SUN, S.; ZENG, H.; ROBINSON, D. B.; RAOUX, S.; RICE, P. M.; WANG, S. X.; LI, G. Monodisperse MFe₂O₄ (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 1, p. 273-279, 2004.
34. YU, W. W.; FALKNER, J. C.; YAVUZ, C. T.; COLVIN, V. L. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. **Chemical Communications**, v. n. 20, p. 2306-2307, 2004.

35. PEDRO, T.; MARÍA DEL PUERTO, M.; SABINO, V.-V.; TERESITA, G.-C.; CARLOS, J. S. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, n. 13, p. R182, 2003.
36. LAMER, V. K.; DINEGAR, R. H. Theory, production and mechanism of formation of monodispersed Hydrosols. **Journal of the American Chemical Society**, v. 72, n. 11, p. 4847-4854, 1950.
37. KUCHIBHATLA, S. V. N. T.; KARAKOTI, A. S.; SEAL, S. Colloidal stability by surface modification. **JOM: Journal of the Minerals, metals, and Materials Society**, v. 57, n. 12, p. 52-56, 2005.
38. MALVERN. **Zeta potential - An introduction in 30 minutes**. 2016. Disponível em: <<https://www.malvern.com/en/support/resource-center/technical-notes/TN101104ZetaPotentialIntroduction.html>>. Acesso em: 28 nov. 2015.
39. HAO, R.; XING, R.; XU, Z.; HOU, Y.; GAO, S.; SUN, S. Synthesis, functionalization, and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles. **Advanced Materials**, v. 22, n. 25, p. 2729-2742, 2010.
40. GHOSH CHAUDHURI, R.; PARIJA, S. Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 4, p. 2373-2433, 2012.
41. CASTELLÓ, J.; GALLARDO, M.; BUSQUETS, M. A.; ESTELRICH, J. Chitosan (or alginate)-coated iron oxide nanoparticles: A comparative study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 468, n. p. 151-158, 2015.
42. NEVES, H. R.; BINI, R. A.; BARBOSA, J. H. O.; SALMON, C. E. G.; VARANDA, L. C. Dextran-coated antiferromagnetic MnO nanoparticles for a T1-MRI contrast agent with high colloidal stability. **Particle & Particle Systems Characterization**, v. 33, n. 3, p. 167-176, 2016.
43. SALAS, G.; CASADO, C.; TERAN, F. J.; MIRANDA, R.; SERNA, C. J.; MORALES, M. P. Controlled synthesis of uniform magnetite nanocrystals with high-quality properties for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 39, p. 21065, 2012.
44. XU, C.; XU, K.; GU, H.; ZHENG, R.; LIU, H.; ZHANG, X.; GUO, Z.; XU, B. Dopamine as a robust anchor to immobilize functional molecules on the iron oxide shell of magnetic nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 32, p. 9938-9939, 2004.
45. DE PALMA, R.; PEETERS, S.; VAN BAEL, M. J.; VAN DEN RUL, H.; BONROY, K.; LAUREYN, W.; MULLENS, J.; BORGHS, G.; MAES, G. Silane ligand exchange to make hydrophobic superparamagnetic nanoparticles water-dispersible. **Chemistry of Materials**, v. 19, n. 7, p. 1821-1831, 2007.

46. SPERLING, R. A.; PARAK, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. **Philosophical Transactions - Royal society. Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 368, n. 1915, p. 1333-1383, 2010.
47. GHAZANFARI, M. R.; KASHEFI, M.; SHAMS, S. F.; JAAFARI, M. R. Perspective of Fe₃O₄ nanoparticles role in biomedical applications. **Biochemistry Research International**, v. 2016, p. 7840161, 2016.
48. RANA, S.; SHETAKE, N. G.; BARICK, K. C.; PANDEY, B. N.; SALUNKE, H. G.; HASSAN, P. A. Folic acid conjugated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin. **Dalton Transactions**, v. 45, p. 17401-17408, 2016.
49. CORR, S. A.; RAKOVICH, Y. P.; GUN'KO, Y. K. Multifunctional magnetic-fluorescent nanocomposites for biomedical applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, n. 3, p. 87-104, 2008.
50. SUN, C.; LEE, J. S. H.; ZHANG, M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 11, p. 1252-1265, 2008.
51. HYEON, T. Chemical synthesis of magnetic nanoparticles. **Chemical Communications**, n. 8, p. 927-934, 2003.
52. BENFER, M.; REUL, R.; BETZ, T.; KISSEL, T. Folic acid-decorated nanocomposites prepared by a simple solvent displacement method. **Macromolecular Bioscience**, v. 12, n. 4, p. 438-445, 2012.
53. STELLA, B.; ARPICCO, S.; PERACCHIA, M. T.; DESMAËLE, D.; HOEBEKE, J.; RENOIR, M.; D'ANGELO, J.; CATTEL, L.; COUVREUR, P. Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 11, p. 1452-1464, 2000.
54. ZWICKE, G. L.; MANSOORI, G. A.; JEFFERY, C. J. Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics. **Nano Reviews**, v. 3, n. p. 10.3402/nano.v3i403i3400.18496, 2012.
55. MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, n. 46, p. 10827-10852, 2005.
56. KOHLER, N.; SUN, C.; WANG, J.; ZHANG, M. Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. **Langmuir**, v. 21, n. 19, p. 8858-8864, 2005.
57. ANDRADE, F.; ANTUNES, F.; VANESSA NASCIMENTO, A.; BAPTISTA DA SILVA, S.; DAS NEVES, J.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B. Chitosan formulations as carriers for therapeutic proteins. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 8, n. 3, p. 157-172, 2011.

58. MATTU, C.; LI, R.; CIARDELLI, G. Chitosan nanoparticles as therapeutic protein nanocarriers: The effect of pH on particle formation and encapsulation efficiency. **Polymer Composites**, v. 34, n. 9, p. 1538-1545, 2013.
59. JARUDILOKKUL, S.; TONGTHAMMACHAT, A.; BOONAMNUAYVITTAYA, V. Preparation of chitosan nanoparticles for encapsulation and release of protein. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 5, p. 1247-1251, 2011.
60. TREE-UDOM, T.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. P.; SEEMORK, J.; ARAYACHUKEAT, S. Fragrant chitosan nanospheres: Controlled release systems with physical and chemical barriers. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 4, p. 1602-1609, 2011.
61. AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, n. 1, p. 5-28, 2004.
62. WANG, J. J.; ZENG, Z. W.; XIAO, R. Z.; XIE, T.; ZHOU, G. L.; ZHAN, X. R.; WANG, S. L. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 765-774, 2011.
63. VIVEK, R.; NIPUN BABU, V.; THANGAM, R.; SUBRAMANIAN, K. S.; KANNAN, S. pH-responsive drug delivery of chitosan nanoparticles as Tamoxifen carriers for effective anti-tumor activity in breast cancer cells. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**, v. 111, p. 117-123, 2013.
64. MAHMOUDI, M.; SANT, S.; WANG, B.; LAURENT, S.; SEN, T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 1, p. 24-46, 2011.
65. DURÁN, J. D. G.; ARIAS, J. L.; GALLARDO, V.; DELGADO, A. V. Magnetic colloids as drug vehicles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2948-2983, 2008.
66. CAO, S.-W.; ZHU, Y.-J.; MA, M.-Y.; LI, L.; ZHANG, L. Hierarchically nanostructured magnetic hollow spheres of Fe₃O₄ and γ-Fe₂O₃: preparation and potential application in drug delivery. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 6, p. 1851-1856, 2008.
67. WEI, W.; ZHAOHUI, W.; TAEKYUNG, Y.; CHANGZHONG, J.; WOO-SIK, K. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. **Science Technology of Advanced Materials**, v. 16, n. 2, p. 023501, 2015.
68. EIJI, K.; TATSUYA, O.; TAKERU, K.; SUGURU, S.; MAKOTO, M.; HIDETO, Y.; MIKIO, K.; CHIHARU, M.; SHINJI, H.; KEIICHI, Y.; NOBUHIRO, O. Ferromagnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia and thermoablation therapy. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 43, n. 47, p. 474011, 2010.

69. VARANDA, L. C.; JAFELICCI, M. Self-assembled FePt nanocrystals with large coercivity: reduction of the fcc-to-l10 ordering temperature. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 34, p. 11062-11066, 2006.
70. VARANDA, L. C.; JAFELICCI, M.; IMAIZUMI, M. Temperature dependence and magnetocrystalline anisotropy studies of self-assembled L10-Fe55Pt45 ferromagnetic nanocrystals. **Journal of Applied Physics**, v. 101, n. 12, p. 123918, 2007.
71. MIKHAYLOVA, M.; KIM, D. K.; BOBRYsheva, N.; OSMOLOWSKY, M.; SEMENOV, V.; TSAKALAKOS, T.; MUHAMMED, M. Superparamagnetism of magnetite nanoparticles: dependence on surface modification. **Langmuir**, v. 20, n. 6, p. 2472-2477, 2004.
72. OYANE, A.; KIM, H.-M.; FURUYA, T.; KOKUBO, T.; MIYAZAKI, T.; NAKAMURA, T. Preparation and assessment of revised simulated body fluids. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 65A, n. 2, p. 188-195, 2003.
73. RANA, S.; SHETAKE, N. G.; BARICK, K. C.; PANDEY, B. N.; SALUNKE, H. G.; HASSAN, P. A. Folic acid conjugated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin. **Dalton Transactions**, v. 45, n. 43, p. 17401-17408, 2016.
74. ANDHARIYA, N.; UPADHYAY, R.; MEHTA, R.; CHUDASAMA, B. Folic acid conjugated magnetic drug delivery system for controlled release of doxorubicin. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 1, p. 1416, 2013.
75. LEDERMANN, J. A.; CANEVARI, S.; THIGPEN, T. Targeting the folate receptor: diagnostic and therapeutic approaches to personalize cancer treatments. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 10, p. 2034-2043, 2015.
76. KOHLER, N.; FRYXELL, G. E.; ZHANG, M. A Bifunctional poly(ethylene glycol) silane immobilized on metallic oxide-based nanoparticles for conjugation with cell targeting agents. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 23, p. 7206-7211, 2004.
77. BINI, R. A. **Síntese e funcionalização de superfície de óxidos de ferro superparamagnéticos** 2011. 122 f. Tese(Doutorado) - Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
78. ZHANG, J.; RANA, S.; SRIVASTAVA, R. S.; MISRA, R. D. On the chemical synthesis and drug delivery response of folate receptor-activated, polyethylene glycol-functionalized magnetite nanoparticles. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 1, p. 40-48, 2008.
79. SANJAI, C.; KOTHAN, S.; GONIL, P.; SAESOO, S.; SAJOMSANG, W. Chitosan-triphosphate nanoparticles for encapsulation of super-paramagnetic iron oxide as an MRI contrast agent. **Carbohydrate Polymers**, v. 104, n. p. 231-237, 2014.
80. CALVO, P.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, n. 1, p. 125-132, 1997.

81. YOKSAN, R.; JIRAWUTTHIWONGCHAI, J.; ARPO, K. Encapsulation of ascorbyl palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation processes. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**, v. 76, n. 1, p. 292-297, 2010.
82. FAN, W.; YAN, W.; XU, Z.; NI, H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids Surfaces B Biointerfaces**, v. 90, p. 21-27, 2012.
83. SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. **Polímeros**, v. 8, p. 63-68, 1998.
84. MOON, J. H.; KIM, J. H.; KIM, K.-J.; KANG, T.-H.; KIM, B.; KIM, C.-H.; HAHN, J. H.; PARK, J. W. Absolute surface density of the amine group of the aminosilylated thin layers: ultraviolet–visible spectroscopy, second harmonic generation, and synchrotron-radiation photoelectron spectroscopy study. **Langmuir**, v. 13, n. 16, p. 4305-4310, 1997.
85. MATIAS, R.; RIBEIRO, P. R. S.; SARRAGUCA, M. C.; LOPES, J. A. A UV spectrophotometric method for the determination of folic acid in pharmaceutical tablets and dissolution tests. **Analytical Methods**, v. 6, n. 9, p. 3065-3071, 2014.
86. VARANDA, L. C.; IMAIZUMI, M.; SANTOS, F. J.; JAFELICCI, M. Iron oxide versus Fe₅₅Pt₄₅/Fe₃O₄: improved magnetic properties of core/shell nanoparticles for biomedical applications. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 44, n. 11, p. 4448-4451, 2008.
87. XU, C.; YUAN, Z.; KOHLER, N.; KIM, J.; CHUNG, M. A.; SUN, S. FePt nanoparticles as an Fe reservoir for controlled fe release and tumor inhibition. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 42, p. 15346-15351, 2009.
88. ZHANG, L.; HE, R.; GU, H.-C. Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 253, n. 5, p. 2611-2617, 2006.
89. PAVIA, D. L.; LAMPAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. A. **Introdução à espectroscopia**. 5 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015. 708 p.
90. SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; SNYDER, S. A. **Organic Chemistry**. 12. ed. Hoboken: John Wiley, 2016. 1293 p.
91. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Spectrometric identification of organic compounds**. New York: John Wiley, 2004. 501 p.
92. NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Aminocaproic Acid (Code C47391)**. 2012. Disponível em: <<https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI%20Thesaurus&code=C47391>>. Acesso em: 10 abr. 2017.
93. DRUGBANK. **Aminocaproic Acid**. 2015. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00513>>. Acesso em: 16 abr. 2017.

94. ALEXIOU, C.; ARNOLD, W.; KLEIN, R. J.; PARAK, F. G.; HULIN, P.; BERGEMANN, C.; ERHARDT, W.; WAGENPFEIL, S.; LÜBBE, A. S. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. **Cancer Research**, v. 60, n. 23, p. 6641, 2000.
95. BARRERA, C.; HERRERA, A.; ZAYAS, Y.; RINALDI, C. Surface modification of magnetite nanoparticles for biomedical applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, n. 10, p. 1397-1399, 2009.
96. CREIXELL, M.; HERRERA, A. P.; LATORRE-ESTEVEZ, M.; AYALA, V.; TORRES-LUGO, M.; RINALDI, C. The effect of grafting method on the colloidal stability and in vitro cytotoxicity of carboxymethyl dextran coated magnetic nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 39, p. 8539-8547, 2010.
97. WATTS, B.; THOMSEN, L.; FABIEN, J. R.; DASTOOR, P. C. Understanding the conformational dynamics of organosilanes: γ -APS on zinc oxide surfaces. **Langmuir**, v. 18, n. 1, p. 148-154, 2002.
98. ALAN L. MILLER, N. D. Dimercaptosuccinic acid (DMSA), a non-toxic, water-soluble treatment for heavy metal toxicity. **Alternative Medicine Review**, v. 3, n. 3, p. 9, 1998.
99. WU, L.; ZHANG, J.; WATANABE, W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 456-469, 2011.
100. MALVERN. **Como interpretar os dados do ZetaSizer Nano: Análise de tamanho**. 2014. Disponível em: <
https://www.brainshark.com/malvern/vu?pi=zlfzjFgVxz5uTlz0&b=1&tx=156750&c1=32&no_desktopflash=1>. Acesso em: 20 out. 2014.
101. MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, n. 46, p. 25, 2005.
102. CHEN, J.; KLEM, S.; JONES, A. K.; ORR, B.; BANASZAK HOLL, M. M. Folate-binding protein self-aggregation drives agglomeration of folic acid targeted iron oxide nanoparticles. **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 81-87, 2017.
103. HIJAZ, M.; DAS, S.; MERT, I.; GUPTA, A.; AL-WAHAB, Z.; TEBBE, C.; DAR, S.; CHHINA, J.; GIRI, S.; MUNKARAH, A.; SEAL, S.; RATTAN, R. Folic acid tagged nanoceria as a novel therapeutic agent in ovarian cancer. **BMC Cancer**, v. 16, p. 220, 2016.
104. ZHANG, H.; LI, J.; HU, Y.; SHEN, M.; SHI, X.; ZHANG, G. Folic acid-targeted iron oxide nanoparticles as contrast agents for magnetic resonance imaging of human ovarian cancer. **Journal of Ovarian Research**, v. 9, p. 19, 2016.
105. HARRIS, R.; LECUMBERRI, E.; MATEOS-APARICIO, I.; MENGÍBAR, M.; HERAS, A. Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 2, p. 803-806, 2011.

106. MASARUDIN, M. J.; CUTTS, S. M.; EVISON, B. J.; PHILLIPS, D. R.; PIGRAM, P. J. Factors determining the stability, size distribution, and cellular accumulation of small, monodisperse chitosan nanoparticles as candidate vectors for anticancer drug delivery: application to the passive encapsulation of [(14)C]-doxorubicin. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 8, p. 67-80, 2015.
107. KHALKHALI, M.; ROSTAMIZADEH, K.; SADIGHIAN, S.; KHOEINI, F.; NAGHIBI, M.; HAMIDI, M. The impact of polymer coatings on magnetite nanoparticles performance as MRI contrast agents: a comparative study. **Journal of Farmaceutical Sciences**, v. 23, p. 45, 2015.
108. SOARES, P. I. P.; MACHADO, D.; LAIA, C.; PEREIRA, L. C. J.; COUTINHO, J. T.; FERREIRA, I. M. M.; NOVO, C. M. M.; BORGES, J. P. Thermal and magnetic properties of chitosan-iron oxide nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 149, p. 382-390, 2016.
109. GONSALVES, A. D. A.; ARAÚJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C. D. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, p. 1215-1223, 2011.
110. MOHAMMADPOUR DOUNIGHI, N.; ESKANDARI, R.; AVADI, M. R.; ZOLFAGHARIAN, H.; MIR MOHAMMAD SADEGHI, A.; REZAYAT, M. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanoparticles containing Mesobuthus eupeus scorpion venom as an antigen delivery system. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 18, p. 44-52, 2012.
111. MOON, J. H.; KIM, J. H.; KIM, K.; KANG, T. H.; KIM, B.; KIM, C. H.; HAHN, J. H.; PARK, J. W. Absolute surface density of the amine group of the aminosilylated thin layers: ultraviolet-visible spectroscopy, second harmonic generation, and synchrotron-radiation photoelectron spectroscopy study. **Langmuir**, v. 13, n. 16, p. 4305-4310, 1997.
112. KHOSRAVIAN, P.; SHAFIEE ARDESTANI, M.; KHOOBI, M.; OSTAD, S. N.; DORKOOSH, F. A.; AKBARI JAVAR, H.; AMANLOU, M. Mesoporous silica nanoparticles functionalized with folic acid/methionine for active targeted delivery of docetaxel. **Oncotargets and Therapy**, v. 9, p. 7315-7330, 2016.