

HERBERT RODRIGO NEVES

**NANOPARTÍCULAS ANTIFERROMAGNÉTICAS DE MnO PARA APLICAÇÕES EM
BIOMEDICINA COMO AGENTES DE CONTRASTE**

Exemplar revisado.

**O exemplar original encontra-se disponível no
Serviço de Pós-Graduação do IQSC-USP.**

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

Área de concentração: Físico-química

Orientador: Prof. Dr. Laudemir Carlos Varanda

São Carlos

– 2012 –

*Por todo amor e apoio
incondicional que me
ofereceram, à minha mãe,
Nilva, e ao meu pai,
Hernandes, dedico este que
é o fruto de meu trabalho.*

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Laudemir Carlos Varanda pela amizade, oportunidade de trabalho, paciência e por todo o conhecimento proporcionado.
- Aos companheiros do Grupo de Materiais Coloidais pela amizade, companheirismo e convivência diária.
- Aos meus pais e irmãos pelo incentivo, afeto, paciência e compreensão.
- À todos os amigos que fiz em São Carlos desde 2006 pelo momentos de diversão, de estudo e por todas as histórias compartilhadas.
- À todos os professores que já tive, mesmo aqueles que nem sequer lembro o nome, por tudo o que me ensinaram.
- Aos amigos que tenho desde antes de ingressar à universidade, porque mesmo distantes sempre permaneceram ao meu lado.
- À Ana Laura por ter me proporcionado tantos momentos alegres e pela história que viveu ao meu lado.
- À todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.
- Ao Instituto de Química de São Carlos – USP, por toda a infra-estrutura disponibilizada, aos docentes do IQSC e IFSC e funcionários do IQSC, pelo trabalho de excelente qualidade prestado, os quais muito contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.
- Ao Grupo de Eletroquímica do IQSC, ao Laboratório de Caracterização Estrutural da UFSCar, ao Prof. Dr. Hercílio Rochenberg e ao Prof. Dr. Daniel Reinaldo Cornejo, ambos do IF-USP, que muito gentilmente disponibilizaram equipamentos de caracterização extremamente necessários para a obtenção dos resultados apresentados e discutidos neste trabalho. E ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto e a Dra. Iêda Paino pela parceria firmada, que possibilitou a conclusão deste trabalho.
- Ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro e ao CNPq pela bolsa concedida.

RESUMO

Nanomateriais têm sido amplamente estudados, como resultado de suas propriedades físicas e químicas diferenciadas, que oferecem um grande número de possibilidades para aplicações em biomedicina, principalmente na terapia de câncer e no desenvolvimento de estratégias de diagnóstico não invasivo. O óxido de ferro superparamagnético (SPION) é o principal material estudado como agente de contraste para imagem por ressonância magnética, devido à sua capacidade de reduzir o tempo de relaxação transversal (T_2) em diferentes tecidos e sua menor toxicidade que os complexos de Gd^{3+} e Mn^{2+} usados atualmente. Entretanto, o acúmulo de SPIONs pode ser facilmente confundido com sinais referentes à calcificação, depósito de metais pesados e sangramentos, e a alta susceptibilidade magnética do material promove distorções na imagem. Assim, alguns aspectos são desejáveis em material para que este tenha potencial para substituir o SPION, tais como forma nanoparticulada, para fácil modificação de superfície e possibilidade de funcionalização com agentes biosseletivos, e contraste positivo em T_1 . As nanopartículas (NPs) antiferromagnéticas de MnO atendem a todos os requisitos necessários para substituir o óxido de ferro. As NPs de MnO foram sintetizadas a partir da decomposição térmica do acetilacetonato de manganês(II) em uma variação do método poliol modificado, resultando na formação de NPs com tamanho médio de $21 \pm 3,9$ nm. Foi realizada a substituição de ligantes de superfície para que se substituísse o ácido oleico adsorvido sobre o material por 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS) e foi determinada a concentração de grupamentos amino sobre a superfície das NPs. Posteriormente, obteve-se uma estrutura do tipo "core/shell" dispersível em meio aquoso e biocompatível pela reação dos grupos amino livres com o carboxilato da carboximetil dextrana (CMDex). O potencial de superfície e a estabilidade coloidal das NPs funcionalizadas foram caracterizados por mobilidade eletroforética e por espalhamento de luz dinâmico em água deionizada e em condições que mimetizavam o sangue. As NPs apresentaram toxicidade em células cancerosas de carcinoma cervical humano (HeLa). Entretanto, não foi observada toxicidade significativa na linhagem de células não cancerosas NCTC clone L929. Tanto as NPs como sintetizadas quanto as recobertas com CMDex apresentaram controle de tamanho e forma, apresentando distribuição de tamanho compatível com o esperado para as aplicações em biomedicina.

ABSTRACT

Nanomaterials have been widely studied as a result of their interesting physical and chemical properties, which offer a large number of possibilities for applications in biomedicine mainly in cancer therapy and the development of strategies for non-invasive diagnosis. The superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) is the main studied material as contrast agent for magnetic resonance imaging (MRI) due to its ability to reduce the transverse relaxation time (T_2) in different tissues and lower toxicity than Gd^{3+} and Mn^{2+} complexes currently used. However, this SPIONs accumulation can be confused with signals from calcification, bleeding or metal deposits, and the high magnetic susceptibility distorts the background image because its ferromagnetic behavior. Some aspects are desirable to replace SPIONs, such as nanoparticulate form for simple surface modification and labeling with targeting agents, and positive longitudinal T_1 relaxation time contrast ability. The antiferromagnetic MnO NPs attend all these requirements and overcome the drawback of using SPION. In our study, MnO NPs were synthesized by the thermal decomposition of Mn(II) acetylacetonate by a variation of the modified polyol process resulting in spherical nanoparticles with average size of $21 \pm 3,9$ nm. The ligand-exchange step was used to replace the oleic acid adsorbed on the as-synthesized NPs surface by 3-aminopropyltriethoxysilane (APTMS) and the total free amine groups on the NPs surface was determined. After that, a biocompatible and water-dispersible core/shell structure was obtained by coating with carboxymethyl dextran (CMDex) using the free amine-terminal group from APTMS and the carboxylate groups present in the CMDex molecules conjugation. Surface potential and colloidal stability of these functionalized NPs were evaluated by electrophoretic mobility and dynamic light scattering techniques in both water and artificial blood by using the Simulated Body Fluid (SBF) medium. While the water-dispersible NPs have shown toxicity in the human cell line derived from cervical cancer (HeLa), they have not shown significantly cytotoxicity in the healthy fibroblast cells (cell line L929). Both the as-synthesized and coated NPs present controlled size and shape and the final NPs size distribution and magnetic properties are compatible with the expected for biomedical applications.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Precessão do momento magnético nuclear em torno do campo aplicado. ²⁴	14
Figura 2 - Magnetização dos núcleos antes (à esquerda) e depois (à direita) a aplicação de um pulso de radiofrequência. Adaptado. ¹²	14
Figura 3 - Aumento da magnetização na direção do campo após a aplicação do pulso de radiofrequência (à esquerda) e diminuição da magnetização no plano perpendicular ao campo (à direita). Adaptado. ¹²	15
Figura 4 - Diagrama esquemático das regiões de estabilidade e instabilidade de um sistema coloidal considerando os efeitos do movimento Browniano e da gravidade em função da aglomeração das partículas. Adaptado. ⁵⁸	22
Figura 5 - Mecanismos de estabilização da superfície de nanopartículas: (a) eletrostática e (b) por efeito estérico.	23
Figura 6 - Representação esquemática do aparato experimental utilizado para a síntese das nanopartículas. Adaptado. ⁶⁵	27
Figura 7 - Fluxograma da síntese de nanopartículas de MnO a partir do Mn(acac) ₂	28
Figura 8 - Fluxograma da síntese utilizando-se do precursor oleato de manganês(II)	29
Figura 9 - Fluxograma da etapa de recobrimento das nanopartículas com CMDex.....	32
Figura 10 - Difratoograma de raios X da amostra de MnO sintetizada a partir do precursor Mn(acac) ₂ e o padrão para este material.....	37
Figura 11 - a) Histograma e ajuste gaussiano (vermelho) da distribuição de tamanho das partículas com menor diâmetro. b), c) e d) Micrografia da amostra evidenciando, respectivamente, a distribuição com maior tamanho médio, a com menor tamanho médio e a mistura das duas distribuições.	38
Figura 12 - a) Difratoograma de raios X da amostra sintetizada modificando-se o tempo de reação e a temperatura de refluxo. b) Histograma e ajuste gaussiano (vermelho) da distribuição de tamanho das partículas. c) e d) Micrografias da amostra mostrando a presença de apenas uma distribuição de tamanho.	41
Figura 13 - a) Difratoograma da amostra sintetizada a partir do precursor oleato de manganês (II). b), c) e d) Micrografias da amostra evidenciando as características morfológicas obtidas.....	42
Figura 14 - Espectro de FTIR das amostra de MnO como sintetizadas (em vermelho) e após a etapa de modificação de superfície (em azul).	44
Figura 15 - Micrografia da amostra de nanopartículas de MnO após a modificação de superfície com APTMS	45

Figura 16 - Espectros de FTIR das amostras de nanopartículas de MnO modificadas com APTMS com diferentes tempos de reação.	47
Figura 17 - Representação esquemática do mecanismo de reação entre o 4-nitrobenzaldeído e as aminas livres sobre a superfície das nanopartículas dando origem a uma imina. Adaptado.80.....	48
Figura 18 - Representação esquemática do mecanismo de reação de hidrólise da imina sobre a superfície das nanopartículas liberando o 4-nitrobenzaldeído. Adapatado.80.....	49
Figura 19 - Espectro de absorção molecular de uma solução padrão 5.10^{-5} mol.L ⁻¹ de 4-nitrobenzaldeído em uma mistura etanol/água (1:3 (v/v)) na presença de hidróxido de sódio.....	50
Figura 20 - Curva de calibração obtida para concentrações de 4-nitrobenzaldeído variando entre 5.10^{-6} mol.L ⁻¹ e 5.10^{-5} mol.L ⁻¹ (Absorbância = $7749 \cdot [4\text{-nitrobenzaldeído}]$, $R^2 = 0,99959$).....	51
Figura 21 - Representação esquemática do mecanismo de reação entre os grupos amina livre sobre a superfície das nanopartículas e o grupo carboxilato da CMDex. Adaptado.80.....	53
Figura 22 - Espectro FTIR da CMDex pura (em verde) e das amostras modificadas com APTMS (em azul) e recobertas com CMDex (em vermelho).	54
Figura 23 - a) Análise termogravimétrica (em preto) e análise termogravimétrica diferencial (em azul) das nanopartículas de MnO modificadas com APTMS. b) Análise termogravimétrica e anaálise termogravimétrica diferencial das nanopartículas de MnO funcionalizadas com CMDex.....	55
Figura 24 - Fotografia da amostra das nanopartículas assim que sintetizadas dispersas em hexano (frasco A) e da amostra das nanopartículas após a etapa de funcionalização com CMDex dispersas em água deionizada (frasco B).	57
Figura 25 - Potencial ζ e mobilidade eletroforética em função do pH das dispersões de nanopartículas modificadas com APTMS (em azul) e recobertas com CMDex (em vermelho).	58
Figura 26 - Função de correlação obtida para cada análise em função do tempo de cada medida para a dispersão das nanopartículas a) em água e b) em solução SBF.	60
Figura 27 - Diâmetro hidrodinâmico médio obtido para as dispersões $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em água deionizada e em solução SBF.....	61
Figura 28 - Distribuições de tamanho de partículas obtidas por espalhamento de luz dinâmico da amostra recoberta com CMDex em a) água deionizada e b) em solução SBF, ambas dispersões com concentração $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$	62
Figura 29 - Microscopia da amostra de nanopartículas de MnO após o recobrimento com CMDex...	64
Figura 30 - Curva de magnetização das amostras de nanopartículas assim que sintetizadas (em preto) e após a etapa de funcionalização (em vermelho).	65
Figura 31 - Viabilidade celular da linhagem NCTC clone L929 (fibroblastos de tecido conectivo) incubadas com diferentes concentrações de nanopartículas de MnO@CMDex.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Volumes utilizados de APTMS e de ácido acético nas reações de substituição de ligante e o tempo de reação para cada amostra.	30
Tabela 2 - Concentração de amina livre sobre a superfície das nanopartículas em função do tempo de reação.....	52
Tabela 3 - Diâmetro hidrodinâmico médio (Dh) e polidispersividade para cada distribuição de tamanho obtidas por espalhamento de luz em função da concentração da dispersão.	63

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Imagem por ressonância magnética.....	11
1.1.1 Agentes de contraste	16
1.2 Nanomateriais em Biomedicina.....	18
1.3 Síntese de nanopartículas.....	20
1.4 Estabilidade coloidal de nanopartículas	22
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos/Metas.....	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Síntese do precursor oleato de manganês (II).....	26
3.2 Síntese de nanopartículas de MnO.....	26
3.3 Modificação de superfície.....	29
3.3.1 Determinação da concentração de grupo amina livre sobre a superfície das nanopartículas modificadas com APTMS.....	30
3.4 Funcionalização com carboximetil-dextrana.....	31
3.4.1 Testes de citotoxicidade.....	32
3.5 Caracterização das amostras	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Síntese das nanopartículas de MnO	36
4.2 Modificação de superfície.....	43
4.3 Funcionalização das nanopartículas	52
4.3.1 Testes de citotoxicidade.....	65
5 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

A obtenção de materiais em escala nanométrica tem se intensificado nas últimas décadas, tanto pelo caráter fundamental quanto pelas suas diversas possibilidades de aplicações. O interesse em nanoestruturas advém das propriedades físicas e químicas diferenciadas que estas apresentam, as quais são intermediárias as dos átomos ou moléculas isoladas e dos sólidos estendidos.¹⁻³ Assim, estes materiais podem ser aplicados tanto para o desenvolvimento de novas tecnologias,⁴⁻⁶ quanto em biomedicina no diagnóstico⁷⁻¹⁸ e tratamento de doenças.^{6,15-20}

As propriedades dos materiais nanoparticulados dependem fundamentalmente da composição, do tamanho e da forma das partículas, sendo essencial para a aplicação do material que a rota sintética escolhida leve a formação de partículas com estreita distribuição de tamanho e elevado controle de forma, além de rígido controle sobre a composição química. Uma larga distribuição de tamanho é indesejável devido à grande dependência das propriedades físicas com o tamanho das partículas e a ausência de controle morfológico pode levar a perda ou diminuição nas propriedades de interesse, o que inviabilizaria a aplicação do material. Para as aplicações em biomedicina, nanopartículas magnéticas têm sido amplamente estudadas, possibilitando o tratamento de doenças por magnetohipertermia^{19,21,22} e a entrega controlada de fármacos (*drug delivery*),¹⁵⁻¹⁸ além do aprimoramento de técnicas de diagnóstico tais como a imagem por ressonância magnética (*Magnetic Resonance Imaging – MRI*).⁷⁻¹⁷

A aplicação de nanopartículas magnéticas como agentes de contraste em MRI tem se mostrado muito promissora, sendo os principais candidatos para tal finalidade as nanopartículas de óxido de ferro superparamagnético, contraste por T_2 , e antiferromagnéticas de MnO, contraste por T_1 . Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnético apresentam características interessantes para diversas aplicações biomédicas, tendo como destaque a possível atuação simultânea na entrega controlada de fármacos e no diagnóstico por MRI.¹⁴⁻¹⁶ Na análise por MRI utilizando-se um agente de contraste T_2 o que se observa é resultado da diminuição da magnetização no plano perpendicular ao campo magnético aplicado, de tal modo, que os tecidos que relaxarem mais rapidamente apresentarão um contraste escuro na imagem obtida.⁷⁻⁹ Entretanto, o

sinal em T_2 pode ser facilmente confundido com sangramentos, calcificação ou deposição de metais pesados, além disso, a alta suscetibilidade magnética deste material pode provocar distorções na imagem.¹² Diferentemente, as nanopartículas de MnO são potenciais agentes de contraste T_1 , decorrente do elevado momento magnético apresentado pelo Mn^{2+} no material e do caráter antiferromagnético do MnO. O que se observa na imagem obtida por T_1 é o aumento da magnetização no eixo do campo magnético aplicado, dessa forma, os tecidos que tiverem menor tempo de relaxação apresentarão um contraste brilhante.

1.1 IMAGEM POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA

A técnica de MRI consiste na obtenção de uma imagem anatômica e funcional de tecidos pela diferença nos tempos de relaxação dos núcleos atômico submetidos a um campo magnético externo. É um método não invasivo de análise clínica e sua robustez está diretamente relacionada ao contraste entre os tecidos. Devido à sua grande abundância nos organismos vivos, o tempo de relaxação mais comumente utilizado para a obtenção de imagem é o dos átomos de hidrogênio, presentes na água, ácidos graxos, carboidratos ou proteínas.

O fenômeno da ressonância magnética nuclear apenas é observado nos átomos que apresentam momento angular de spin nuclear não nulo. O momento angular de spin é uma propriedade intrínseca de partículas elementares ou que possuem dimensões próximas as elementares.²³ O spin pode ser interpretado classicamente como o movimento de rotação de uma partícula ao redor de seu próprio eixo. Como os prótons são partículas carregadas, esse movimento de rotação dá origem ao momento magnético de spin. Os nêutrons, apesar de não possuírem carga formal, apresentam uma distribuição não uniforme de carga pela partícula, o que também origina um momento magnético nos nêutrons.²⁴ Assim, o momento magnético de spin de um núcleo é resultado da somatória vetorial dos momentos magnéticos dos prótons e nêutrons.

O momento magnético das partículas nucleares não pode assumir quaisquer valores, mas apenas valores discretos devido à quantização do momento angular de spin. O valor do momento angular pode ser expresso em termos do número quântico de momento angular

de spin, I . Assim como nos elétrons, um próton ou um nêutron possui $I = \frac{1}{2}$. Dessa forma, um núcleo com número atômico par e massa atômica par, possui $I = 0$; um núcleo com número atômico ímpar e massa atômica par admite apenas valores inteiros de I e diferente de zero (por exemplo, 2_1H , $I = 1$); e núcleos com número atômico ímpar e massa atômica ímpar possuem valores semi-inteiros de I (por exemplo, 1H possui $I = \frac{1}{2}$).²⁴

A partir de I e do momento angular do núcleo para uma dada direção, a_z , pode-se obter o momento magnético do núcleo pelas equações:

$$a_z = m_I \hbar \quad (I)$$

com

$$m_I = -I, -I + 1, \dots, I - 1, +I \quad (II)$$

onde m_I é o número quântico direcional e, para $I = \frac{1}{2}$, pode ser $-\frac{1}{2}$ e $+\frac{1}{2}$. Sendo γ a relação magnetogírica, o momento magnético se define como:

$$\mu_z = \gamma a_z \quad (III)$$

Na presença de um campo magnético B_0 , os núcleos que possuem $I \neq 0$ admitem apenas algumas orientações do momento magnético em relação ao campo, sendo que cada orientação possui uma energia discreta. Uma vez que a energia de cada orientação permitida, de acordo com a mecânica quântica, depende do número quântico direcional e da intensidade do campo magnético aplicado, considerando \hbar a constante de Plank dividido por 2π ($h = 6,626068 \cdot 10^{-34} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-1}$), a mesma pode ser calculada da seguinte forma:^{24,25}

$$E = -\gamma B_0 \quad (IV)$$

$$E = -\gamma m_I \hbar B_0 \quad (V)$$

Considerando o átomo de hidrogênio, tem-se que:

$$m_I = \pm \frac{1}{2} \quad (VI)$$

$$E_\alpha = -\frac{1}{2} \gamma \hbar B_0 \quad (VII)$$

$$E_\beta = +\frac{1}{2} \gamma \hbar B_0 \quad (VIII)$$

Portanto a variação de energia entre os dois estados é:

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \quad (IX)$$

A equação (IX) mostra a dependência da diferença de energia entre os dois estados em função do campo magnético aplicado. Quanto mais intenso for o campo maior será a diferença entre os dois estados. A intensidade dos campos aplicados em condições experimentais é suficiente apenas para promover uma pequena diferença de energia entre os dois estados, de tal modo que existe uma população desigual nos dois níveis de energia, que pode ser descrita pela equação da distribuição de Boltzmann.²⁵

$$\frac{N_{\beta}}{N_{\alpha}} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{kT}\right) \quad (\text{X})$$

onde N_{α} é a população do estado de menor energia ($I = \frac{1}{2}$), N_{β} a população do estado de maior energia, k é a constante de Boltzmann ($k = 1,3806503 \cdot 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$) e T a temperatura.

A distribuição de núcleos nos dois níveis de energia pode ser alterada transferindo energia para o sistema, o que pode ser feito utilizando-se radiação eletromagnética. Admitindo-se a condição de Bohr para uma transição entre dois níveis sucessivos de energia²⁴ e considerando ν a frequência da radiação eletromagnética, têm-se:

$$\Delta E = h\nu \quad (\text{XI})$$

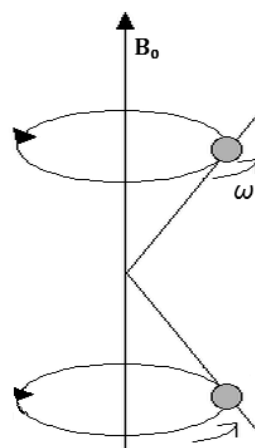
Combinando as equações (IX) e (XI) pode-se determinar a frequência da radiação eletromagnética a ser utilizada para promover uma mudança na distribuição das populações.

$$\nu = \frac{\Delta E}{h} = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (\text{XII})$$

$$\omega = \nu 2\pi = \gamma B_0 \quad (\text{XIII})$$

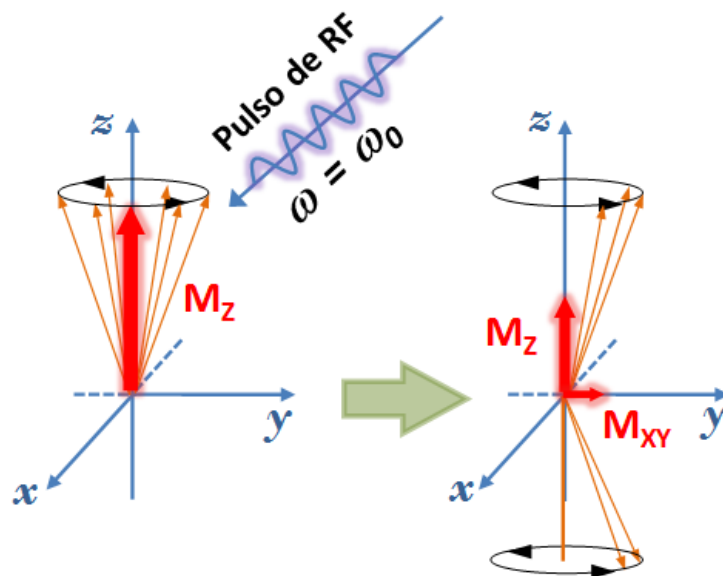
onde ω é a frequência do movimento de precessão do núcleo ao redor do eixo do campo aplicado, denominada frequência de Larmor, Figura 1.²³ Como a diferença de energia entre os dois estados é pequena, a radiação eletromagnética utilizada para promover a transição está na região das radiofrequências.

Analisando a magnetização dos núcleos que surge em decorrência do campo magnético externo, esta apenas é observada na direção do campo aplicado, M_z . Isto ocorre porque as componentes dos momentos magnéticos no plano xy se cancelam mutuamente, $M_{xy} = 0$, devido ao movimento de precessão não apresentar coerência de fase.

Figura 1- Precessão do momento magnético nuclear em torno do campo aplicado.²⁴

Ao perturbar o sistema utilizando um pulso de radiofrequência, Figura 2, ocorre uma alteração nas populações dos dois níveis de energia, sendo observada a mudança na magnetização do sistema. Considerando que a radiação tenha intensidade suficiente para igualar as populações nos dois níveis energéticos, é observada a presença de magnetização apenas no plano perpendicular ao campo, M_{xy} . Isto ocorre porque os momentos magnéticos passam a ter uma coerência de fase durante o movimento de precessão, observando-se uma diminuição da entropia do sistema.

Figura 2 - Magnetização dos núcleos antes (à esquerda) e depois (à direita) a aplicação de um pulso de radiofrequência. Adaptado.12



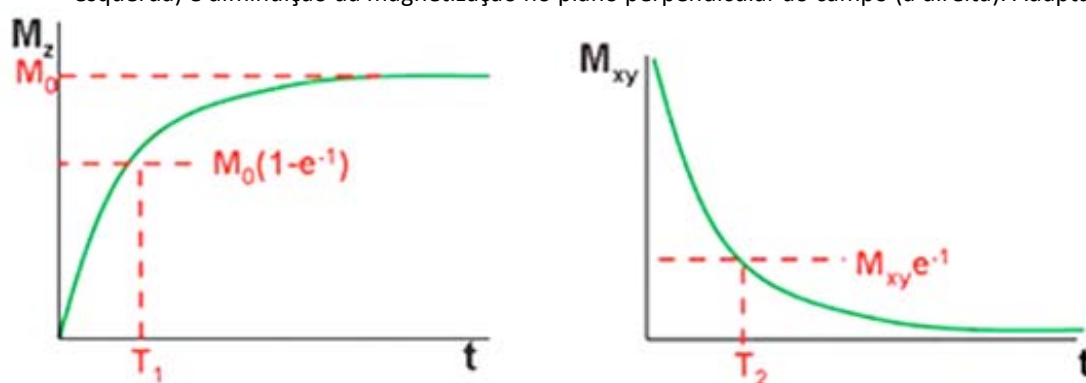
Imediatamente após o término da aplicação do pulso de radiofrequência, o sistema tende a retornar à sua configuração de menor energia e de maior entropia, que consiste na diferença de população entre os dois níveis energéticos e na presença de magnetização apenas na direção do campo aplicado, Figura 3. Intuitivamente poderia imaginar-se que o tempo para que a magnetização no plano xy fosse a zero seria o mesmo para que M_z retornasse ao seu valor de equilíbrio. Contudo, isto não é o observado. O tempo de relaxação transversal, (T_2), no plano xy , é diferente do tempo de relaxação longitudinal (T_1), na direção do campo. Isto é observado devido à diferença nos processos envolvidos em cada tempo de relaxação, sendo que estes processos podem ocorrer simultaneamente. O processo de relaxação também pode ser associado à relaxatividade (r) do material, conforme mostra as equações (XIV) e (XV).

$$r_1 = \frac{1}{T_1} \quad (\text{XIV})$$

$$r_2 = \frac{1}{T_2} \quad (\text{XV})$$

A diminuição em M_{xy} é decorrente da perda na coerência da fase dos momentos magnéticos durante o movimento de precessão, não sendo caracterizada por transferência de energia entre o sistema e as vizinhanças.²⁴ Assim, T_2 está relacionado a um processo majoritariamente entrópico. O aumento de M_z é decorrente da transição dos núcleos no nível de maior energia para o de menor energia. Este processo é mais lento que a perda de coerência de fase no movimento de precessão, isto porque envolve a transferência de energia do sistema para às vizinhanças.²³ Dessa forma, T_1 é sempre maior ou igual a T_2 .

Figura 3 - Aumento da magnetização na direção do campo após a aplicação do pulso de radiofrequência (à esquerda) e diminuição da magnetização no plano perpendicular ao campo (à direita). Adaptado.¹²



O tempo de relaxação longitudinal (T_1) depende da intensidade do campo magnético aplicado e do movimento interno das moléculas, assim, o tempo de relaxação é sensível ao ambiente químico no qual este está inserido. Já o tempo de relaxação T_2 é alterado por heterogeneidades no campo magnético, por exemplo, quando ocorre uma transição o campo é alterado localmente, o que facilita a perda de fase no movimento de precessão. Além disso, ambos os tempos de relaxação dependem da concentração de núcleos na amostra analisada.²³ Os princípios da espectroscopia de ressonância magnética nuclear são utilizados em MRI. Uma imagem pode ser obtida pela diferença nos tempos de relaxação do hidrogênio, seja T_1 ou T_2 , nos diferentes tecidos. De forma geral, um gradiente de campo é aplicado e são utilizados pulsos consecutivos de radiofrequência, para que seja obtida resolução espacial. Como já mencionado, nas imagens obtidas por T_1 os tecidos que relaxarem mais rapidamente apresentarão um aumento mais rápido em M_z e o sinal obtido é interpretado com um contraste brilhante na imagem. Nas imagens por T_2 os tecidos que tiverem menores tempos de relaxação terão menores intensidades de M_{xy} e apresentarão um contraste escuro na imagem.²³ Alguns tecidos apresentam tempos de relaxação muito próximos, o que acarreta em perda de resolução na formação da imagem e dificulta a análise desta. Assim, muitas vezes se faz necessário o uso de agentes de contraste para o aprimoramento da imagem a ser obtida. Os agentes de contraste podem ser subdivididos em dois tipos:²³ (i) agentes de contraste direto: alteram a densidade de átomos de hidrogênio em um tecido e (ii) agentes de contraste indireto: alteram as propriedades de ressonância em um tecido e, portanto, os tempos de relaxação T_1 e T_2 .

Os agentes de contraste mais utilizados são os de contraste indireto, porque a diminuição da densidade de prótons em um tecido pode dificultar a obtenção da imagem, visto que a concentração de átomos de hidrogênio no local em análise está diretamente relacionada à sensibilidade da técnica.

1.1.1 AGENTES DE CONTRASTE

Agentes de contraste são freqüentemente usados na obtenção de imagens por ressonância magnética, a fim de conseguir uma melhor avaliação das condições fisiológicas e

anatômicas ou para melhorar a detecção de malignidade. Como os agentes de contraste são geralmente administrados internamente, eles devem possuir baixa toxicidade e ser facilmente excretados do corpo.²⁶ A maioria dos agentes de contraste comumente utilizados alteram significativamente os tempos de relaxação T_1 e T_2 dos tecidos graças as interações de dipolos magnéticos com os átomos de hidrogênio da água. Tipicamente, um agente de contraste T_1 deve apresentar uma razão r_2/r_1 baixa, enquanto que os agentes de contraste T_2 apresentam uma alta razão r_2/r_1 , superior a 10. Íons paramagnéticos com um alto número de elétrons desemparelhados, como Gd^{3+} e Mn^{2+} , são frequentemente utilizados como agentes de contraste, em decorrência de sua alta relaxatividade.²⁶ Para reduzir a toxicidade destes íons para aplicações *in vivo*, estes íons são quelados, sendo que o complexo Gd-DTPA (DTPA - ácido dietilenotriaminopentaacético) é o agente de contraste mais conhecido.²⁷ Contudo, estes complexos metálicos apresentam elevada toxicidade, sendo que a diminuição da toxicidade leva, obrigatoriamente, à diminuição do poder como agente de contraste (menor número de sítios para a coordenação de moléculas de água).⁸

Uma alternativa para o uso de complexos metálicos é a substituição por nanopartículas magnéticas, como as de óxido de ferro superparamagnético, que apresentam contraste em T_2 . Por ser nanoparticulado, este material permite a funcionalização com ligantes específicos para tecidos de interesse, como aglomerados de células cancerígenas. Em contrapartida, por apresentar apenas contraste em T_2 , pode ser confundido com calcificação, deposição de metais ou sangramentos.¹² Isto ocorre porque nestas regiões se observa o acúmulo de metais paramagnéticos, que ocasionam heterogeneidades no campo aplicado, assemelhando-se às nanopartículas.

Dessa forma, alguns critérios devem ser levados em consideração para que um material seja candidato a substituir os complexos metálicos como agentes de contraste:¹²

- contraste positivo em T_1 ;
- capacidade de acúmulo em células;
- forma nanoparticulada para fácil modificação de superfície e eficiente funcionalização que garantam biosseletividade;
- farmacocinética favorável a fácil entrega e eficiente distribuição dos biomarcadores, garantindo efeitos colaterais mínimos aos pacientes e fácil eliminação.

As nanopartículas de MnO são possíveis candidatas a agentes de contraste, pois apresentam contraste positivo em T_1 e existe a possibilidade de recobrimento e

funcionalização. Apesar do manganês (II) ser paramagnético, o MnO não apresenta efeito sobre o tempo de relaxação transversal. Isto é decorrente do comportamento antiferromagnético deste óxido, que, diferente do óxido de ferro superparamagnético, tem como característica baixa susceptibilidade magnética.

1.2 NANOMATERIAIS EM BIOMEDICINA

As principais aplicações dos nanomateriais no campo biomédico podem ser divididas, de forma geral, em diagnóstico, terapia e técnicas de separação. No tratamento de doenças tem-se destaque para as nanopartículas magnéticas, que podem ser utilizadas como transportadoras de fármacos (*drug delivery*),^{15-18,28-30} e no tratamento de câncer por magnetohipertermia.^{19,31-35} As nanopartículas magnéticas ainda podem ser utilizadas para a separação de células ou proteínas, pela aplicação de um campo magnético externo.^{36,37} Os nanomateriais também têm apresentado grande destaque no uso clínico para a obtenção de imagens e nas modalidades terapêuticas, superando as limitações do uso de moléculas e complexos metálicos. As principais limitações, destas moléculas e complexos metálicos, são o curto tempo de circulação e a biodistribuição não específica pelo organismo, que acarretam em efeitos colaterais indesejados.³⁹ O controle de tamanho e a modificação de superfície das nanopartículas são, por exemplo, formas de aumentar significativamente o tempo de circulação sanguíneo do material empregado. Ademais, estes materiais podem ser conjugados em sua superfície com moléculas que garantam especificidade, tais como anticorpos e peptídeos.³⁹

Dentre as técnicas de diagnóstico, a obtenção de imagens por ressonância magnética obtém informações anatômicas e fisiológicas dos organismos vivos de forma não invasiva. Além disso, é atualmente o método mais sensível para retratar tecidos macios. Por isso, tem sido amplamente utilizada para geração de imagens do cérebro e sistema nervoso central, para avaliar a função cardíaca, e para a detecção de tecidos anormais, tais como tumores.⁹ No entanto, uma vez que há pouca diferença entre os tempos de relaxação dos tecidos normais e anormais, agentes de contraste tem sido amplamente utilizados para o aprimoramento das imagens, sendo que os materiais nanoparticulados tem apresentado

grande potencial para esta aplicação. O primeiro nanomaterial empregado para este fim foram óxidos de ferro, que apresentam contraste em T_2 .⁴⁰ Nanopartículas de óxido de ferro fornecem detecção muito sensíveis em T_2 , derivadas de suas características superparamagnéticas e sua dimensão nanométrica permite biodistribuição diferenciada e, conseqüentemente, fornece capacidade de contraste em imagens além das utilizadas convencionalmente.⁴¹ Até recentemente, nanopartículas de óxido de ferro eram o único material utilizado em MRI, sendo que muitos pesquisadores se concentravam apenas no aprimoramento de agentes de contraste do tipo T_2 .^{7,42,43}

Em decorrência das desvantagens do uso de agentes de contraste T_2 , surgiu como alternativa o emprego de materiais nanoestruturados que apresentassem contraste em T_1 , como nanopartículas inorgânicas recobertas com materiais biocompatíveis. Entretanto, para ser candidato a agente de contraste T_1 duas características importantes deveriam ser levadas em consideração: apresentar íons metálicos com alto caráter paramagnético (r_1 grande) e anisotropia magnética desprezível (r_2 pequeno).⁹ Intuitivamente, os primeiros candidatos foram nanopartículas de gadolínio, porque muitos complexos deste metal eram empregados clinicamente como agentes de contraste T_1 . Os primeiros materiais de gadolínio estudados foram óxidos (Gd_2O_3),^{44,45} fluoretos (GdF_3)⁴⁶ e fosfatos ($GdPO_4$).⁴⁷ Para garantir menor toxicidade e biocompatibilidade, estes materiais eram recobertos com derivados de polietilenoglicol (PEG),⁴⁴ sílica⁴⁵ e dextrana.⁴⁷ Mais recentemente, nanopartículas de MnO recobertas com um derivado do PEG e dispersas em fase aquosa também foram estudadas como potenciais agentes de contraste,¹² tendo demonstrado a capacidade de diferenciar a estrutura anatômica do tecido nervoso de ratos. Além disso, as nanopartículas de MnO quando conjugadas a anticorpos específicos contra células cancerígenas (Herceptin®, por exemplo), obtiveram seletividade para células em metástase no tumor cerebral.¹² Entretanto, poucos estudos foram feitos sobre a toxicidade destas partículas, bem como sobre diferentes tipos de materiais a serem utilizados para garantir biocompatibilidade a estas.^{13,17} Como mostrado anteriormente, as nanopartículas inorgânicas tem demonstrado grande potencial para substituição dos complexos de gadolínio, sendo que os agentes de contraste T_1 ainda necessitam de um maior estudo sobre a sua estabilidade e toxicidade, bem como sobre os diferentes materiais que podem ser utilizados para garantir biocompatibilidade.

1.3 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS

Atualmente diversos métodos vêm sendo desenvolvidos para a síntese de nanopartículas inorgânicas de várias composições, sendo que a aplicação bem sucedida de tais nanopartículas em diversos campos é altamente dependente da estabilidade das partículas em diferentes condições. Ademais, diferentes formas de nanocristais podem ser obtidas, incluindo nanobastões e nanofios, a partir da variação das condições de reação, como o uso de misturas de tensoativos em diferentes proporções.^{48,49}

A síntese por co-precipitação é um método fácil e conveniente para a obtenção de nanopartículas de óxido de ferro como Fe_3O_4 e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. O controle morfológico, tamanho e forma, e a composição química das nanopartículas dependem muito do precursor metálico utilizado, da proporção dos reagentes, da temperatura da reação, do valor de pH e da força iônica do meio.⁶ Com esta síntese, uma vez que as condições estejam otimizadas, a qualidade das nanopartículas torna-se reprodutível levando, porém, a certa dificuldade no controle da morfologia da partícula e resultando, em muitos casos, em largas distribuições de tamanho.⁶

Nanopartículas também podem ser obtidas via microemulsão e micelas invertidas. Esta síntese se inicia pela utilização de uma solução aquosa contendo os íons metálicos que constituirão a partícula. A adição de um grande volume de solvente orgânico, como tolueno, na presença de moléculas denominadas de tensoativas, as quais agem na interface entre o meio polar e apolar, ocasiona a formação das micelas invertidas. A razão entre a água, quantidade de tensoativo e o solvente orgânico determina o tamanho da micela ou micro-reator no interior do qual a partícula será formada, geralmente por reações de hidrólise e condensação dos íons metálicos. Como o micro-reator constitui um ambiente com elevada concentração dos sais uma vez que a solução aquosa permanece confinada em seu interior e não mais dispersa no meio apolar, o tamanho dos micro-reatores, conseqüentemente, determina o tamanho das nanopartículas a serem obtidas. Diversos tipos de nanopartículas podem ser sintetizados por este método, levando a formação de sistemas com estreita distribuição de tamanho. Entretanto, devido à presença de substâncias tensoativas e sua elevada afinidade pela superfície das nanopartículas, a remoção dessas moléculas da

superfície do material é bastante dificultada e, como agravante, são necessárias grandes quantidades de solvente para a obtenção de quantidade apreciável de material.⁶

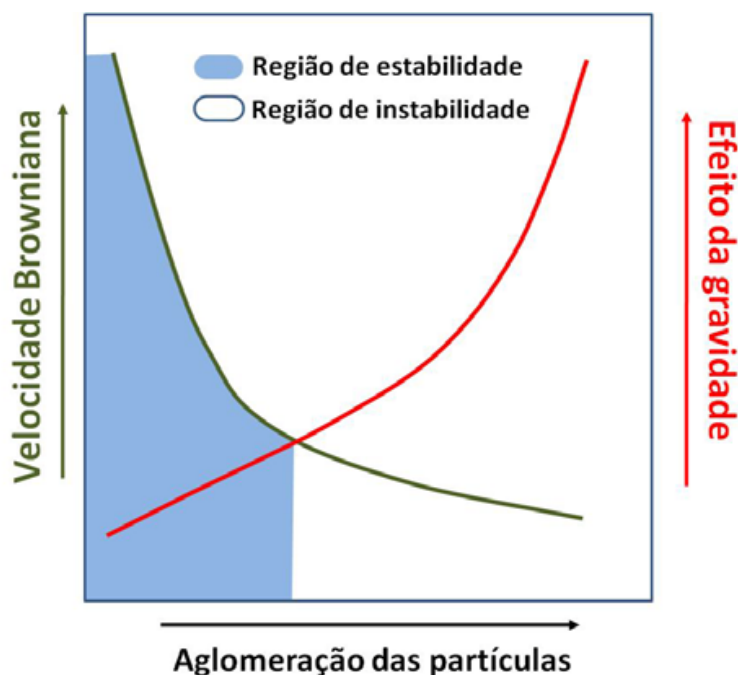
Outro método para a obtenção de materiais nanoparticulados é via a decomposição térmica de precursores organometálicos ou de complexos metálicos-surfactantes em solventes orgânicos com alto ponto de ebulição, na presença de tensoativos. Este método tem possibilitado a síntese de nanopartículas inorgânicas com alto grau de cristalinidade, monodispersas e capacidade elevada de dispersão em fase orgânica.⁴⁸ A quantidade de material obtida com este tipo de síntese também é uma de suas desvantagens, visto que se observa um rendimento relativamente alto, mas a quantidade mássica é pequena, da ordem de algumas centenas de miligramas. Para evitar oxidação indesejada do material a síntese é realizada em atmosfera inerte, normalmente em N₂ ou Ar.

Dentre os diferentes métodos de síntese de nanopartículas supracitados, os que se baseiam em decomposição térmica são os mais utilizados para a obtenção de alguns óxidos, tais como Gd₂O₃ e MnO principalmente pelo controle químico e morfológico oriundo dessa metodologia. No que se refere às nanopartículas de MnO, alguns dos principais precursores utilizados são o acetilacetonato de manganês (II)⁵⁰, o acetato de manganês (II),⁵¹ o oleato de manganês (II)⁵²⁻⁵⁴ e o estearato de manganês (II).⁵⁵ Dependendo das condições de síntese é possível obter sistemas com características muito diferentes. Ould-Ely e colaboradores⁵⁶ sintetizaram nanopartículas de MnO com diferentes morfologias, obtendo nanocubos, nanocruzes e até nanohexápodes. A mudança de morfologia foi possível devido à alteração na proporção entre precursor e tensoativo, pela alteração da natureza do tensoativo e pela adição controlada de uma pequena quantidade de água. O trabalho de Qiu e colaboradores⁵³ mostra a obtenção do MnO em duas distribuições de tamanho distintas, uma com relativo controle morfológico com tamanho médio ao redor de 20 nm e outra sem controle sobre a forma com tamanho de partícula superior a 40 nm. Outros trabalhos na literatura discutem o mecanismo de formação de partículas inorgânicas, analisando parâmetros como a taxa de aquecimento do sistema, a temperatura final e o tempo de reação na temperatura de refluxo.^{54,57} Apesar do esforço para determinar qual é o mecanismo de nucleação e crescimento nestes sistemas, alguns trabalhos apresentam propostas diferentes para explicar este fenômeno, sendo que poucos trabalhos tem reportado a obtenção de nanopartículas de MnO com rígido controle de tamanho e forma.^{52,54,56}

1.4 ESTABILIDADE COLOIDAL DE NANOPARTÍCULAS

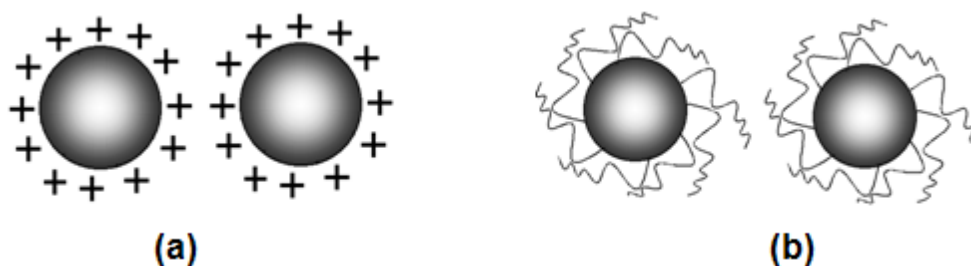
No decorrer de uma síntese de nanopartículas, os fenômenos de agregação e de crescimento das partículas promovem uma diminuição da área de superfície, ocasionando consequente diminuição da energia do sistema, fazendo que estes processos sejam favorecidos termodinamicamente. Porém, estes não são os únicos fatores envolvidos na estabilidade coloidal. Quando dispersas, as nanopartículas apresentam um movimento contínuo e aleatório que confere maior estabilidade a estas frente à agregação e precipitação. Este tipo de movimento é chamado de movimento Browniano.⁵⁸ A relação entre o movimento Browniano, a ação da gravidade e a aglomeração das partículas é ilustrada na Figura 4. No entanto, o movimento Browniano pode levar a um maior número de colisões entre as partículas, o que pode dar origem a partículas com massas mais elevadas e, portanto, mais suscetíveis a ação da força gravitacional, os chamados floculados, aglomerados ou agregados, dependendo do tipo de interação inter-partículas experimentada pelo sistema coloidal.⁵⁸

Figura 4 - Diagrama esquemático das regiões de estabilidade e instabilidade de um sistema coloidal considerando os efeitos do movimento Browniano e da gravidade em função da aglomeração das partículas. Adaptado.⁵⁸



Dependendo da natureza do dispersante e das características físico-químicas do sistema, as partículas podem atingir um tamanho crítico, a partir do qual a estabilidade coloidal é comprometida. Ao adquirir um tamanho de partículas maior que o crítico o sistema perde sua estabilidade e ocorre a precipitação do material particulado devido ao efeito da gravidade. Quando as partículas são menores que o tamanho crítico, o sistema coloidal é estável e o efeito do movimento Browniano de estabilização se sobrepõe ao efeito da gravidade. O efeito da alta área de superfície não compromete apenas a estabilidade coloidal no que se refere à agregação. Frequentemente, a superfície das nanopartículas possui elevada reatividade, possibilitando que ocorram diversos processos de superfície como, por exemplo, oxidação destas partículas. Isto pode prejudicar as propriedades físicas e químicas desejadas ou até mesmo impossibilitar a aplicação das nanopartículas para os fins esperados. Assim, promover a estabilização das nanopartículas faz-se necessário, sendo que diversas estratégias têm sido desenvolvidas nesse sentido. As diferentes estratégias para estabilização e proteção da superfície se baseiam em dois fenômenos. O primeiro é proveniente da repulsão eletrostática, na qual a superfície das nanopartículas é eletricamente carregada, sendo controlado pelo uso de diferentes solventes com diferentes polaridades.⁵⁸ O segundo tipo é decorrente de efeitos estéricos, onde espaçadores encontram-se fisicamente adsorvidos ou quimicamente ligados a superfície evitando o contato físico entre as nanopartículas,⁵⁹ Figura 5. Muitas substâncias podem ser utilizadas como espaçadores, tendo destaque os surfactantes e os polímeros.⁶⁰⁻⁶² Em ambos os casos a força repulsiva, quer promovida pelo efeito eletrostático ou pelo impedimento físico devido à presença de moléculas na superfície das nanopartículas, deve se sobrepular aos efeitos de superfície.

Figura 5 - Mecanismos de estabilização da superfície de nanopartículas: (a) eletrostática e (b) por efeito estérico.



No que se refere ao efeito estérico, alguns métodos são utilizados após a síntese para promoverem o recobrimento completo da superfície das nanopartículas protegendo-as inclusive de possíveis efeitos de oxidação, o que origina uma estrutura comparada à denominada de casca/caroço ou “core/shell”, podendo conferir novas propriedades para as nanopartículas, como a biocompatibilidade, característica esta essencial para aplicações em biomedicina.^{20,63}

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e adequar rotas de síntese para a obtenção de nanopartículas antiferromagnéticas de MnO via decomposição térmica. Realizar a funcionalização do material e estudar sua estabilidade em condições fisiológicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS/METAS

Dentro do objetivo geral acima descrito, as metas necessárias para que o mesmo fosse atingido neste trabalho foram:

- Desenvolver e adequar rotas de síntese baseadas na decomposição térmica de precursores de complexos de manganês para a obtenção de nanopartículas antiferromagnéticas de MnO com controle de tamanho e forma;
- Realizar a modificação da superfície do material obtido para possibilitar a funcionalização do mesmo;
- Promover a funcionalização das nanopartículas sintetizadas com carboximetil-dextrana e estudar a estabilidade coloidal das partículas em condições fisiológicas para possibilitar a aplicação destas em biomedicina como agentes de contraste em imagem por ressonância magnética;
- Realizar a caracterização das nanopartículas obtidas para conhecer as propriedades físicas e químicas, bem como sua toxicidade.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Em todos os procedimentos experimentais realizados para preparação e tratamento das amostras foram utilizados reagentes analíticos sem nenhum tratamento prévio, adquiridos junto à Aldrich e/ou J.T. Baker, a saber: acetilacetonado de manganês(II) – $\text{Mn}(\text{acac})_2$ 97%; ácido oleico 90%; oleilamina 70%; etanol; hexano; acetonitrila; isopropanol; cloreto de manganês(II) tetrahidratado - $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; hidróxido de sódio; ácido acético glacial; 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS); carboximetil-dextrana (CMDex); cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (CEDC); N-hidroxisuccinimida (NHS); 4-nitrobenzaldeído; ácido nítrico; tampão PBS; brometo de potássio grau espectroscópico; tri(hidroximetil)aminometano; cloreto de sódio; bicarbonato de sódio; cloreto de potássio; fosfato de potássio; sulfato de sódio; ácido clorídrico; cloreto de cálcio dihidratado; e cloreto de manganês(II) monohidratado.

3.1 SÍNTESE DO PRECURSOR OLEATO DE MANGANÊS (II)

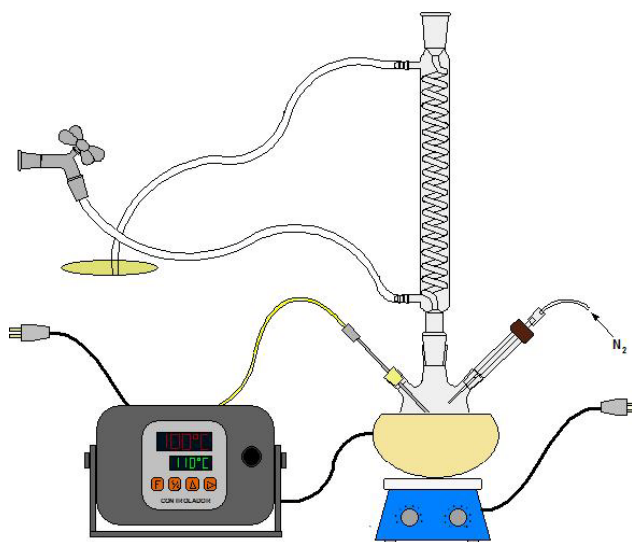
A síntese do precursor foi realizada de acordo com o descrito na literatura⁵³ fazendo-se algumas modificações. Dissolveu-se 20 mmol de cloreto de manganês(II) tetrahidratado e 40 mmol de ácido oleico em 100 mL de etanol. A esta solução foi gotejado por uma hora uma solução de 40 mmol de hidróxido de sódio em 100 mL. A solução resultante foi mantida sob agitação por mais uma hora. O precipitado foi lavado com uma mistura de água, etanol e hexano repetidas vezes. O oleato de manganês(II), solúvel em hexano, foi seco sob vácuo e estocado.

3.2 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE MnO

A síntese das nanopartículas de MnO foi realizada a partir da decomposição térmica de um precursor, no caso um complexo do metal desejado. O método escolhido para a

síntese do material foi uma adequação do proposto por Hou e colaboradores⁶⁴, no qual a decomposição do precursor se dá em uma mistura de ácido oleico e oleilamina, sob fluxo de um gás inerte, N₂ ou Ar. Seguindo o proposto por Hou e colaboradores⁶⁴, foram utilizados 4 mmol do precursor de manganês, Mn(acac)₂ ou oleato de Mn(II), e este foi adicionado a um balão de três bocas de fundo redondo contendo uma mistura de 25 mmol de ácido oleico e 35 mmol de oleilamina. O aparato experimental é ilustrado na Figura 6. Em todas as rotas de síntese realizadas para a obtenção das nanopartículas de MnO foi utilizado o mesmo aparato experimental.

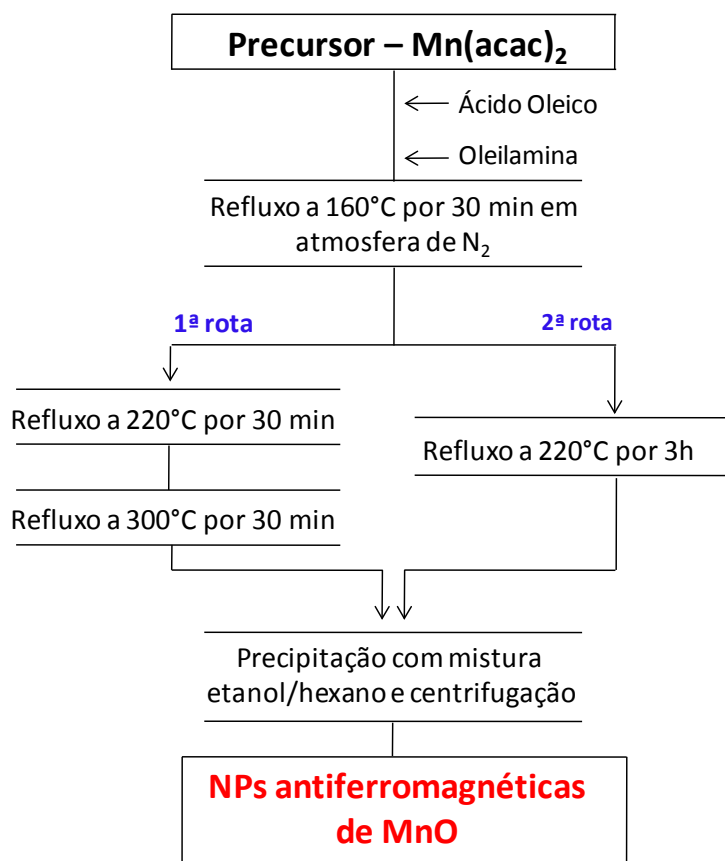
Figura 6 - Representação esquemática do aparato experimental utilizado para a síntese das nanopartículas. Adaptado.⁶⁵



O aquecimento do sistema foi realizado utilizando-se uma manta de aquecimento ligada a um controlador de temperatura digital Flyever modelo Fe50RPN, sendo a temperatura controlada por um termopar mergulhado no meio reacional. Todo o procedimento foi realizado sob fluxo de gás nitrogênio (N₂). A homogeneização foi realizada utilizando uma barra magnética e um agitador magnético sobre o qual a manta de aquecimento e o restante do sistema foram apoiados, Figura 6. A solução foi aquecida a 10 °C/min até 160 °C e manteve-se a esta temperatura para que ocorresse a completa dissolução do precursor. Posteriormente, foram adotadas duas rotas para a obtenção do material a partir do precursor Mn(acac)₂, Figura 7. Na primeira, descrita como 1^a rota, o sistema foi aquecido a 5 °C/min até 220 °C e manteve-se o sistema nesta temperatura por 30 min. O sistema foi aquecido até 300 °C a 2 °C/min e mantido a esta temperatura por mais 30 min. Deixou-se o sistema resfriar a temperatura ambiente e ao material obtido foi

adicionado hexano e etanol e, então, realizou-se a lavagem por centrifugação a 8000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as partículas redispersas em hexano. Adicionou-se etanol e o material foi lavado por centrifugação. Este procedimento foi repetido 4 vezes. Finalmente, o material obtido foi disperso em hexano, rotulado e armazenado.

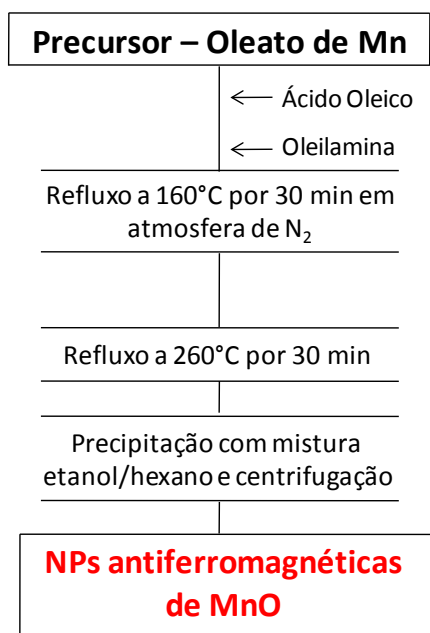
Figura 7 - Fluxograma da síntese de nanopartículas de MnO a partir do Mn(acac)₂.



Na segunda rota de síntese proposta, após a dissolução do precursor a 160 °C, o sistema foi aquecido a 5 °C/min até 220 °C, temperatura na qual o sistema foi mantido por três horas. Deixou-se o sistema resfriar a temperatura ambiente e repetiu-se o mesmo procedimento de lavagem.

A síntese a partir do precursor oleato de manganês(II) foi realizada de forma similar a feita a partir do Mn(acac)₂. O sistema foi aquecido a 10 °C/ min até 160 °C para que ocorresse a completa dissolução do precursor. Posteriormente a temperatura foi elevada até 260 °C a 5 °C/min, temperatura na qual o sistema foi mantido em refluxo por 30 min. Deixou-se resfriar a temperatura ambiente e fez-se a lavagem do material como descrito anteriormente. A Figura 8 mostra o fluxograma da síntese.

Figura 8 - Fluxograma da síntese utilizando-se do precursor oleato de manganês(II)



3.3 MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE

Realizou-se a modificação de superfície das nanopartículas obtidas para conferir a estas dispersibilidade em meio aquoso e para possibilitar a funcionalização do material. Optou-se por utilizar o 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS) em substituição ao ácido oleico devido à presença do grupo silano, que pode se ligar fortemente a superfície das nanopartículas e, também, pela presença do grupo amino terminal, que possibilitaria a posterior funcionalização com moléculas biocompatíveis. A substituição dos ligantes de superfície se deu utilizando uma adaptação do método proposto por De Palma e colaboradores.⁶⁶ Em um erlenmeyer foram adicionados 100 mg das nanopartículas de MnO previamente sintetizadas e previamente secas em estufa a vácuo a temperatura ambiente por 12 horas. Adicionou-se 50 mL de hexano e as partículas foram dispersas utilizando-se banho de ultrassom. A esta dispersão foi adicionado ácido acético glacial e, após a homogeneização, foi adicionado o APTMS e o sistema foi mantido sob agitação magnética. A Tabela 2 mostra as quantidades adicionadas de ácido acético e de APTMS, bem como o tempo de reação. Passado o tempo de reação em cada caso, retirou-se a agitação magnética, deixando o sistema em repouso por uma hora. O sobrenadante foi descartado e

ao precipitado de partículas foi adicionado etanol e excesso de hexano, lavando-se por centrifugação a 7000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e repetiu-se a lavagem por centrifugação com etanol e hexano por mais três vezes. As partículas foram então dispersas em etanol ou água deionizada, rotuladas e estocadas.

Tabela 1 - Volumes utilizados de APTMS e de ácido acético nas reações de substituição de ligante e o tempo de reação para cada amostra.

Amostra	APTMS (mL)	Ácido Acético (μL)	Tempo de reação (h)
S-00	2	50	120
S-03	4	100	72
S-05	4	100	120
S-06	4	100	24
S-07	4	100	96
S-08	4	100	48

3.3.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GRUPO AMINA LIVRE SOBRE A SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS MODIFICADAS COM APTMS

A concentração de grupos aminas livres sobre a superfície das nanopartículas após a modificação com APTMS foi realizada para avaliar se as modificações realizadas no método de De Palma e colaboradores⁶⁶ foram satisfatórias. Para tal finalidade foi empregado o método proposto por Moon e colaboradores,⁶⁷ o qual consiste na reação de um aldeído com a amina sobre a superfície das nanopartículas, formando grupamentos iminas. A hidrólise da imina formada e a determinação da concentração do aldeído liberado na reação de formação foram examinados por espectroscopia UV, permitindo a determinação indireta da concentração de amina. Assim, para a determinação do grupo amina livre procedeu-se da seguinte forma: Pesou-se aproximadamente 2 mg da amostra modifica com APTMS e em seguida, 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 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 contendo as nanopartículas (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 de reação (SOLUÇÃO 3 – mistura de 75 mL de água com 75 mL de etanol e 0,2 mL de ácido acético.). O material foi agitado e depois mantido em repouso por 30 min. Adicionou-se então 1,0 mL de solução aquosa de NaOH 2,5 mol.L⁻¹ para que as partículas floculassem. Realizou-se a centrifugação e 1,0 mL do sobrenadante foi coletado para a análise.

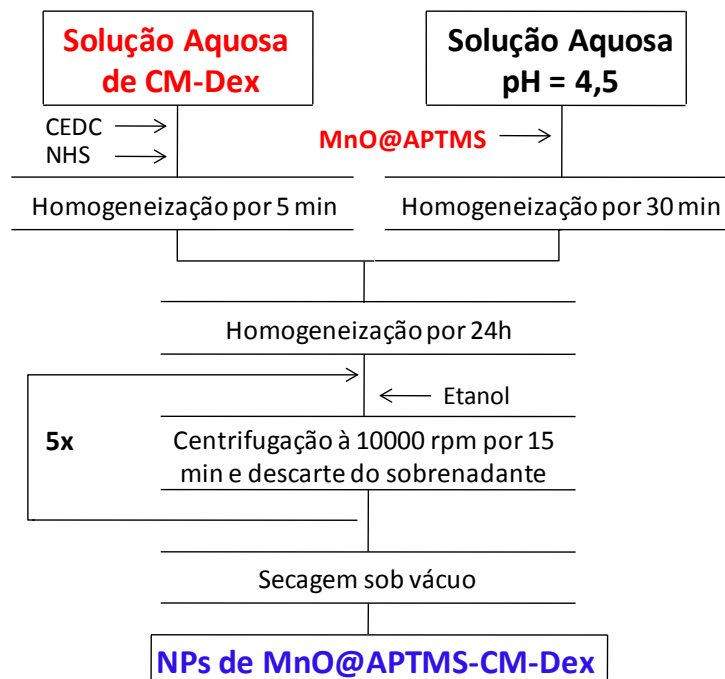
A curva de calibração foi feita a partir da dissolução do 4-nitrobenzaldeído em uma solução 50% em volume da SOLUÇÃO 3 com solução aquosa de NaOH 2,5 mol.L⁻¹. O comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) do 4-nitrobenzaldeído foi determinado fazendo-se o espectro de absorção entre 235 nm e 400 nm, utilizando um espectrofotômetro de duplo feixe espacial modelo V-630 da Jasco, o qual utiliza lâmpadas de tungstênio e de deutério. Assim, conhecendo-se a massa de amostra inicial e o volume utilizado nas medidas de absorbância, foi possível determinar a concentração de amina por miligrama de amostra.

3.4 FUNCIONALIZAÇÃO COM CARBOXIMETIL-DEXTRANA

A funcionalização das nanopartículas modificadas com APTMS foi realizada com base no trabalho de Barrera e colaboradores.⁶⁸ O fluxograma do método empregado é ilustrado na Figura 9. Dispersou-se 50 mg de nanopartículas de MnO modificadas com APTMS em 10 mL de água deionizada, sendo ajustado o pH da dispersão para 4,5 com uma solução 0,1 mol.L⁻¹ de HNO₃. Foi preparado 10 mL de solução aquosa contendo quantidades iguais (100 mg) de CMDex, de NHS e de CEDC. Adicionou-se a solução contendo CMDex à dispersão de nanopartículas e manteve-se o sistema sob agitação magnética por 24 horas. Após o tempo de reação, adicionou-se etanol e lavou-se por centrifugação a 10000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado e as partículas foram re-dispersadas em quantidade mínima de água. Foi adicionado etanol em excesso e as partículas lavadas por centrifugação. O

procedimento de lavagem foi realizado repetidas vezes. Finalmente as partículas foram dispersas em água, rotuladas e estocadas.

Figura 9 - Fluxograma da etapa de recobrimento das nanopartículas com CMDex.



3.4.1 TESTES DE CITOTOXICIDADE

Os testes de citotoxicidade foram realizados para que se conhecessem os possíveis efeitos nocivos do material a um organismo vivo e foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Valtencir Zucolotto do Instituto de Física de São Carlos - USP. Optou-se pela realização do teste de viabilidade celular em duas linhagens celulares, sendo a primeira uma linhagem de células saudáveis NCTC clone L929 (fibroblastos de tecido conectivo de camundongo), linhagem esta recomendada e estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para ensaios *in vitro* de citotoxicidade. Para efeito de comparação, a segunda linhagem escolhida foi de células cancerosas HeLa (carcinoma cervical humano) obtidas do banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Em ambos os casos as linhagens de células (1.10^5 células.mL⁻¹) foram incubadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), suplementadas com 10% de soro bovino fetal, 0,06 g.L⁻¹ de penicilina G e 0,10 g.L⁻¹ de estreptomicina, em estufa com

atmosfera de 5% de CO₂ a temperatura de 37 °C. As nanopartículas previamente filtradas em filtro 0,22 µm foram submetidas ao teste de viabilidade celular por 24 horas utilizando-se três concentrações de nanopartículas, 50 µg.mL⁻¹, 25 µg.mL⁻¹ e 5 µg.mL⁻¹. Os testes para cada concentração em cada linhagem de células foram repetidos três vezes para que se obtivesse uma análise estatística dos resultados.

As células previamente preparadas foram submetidas ao teste de viabilidade celular via MTT (*3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*) proposto por Mosmann e colaboradores,⁶⁹ o qual consistiu na incubação de 1.10⁵ células.mL⁻¹ contendo as nanopartículas com MTT 0,5 mg.mL⁻¹ por 4 horas a 37 °C e atmosfera de 5% de CO₂. As placas foram mantidas sob agitação por 10 minutos para que ocorresse a completa solubilização dos cristais de formazana. A análise de morte celular foi realizada fazendo-se a leitura da absorbância em 550 nm em leitor de placas da Molecular Devices®. Os dados obtidos foram analisados através do Programa Graph Pad Prism versão 5.0, sendo que as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes apenas quando p<0,05.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

A determinação da estrutura cristalográfica das amostras sintetizadas foi realizada por difratometria de raios X (DRX) utilizando-se um difratômetro Rigaku RINT2000 (IFSC-USP) ou um difratômetro Rigaku Ultima IV (IQSC-USP), ambos operando com radiação K_α do cobre ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) e velocidade de varredura de 0,020 °/4,0 segundos em 2 θ . As amostras como sintetizadas foram preparadas na forma de filme pelo gotejamento da dispersão de nanopartículas em hexano sobre o substrato de vidro, deixando-se que o solvente evaporasse lentamente a temperatura ambiente.

A análise do tamanho médio de partícula e da morfologia dos materiais obtidos foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) utilizando o microscópio eletrônico Philips CM120 operando a 120 kV (DEMA-UFSCar). As amostras de nanopartículas assim que sintetizadas foram preparadas da seguinte forma: uma alíquota da dispersão em hexano foi diluída em um pequeno volume de uma mistura de hexano e octano (em uma razão volumétrica de 1:1), sendo a dispersão final mantida em banho de ultra-som por

aproximadamente 90 minutos. Após esse período, uma gota dessa dispersão foi depositada sobre uma grade de cobre previamente recoberta por um fino filme do polímero Formvar® seguida pela deposição de carbono por *sputtering*. O solvente foi lentamente evaporado a temperatura ambiente e então a amostra foi mantida sob vácuo por 12 horas. As amostras de nanopartículas modificadas com APTMS foram preparadas de forma similar, alterando-se apenas o solvente em que a amostra estava dispersa utilizando, nesse caso, isopropanol. As amostras de nanopartículas recobertas com CMDex foram preparadas utilizando-se uma dispersão 1:1 em volume de água deionizada e acetonitrila de forma a melhorar a dispersão das nanopartículas sobre a grade de microscopia. Após a secagem a temperatura ambiente do solvente as amostras foram mantidas sob vácuo por 48 horas. O diâmetro médio das partículas foi determinado a partir da contagem de aproximadamente 300 partículas, utilizando o software de domínio público ImageJ versão 1.42q.

As curvas de magnetização 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. As amostras analisadas por VSM foram preparadas colocando-se uma pequena massa conhecida do analito no interior de uma cápsula de medicamento vazia e esta cápsula presa por uma das extremidades no interior de um fino tubo de plástico, fixado verticalmente entre duas bobinas semicondutoras. O campo magnético aplicado foi variado entre 20 e -20 kOe e as medidas realizadas à temperatura ambiente.

Para determinar os ligantes presentes na superfície das nanopartículas como sintetizadas e após as etapas de modificação de superfície e funcionalização, foram realizadas análises por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). As análises por FTIR foram realizadas em um espectrofotômetro Shimadzu modelo IR-PRESTIGE 21 (IQSC-USP) utilizando-se partilha de brometo de potássio (KBr) contendo a amostra a ser analisada previamente seca sob vácuo. Os espectros foram coletados no intervalo de 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} com uma resolução de 2 cm^{-1} e 16 varreduras obtendo-se uma média estatística dos sinais. Em todos os espectros foi realizado tratamento utilizando o software IR-Solution para a atenuação dos efeitos de atmosfera, bandas referentes ao CO_2 e à água.

A determinação do percentual em massa de MnO por grama de amostra, modificada com APTMS ou recoberta com CMDex, foi realizada fazendo-se a análise termogravimétrica das amostras, utilizando-se o equipamento TGA-50 da Shimadzu (IQSC-USP). As amostras foram previamente secas sob vácuo a 50 °C por 48 horas para promover a completa evaporação do solvente. Aproximadamente 4 mg de cada amostra foram colocados sobre suporte de amostra de platina, realizando-se a análise em atmosfera dinâmica, com vazão de 50 mL/min de ar sintético (20% gás oxigênio e 80% gás nitrogênio, grau de pureza de 99,997%), no intervalo de 30 °C a 900 °C, com uma razão de aquecimento de 10 °C/min.

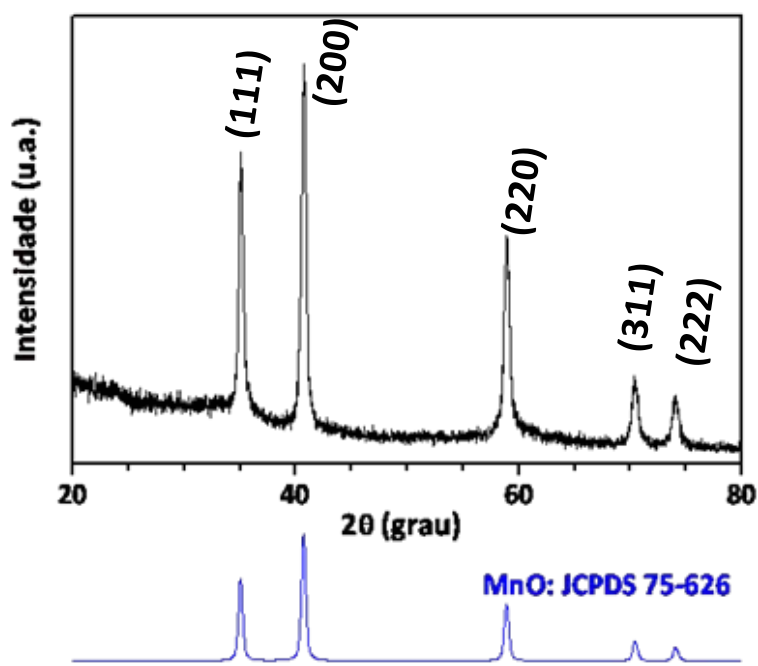
O ponto isoelétrico das amostras puras e recobertas bem como informações adicionais sobre o recobrimento das nanopartículas foram obtidos utilizando as medidas de mobilidade eletroforética. As medidas foram realizadas em temperatura controlada de 25 ± 1 °C em cela capilar ZET 5104 do equipamento Zetasizer NanoZS da Malvern em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Miguel Jafelici Júnior (IQ-UNESP). As medidas foram realizadas em amostras com concentração de 1 mg.mL^{-1} , sendo o pH variado no intervalo de 2 a 10 com soluções de HCl e NaOH para a determinação do ponto isoeletrônico. As medidas de espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scattering* - DLS) foram realizadas para determinar o raio hidrodinâmico das partículas em fase aquosa e em condições miméticas através da utilização da composição de “sangue artificial” sendo utilizado o analisador de partículas Zetasizer NanoZS Malvern (IQ-UNESP). A solução utilizada para mimetizar as condições de força iônica do plasma sanguíneo é conhecida na literatura como SBF (*Simulated Body Fluid*)⁷¹, preparada da seguinte forma: adicionou-se em água deionizada 8,003 g de NaCl, 0,335 g de NaHCO₃, 0,224 g de KCl, 0,174 g de K₂PO₄, 0,071 g de Na₂SO₄, 40,0 mL de ácido clorídrico, 0,368 g de CaCl₂.2H₂O e 6,057 g de NH₂C(CH₂OH)₃. O diâmetro e a intensidade média foram calculados via software Zetasizer Nano 6.2, utilizando o algoritmo CONTIN.⁷⁰ Após o prepara das dispersões, as medidas tiveram um atraso de 5 minutos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE MnO

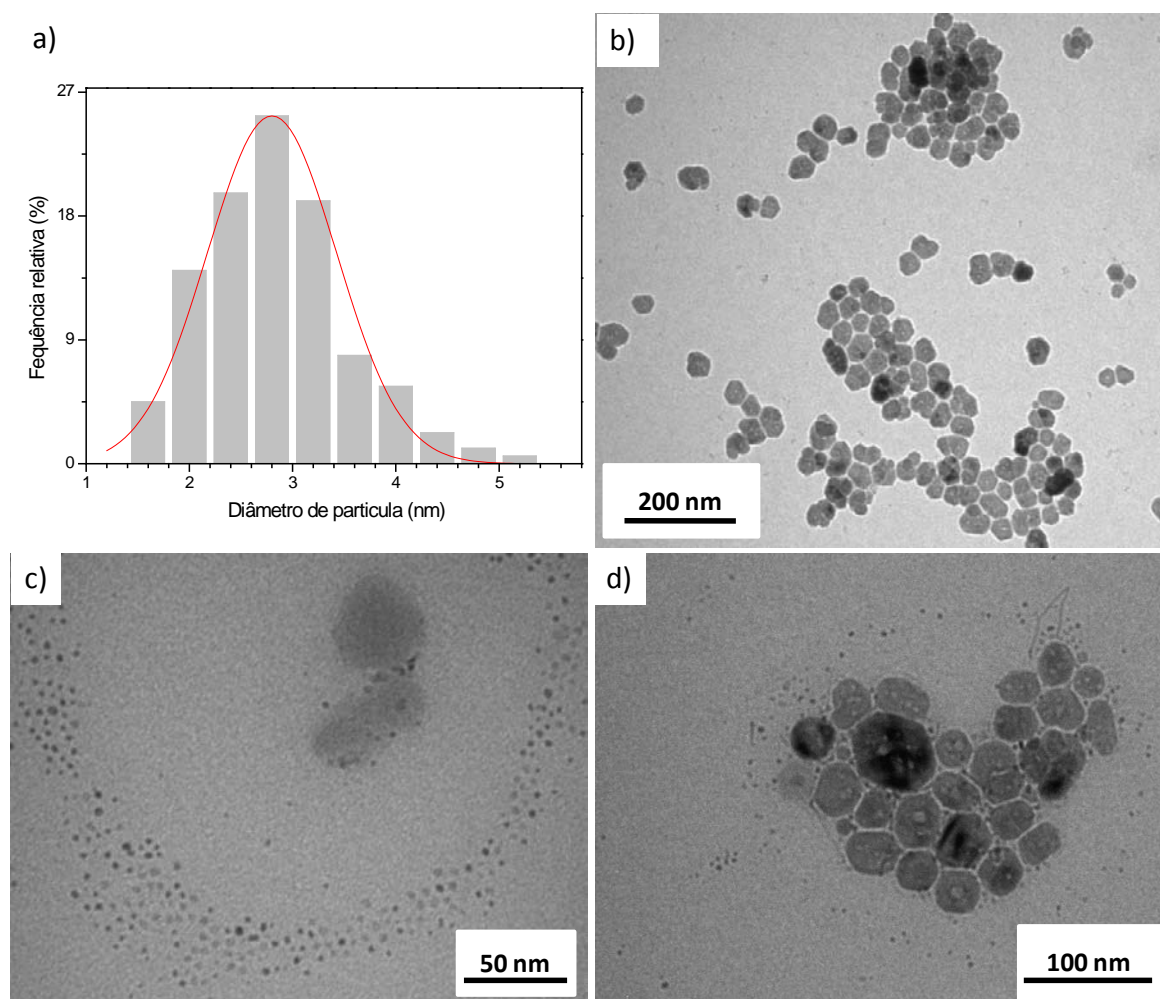
As nanopartículas antiferromagnéticas de MnO foram sintetizadas, inicialmente, a partir de modificações no método proposto por Hou e colaboradores,⁶⁴ sendo utilizado como precursor o $\text{Mn}(\text{acac})_2$. A mistura ácido oleico/oleilamina atua como solvente na reação e, além disso, controla os processos de nucleação e crescimento das partículas. O controle da nucleação é possível em decorrência da presença de grupos polares nos dois compostos, o que permite a estes se adsorverem sobre o *cluster* durante o processo de nucleação. O crescimento é controlado pela permanência do material adsorvido sobre o *cluster*, o que evita a coalescência das partículas por choques interpartículas e, ainda, controla a difusão do íon metálico, proveniente do precursor, para o interior do *cluster* em crescimento. No decorrer da síntese observou-se a mudança de cor no meio reacional, que passou de amarelado para verde opalescente. Esta mudança pode ser atribuída a decomposição do precursor, dando início ao processo de nucleação das nanopartículas de MnO. Durante a lavagem do material obtido, observou-se nova mudança de cor, do verde para marrom escuro. Apesar do MnO apresentar coloração verde esmeralda enquanto sólido estendido,⁷² quando em escala nanométrica este apresenta uma coloração marrom,^{51,53-56} isto ocorre devido à mudança das propriedades óticas do material em decorrência de efeitos eletrônicos e de oxidação de superfície. A caracterização por DRX, Figura 10, permitiu observar a formação da fase cristalina desejada do MnO, estrutura do tipo sal-gema que apresenta antiferromagnetismo. A partir do difratograma de raios X também foi possível observar que não ocorreu oxidação do material durante a síntese ou mesmo durante o processo de lavagem, o que poderia acarretar em perda ou alteração das propriedades de interesse.

Figura 10 - Difratoograma de raios X da amostra de MnO sintetizada a partir do precursor Mn(acac)₂ e o padrão para este material.



A caracterização do material obtido por MET, Figura 11, permitiu analisar a morfologia do material e sua homogeneidade. O que se observou foi a presença de duas distribuições de tamanho, uma com nanopartículas de aproximadamente 3 nm e outra com tamanho médio superior a 30 nm. A análise de diferentes regiões do porta amostra permitiu que fosse realizada a contagem de partículas para a determinação do tamanho médio destas. Como o número de partículas para compor a distribuição de tamanho médio no caso das partículas de maior tamanho foi pequeno e, também, não apresentava controle adequado sobre a morfologia destas, a mesma não apresentava dados estatísticos confiáveis para análise da distribuição de tamanhos. Desta forma, fez-se apenas a contagem das partículas para a determinação do tamanho médio da distribuição de menor tamanho, Figura 11a.

Figura 11 - a) Histograma e ajuste gaussiano (vermelho) da distribuição de tamanho das partículas com menor diâmetro. b), c) e d) Micrografia da amostra evidenciando, respectivamente, a distribuição com maior tamanho médio, a com menor tamanho médio e a mistura das duas distribuições.



As duas populações de partículas com diferentes tamanhos poderiam ser separadas por centrifugação ou por outros métodos de separação, como filtração ou diálise. Isto permitiria que os sistemas de partículas obtidos fossem utilizados nas etapas posteriores deste trabalho, compreendendo a modificação de superfície e a funcionalização. Entretanto, a população de partículas com tamanho médio maior não apresentou controle adequado de tamanho e de forma. Como já mencionado anteriormente, as propriedades dos materiais nanoparticulados apresentam forte dependência com estas duas características, sendo que a ausência de um controle rígido sobre a morfologia do material pode levar a diminuição significativa das propriedades de interesse, o que inviabilizaria a aplicação deste. Em contrapartida, a população com tamanho médio de $2,8 \pm 0,6$ nm apresentou controle sobre o tamanho e forma das nanopartículas, sugerindo que o material apresentasse um elevado grau de uniformidade em suas propriedades físicas e químicas, o que possibilitaria que o

material fosse utilizado nas etapas posteriores do trabalho. Contudo, a elevada relação área superficial/volume de nanopartículas muito pequenas faz com que estas apresentem uma reatividade maior e, por consequência, espera-se que possuam maior toxicidade. Ainda não existem dados conclusivos na literatura sobre a dependência da toxicidade do material em função do tamanho de partícula, porém, sabe-se que existe uma estreita relação entre toxicidade, tamanho, forma e composição das nanopartículas.^{73,74}

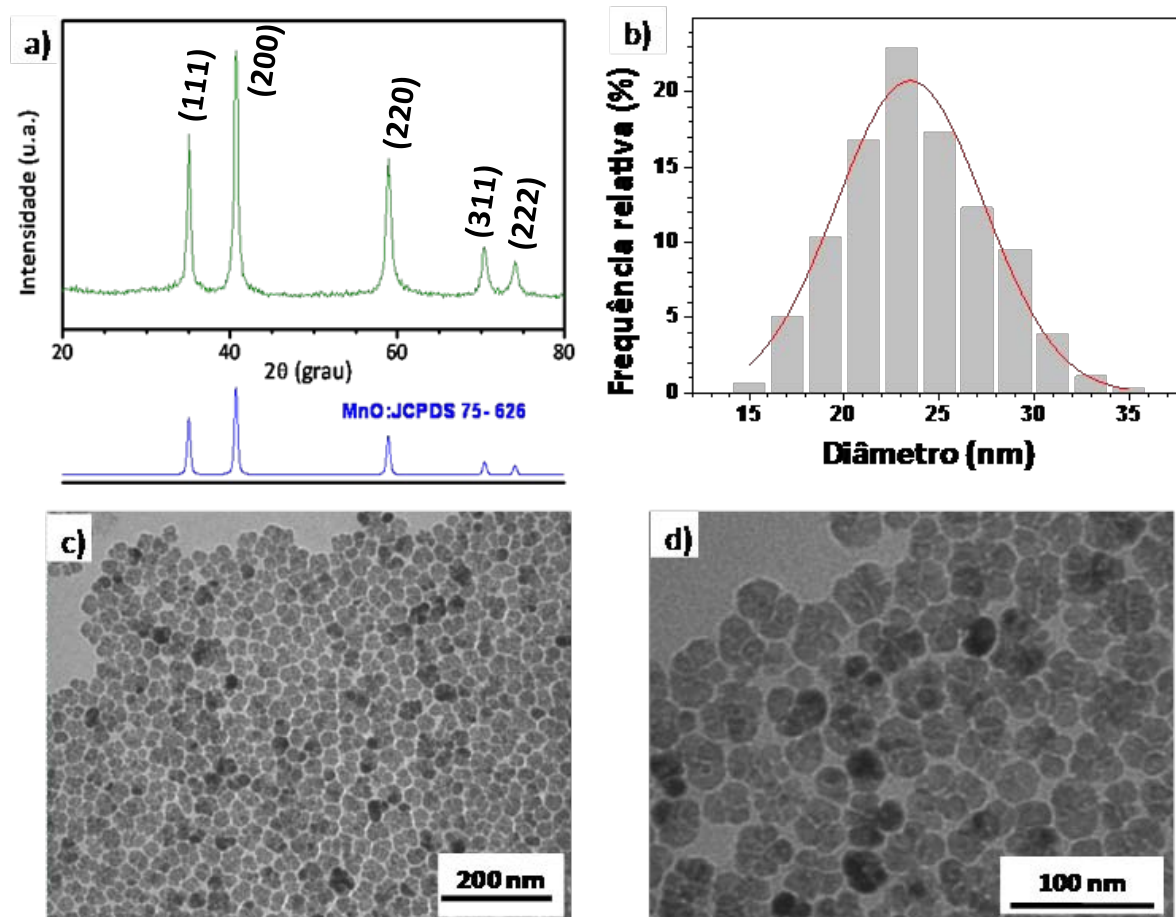
A presença de duas distribuições e o uso de apenas uma destas nas etapas posteriores do trabalho configuraria em perda de quantidades relativamente grandes do material sintetizado, sendo um inconveniente, uma vez que este tipo de perda compromete economicamente a utilização desta rota sintética em uma possível aplicação comercial deste material. Dessa forma, ajustar as condições de síntese para a obtenção de apenas uma distribuição de tamanho era essencial antes que se prosseguisse com as demais etapas do projeto.

A presença de duas distribuições de tamanho no sistema pode ser atribuída a não separação adequada das etapas de nucleação e crescimento no decorrer da síntese. O controle ineficiente sobre a separação destes dois processos possibilitou que núcleos fossem formados simultaneamente ao crescimento das partículas. Na síntese, após a decomposição do precursor, ocorre inicialmente a formação de radicais, que originam o que podem ser denominados de monômeros.⁷⁵ O aumento da concentração destes intermediários chega a uma condição limite, na qual inicia-se o processo de nucleação.⁷⁶ O crescimento das partículas se dá, inicialmente, apenas pela difusão dos monômeros até o núcleo já formado.⁷⁵ Entretanto, outro processo está envolvido na etapa de crescimento. No decorrer da síntese, os núcleos com menor tamanho apresentam uma energia superficial maior e, conseqüentemente, possuem uma quantidade relativamente maior de material adsorvido sobre a superfície. Isto faz com que a difusão de monômeros seja dificultada em relação aos núcleos maiores. Além disso, os núcleos que não atingem um tamanho crítico, tendem a sofrer com o processo de envelhecimento, que é a dissolução deste em detrimento do crescimento dos núcleos maiores.⁵⁵ Nesta etapa de envelhecimento, o que se observa é o aumento da polidispersividade⁵⁵ e, em alguns casos, o surgimento de mais de uma distribuição de tamanho.⁵³

Para separar eficientemente os processos de nucleação e crescimento deve-se promover uma nucleação rápida e homogênea.⁷⁵ Alguns fatores estão diretamente

relacionados à separação destes processos e, desse modo, relacionados ao controle sobre o tamanho e a forma, bem como à distribuição de tamanho das nanopartículas. Alterar os parâmetros de reação, tais como taxa de aquecimento, temperatura de refluxo e tempo de reação, é uma forma de conseguir sintetizar nanopartículas com alto controle morfológico. A taxa de aquecimento, ao qual o sistema é submetido, pode favorecer uma nucleação rápida e homogênea durante a síntese, sendo ideal realizar o aquecimento lento do meio reacional, taxa inferiores a 5 °C/min.^{54,57} O tempo de reação e a temperatura de refluxo possuem maior relação com o processo de crescimento das partículas, sendo que o aumento do tempo de reação ou da temperatura tende a levar a formação de partículas maiores.^{12,53,56} Assim, uma alternativa encontrada para a obtenção de nanopartículas de MnO com apenas uma distribuição de tamanho foi alterar os parâmetros de reação. Inicialmente optou-se por realizar a síntese com apenas uma temperatura de refluxo, no caso 220 °C, e aumentar o tempo de reação nesta temperatura. As modificações no método de síntese, como esperado, levaram a formação de nanopartículas de MnO com a mesma estrutura cristalográfica anteriormente observada, Figura 12a, sendo modificadas apenas as características morfológicas do material obtido. A análise por MET, Figura 12c e 12d, permitiu observar a presença de apenas uma distribuição de tamanho, contendo partículas de $21 \pm 3,9$ nm, tamanho médio este determinado a partir do ajuste gaussiano sobre o histograma apresentado na Figura 12b.

Figura 12 - a) Difratograma de raios X da amostra sintetizada modificando-se o tempo de reação e a temperatura de refluxo. b) Histograma e ajuste gaussiano (vermelho) da distribuição de tamanho das partículas. c) e d) Micrografias da amostra mostrando a presença de apenas uma distribuição de tamanho.

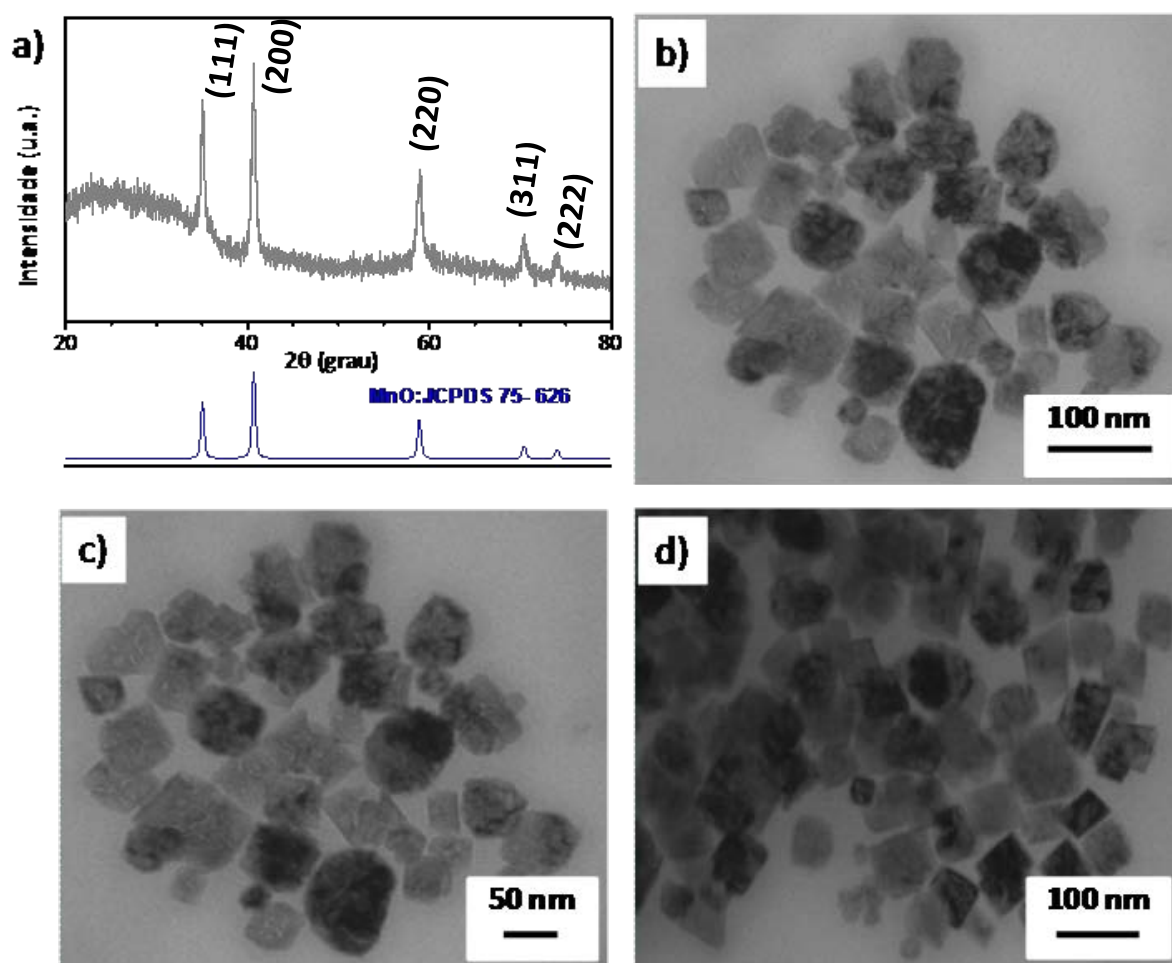


A presença de uma distribuição de tamanho pode ser atribuída, principalmente, a manutenção do sistema em refluxo em apenas uma temperatura. A diferença nos resultados para as duas rotas de síntese sugere que, na primeira, a elevação da temperatura até 300 °C estava provocando uma nucleação secundária, o que acarretou na presença de duas distribuições de tamanho. Por outro lado, o aumento do tempo de reação no segundo método de síntese, de trinta minutos para três horas, ocasionou em um aumento do tamanho médio de partícula, mas mantendo-se controle sobre a forma das partículas. Em suma, as modificações feitas obtiveram sucesso na obtenção de nanopartículas de MnO com controle sobre a morfologia e com apenas uma distribuição de tamanho.

Outra alternativa estudada para a obtenção do material com as características desejadas foi a substituição do precursor $\text{Mn}(\text{acac})_2$ pelo oleato de manganês (II). Escolheu-se o precursor oleato por ser um dos precursores mais utilizados em síntese via

decomposição térmica.^{52-54,57,75} Nesta síntese, a temperatura de refluxo foi modificada de 220 °C para 260°C, isto porque a decomposição do oleato de manganês (II) se inicia em temperaturas pouco superiores à 250 °C.⁵⁴ O tempo de reação para esta síntese foi de trinta minutos. No decorrer desta síntese apenas foi observada alteração de cor no meio reacional quando a temperatura estava próxima a 260 °C, sendo que esta alteração pode ser atribuída ao início da decomposição do precursor. Da mesma forma que na síntese a partir do $Mn(acac)_2$, a coloração da solução passou de amarelada para verde opalescente, sugerindo que as partículas formadas no meio eram de MnO. A caracterização por DRX da amostra sintetizada, Figura 13a, permitiu determinar a estrutura cristalina do material obtido, sendo este o MnO com estrutura do tipo sal-gema.

Figura 13 - a) Difratoograma da amostra sintetizada a partir do precursor oleato de manganês (II). b), c) e d) Micrografias da amostra evidenciando as características morfológicas obtidas.



Apesar do sucesso da síntese na obtenção da fase MnO com estrutura tipicamente antiferromagnética, a análise por MET, Figuras 13b, 13c e 13d, mostrou que o controle sobre

a morfologia das nanopartículas não foi tão eficiente quando na síntese a partir do $\text{Mn}(\text{acac})_2$. O controle inadequado sobre a morfologia das nanopartículas pode ser atribuído a natureza e reatividade do precursor utilizado. Lynch e colaboradores⁵⁷ discutiram a influência do tratamento do precursor oleato com pressões reduzidas, da ordem de 10^{-2} torr, sugerindo que a presença de moléculas de solvente, provenientes da síntese do oleato, pode influenciar na decomposição deste. Além disso, o oleato deve passar por um processo de envelhecimento, o qual possibilitaria que ocorresse uma organização maior das moléculas de oleato no material obtido e, conseqüentemente, resultasse num precursor com maior grau de uniformidade.⁵⁷

Como as nanopartículas de MnO obtidas pelas modificações pela síntese a partir do $\text{Mn}(\text{acac})_2$ já apresentavam características morfológicas adequadas para o prosseguimento do trabalho, optou-se pelo seu emprego nas etapas de modificação de superfície e de funcionalização.

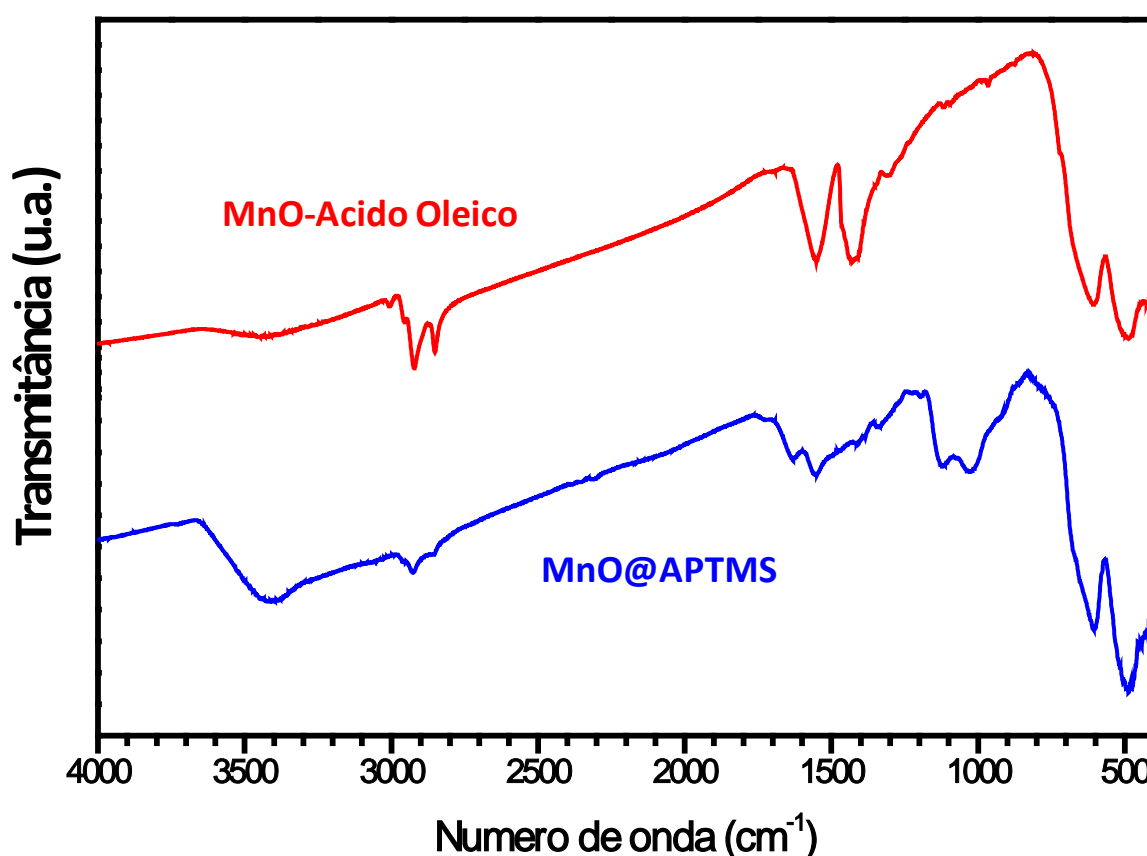
4.2 MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE

As nanopartículas sintetizadas possuem ácido oleico adsorvido sobre a superfície, apresentando o grupo carboxílico coordenado sobre os átomos de manganês, enquanto que a cadeia carbônica fica exposta, conferindo às partículas dispersibilidade apenas em solventes com baixa polaridade ou apolares. Como se objetiva uma potencial aplicação deste material em biomedicina é necessário que este apresente, dentre outras características, estabilidade coloidal em condições fisiológicas. A substituição do ácido oleico por outro ligante de superfície possibilitaria que as partículas apresentassem dispersibilidade em fase aquosa, bem como permitiria a funcionalização do material para conferir a este biocompatibilidade. Desse modo, escolheu-se o APTMS como agente de superfície em substituição ao ácido oleico, sendo que o método utilizado para a reação foi adaptado do proposto por De Palma e colaboradores.⁶⁶

Por essa metodologia, segundo os autores, era esperado que ocorresse a precipitação do material conforme ocorresse a substituição do ácido oleico por APTMS. Entretanto, após as 120 horas de reação, foi observada a formação de apenas uma pequena

quantidade de precipitado, sendo que grande parte do material permaneceu disperso na solvente apolar, no caso hexano. O precipitado foi separado, lavado, caracterizado por FTIR e comparado com o espectro das nanopartículas assim que sintetizadas, Figura 14. É possível observar no espectro das nanopartículas como sintetizadas bandas em 2921 cm^{-1} e 2851 cm^{-1} , que podem ser atribuídas ao estiramento assimétrico e simétrico, respectivamente, dos grupos CH_2 presentes no ácido oleico.^{77,78} As bandas em 1550 cm^{-1} e 1430 cm^{-1} são referentes ao estiramento assimétrico e simétrico, respectivamente, do grupo carboxilato adsorvido sobre a superfície das nanopartículas.⁷⁷

Figura 14 - Espectro de FTIR das amostra de MnO como sintetizadas (em vermelho) e após a etapa de modificação de superfície (em azul).

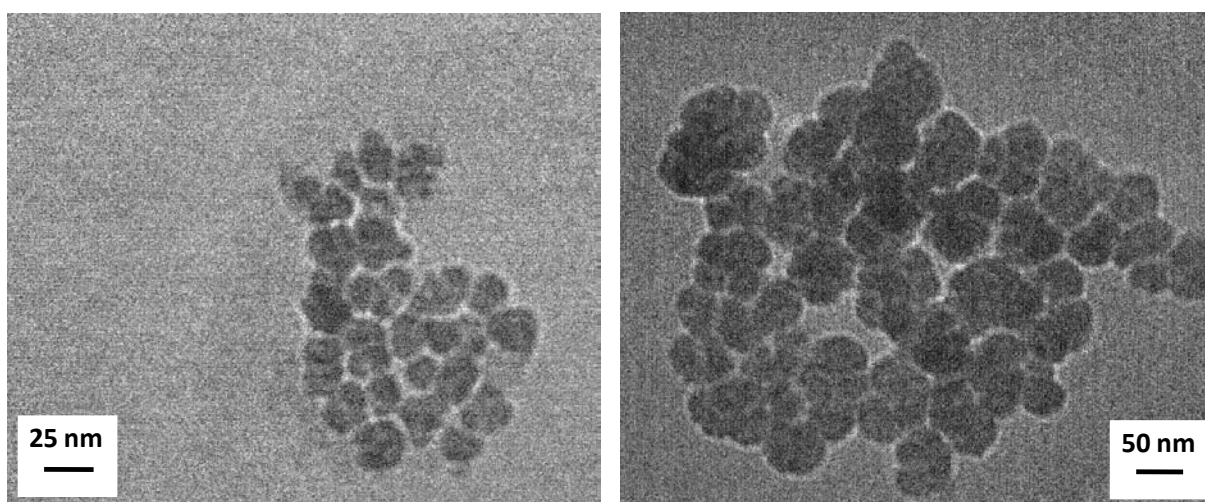


Em ambos os espectros da Figura 14, pode-se observar bandas que são atribuídas a ligação Mn-O, em 605 cm^{-1} e 487 cm^{-1} . No espectro das partículas modificadas com APTMS é possível verificar a presença de bandas referentes à condensação dos grupos silano sobre a superfície das nanopartículas, identificadas pelas bandas em 1123 cm^{-1} e 1028 cm^{-1} em decorrência da ligação Si-O.^{68,79} Ainda é possível observar a presença das bandas referentes ao estiramento da ligação N-H, em 3390 cm^{-1} , e às deformações angulares do grupo $-\text{NH}_2$,

em 1630 cm^{-1} e em 1553 cm^{-1} , o que sugere a presença de grupos amina livre sobre a superfície das nanopartículas.⁷⁹ Comparando-se os dois espectros, nota-se a diminuição relativa da intensidade da banda referente ao estiramento das ligações C—H em grupos CH_2 , em 2922 cm^{-1} e 2853 cm^{-1} , o que corrobora a hipótese de que ocorreu a substituição do ácido oleico pelo APTMS, haja visto que o ácido oleico apresenta um maior número de grupos CH_2 que o APTMS.

Apesar da caracterização por FTIR sugerir fortemente que ocorreu a substituição do ácido oleico por APTMS, a presença da banda referente à ligação Si-O também poderia ser atribuída a policondensação dos grupos silanos, que acarretaria na formação de sílica no meio reacional. Assim, a análise por MET, figura 15, permitiu avaliar se ocorreu ou não a formação de partículas de sílica.

Figura 15 - Micrografia da amostra de nanopartículas de MnO após a modificação de superfície com APTMS

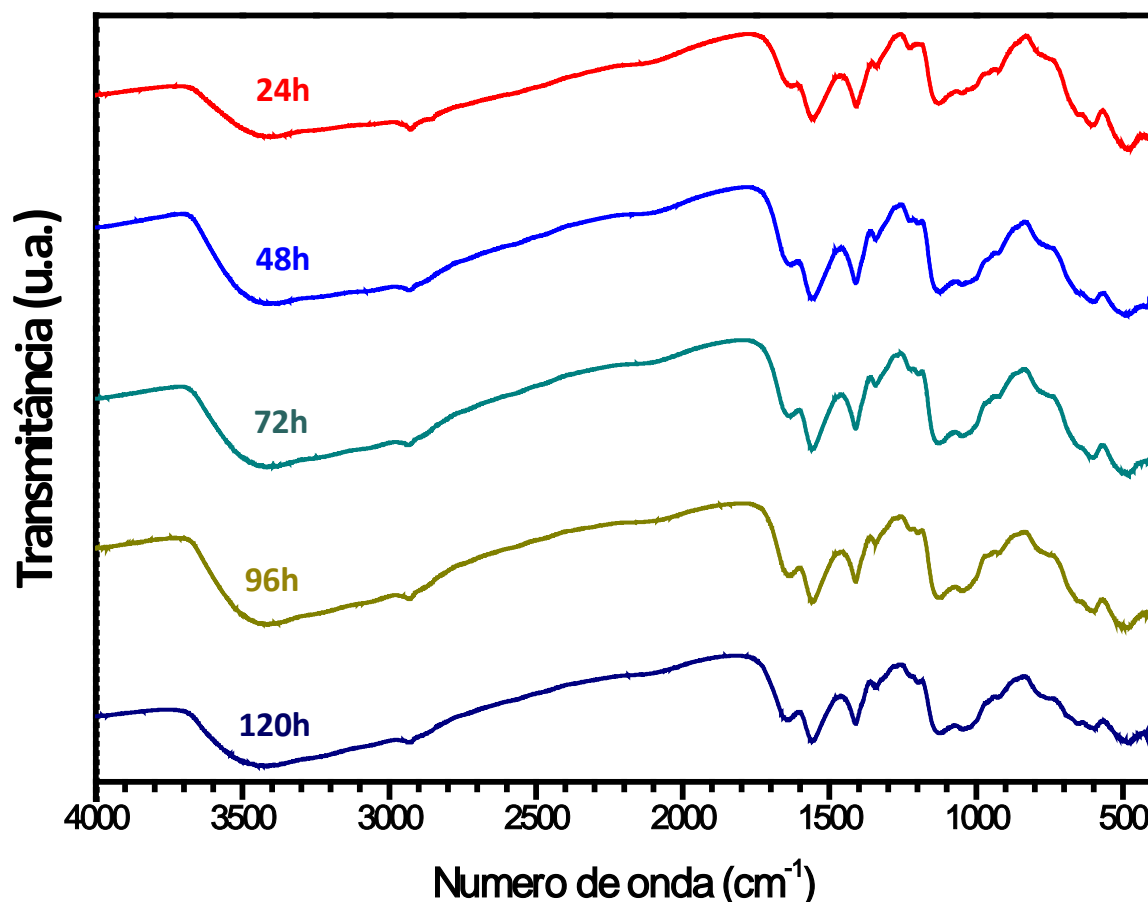


A partir das imagens por MET não foi possível observar a presença de outros tipos de partículas, o que corrobora a proposta de que o APTMS está adsorvido sobre a superfície do material, sem que tenham ocorrido reações de policondensação originando partículas de sílica livres. Pelos resultados em relação à reação de modificação de superfície é possível inferir sucesso na substituição do ácido oleico pelo APTMS. Entretanto, o elevado tempo de reação, 120 horas, e a pequena quantidade de material obtido durante o processo se demonstravam como aspectos negativos do método empregado. Além disso, o material obtido ainda apresentava baixa dispersibilidade em solventes polares, tais como água e etanol, o que poderia dificultar a realização da etapa de funcionalização, que ocorre em meio aquoso.

Diminuir o tempo de reação possibilitaria que se encurtasse o período para a obtenção do produto final desejado, enquanto que aumentar a quantidade de material com superfície modificada permitiria que perdas evitáveis de material ocorressem. Dessa forma, o método utilizado para a modificação de superfície foi adaptado, tendo como principais objetivos a diminuição do tempo de reação e o aumento na quantidade de material obtido ao final do processo. As alterações propostas podem ser resumidas em dobrar o volume utilizado de APTMS, permitindo maior disponibilidade do ligante para promover a modificação da superfície das nanopartículas e, conseqüentemente, também aumentou-se a concentração de ácido acético utilizado, pois este atua como catalisador na reação dos grupos silanos. Para avaliar se as modificações sugeridas apresentariam os resultados esperados, foram realizadas as reações de substituição de ligantes, nas condições supracitadas, variando-se apenas o tempo de reação conforme descrito na Tabela 2.

Em todos os sistemas, após as primeiras cinco horas de reação já se observava a formação de precipitado no fundo do erlenmeyer, o que não ocorreu na primeira reação de substituição de ligantes. Notou-se ainda, que mesmo para o sistema com menor tempo de reação, a formação de uma quantidade significativamente maior de precipitado comparada a reação inicialmente realizada. Como os métodos de lavagem podem acarretar em perda de material e a diferença do grau de recobrimento com APTMS ou ácido oleico em cada sistema poderia levar a diferenças de massas entre as amostras, optou-se por não realizar o cálculo de rendimento em massa para a reação de substituição de ligantes. O material obtido em cada uma das amostras foi caracterizado por espectroscopia FTIR e os resultados da análise são apresentados na Figura 16.

Figura 16 - Espectros de FTIR das amostras de nanopartículas de MnO modificadas com APTMS com diferentes tempos de reação.

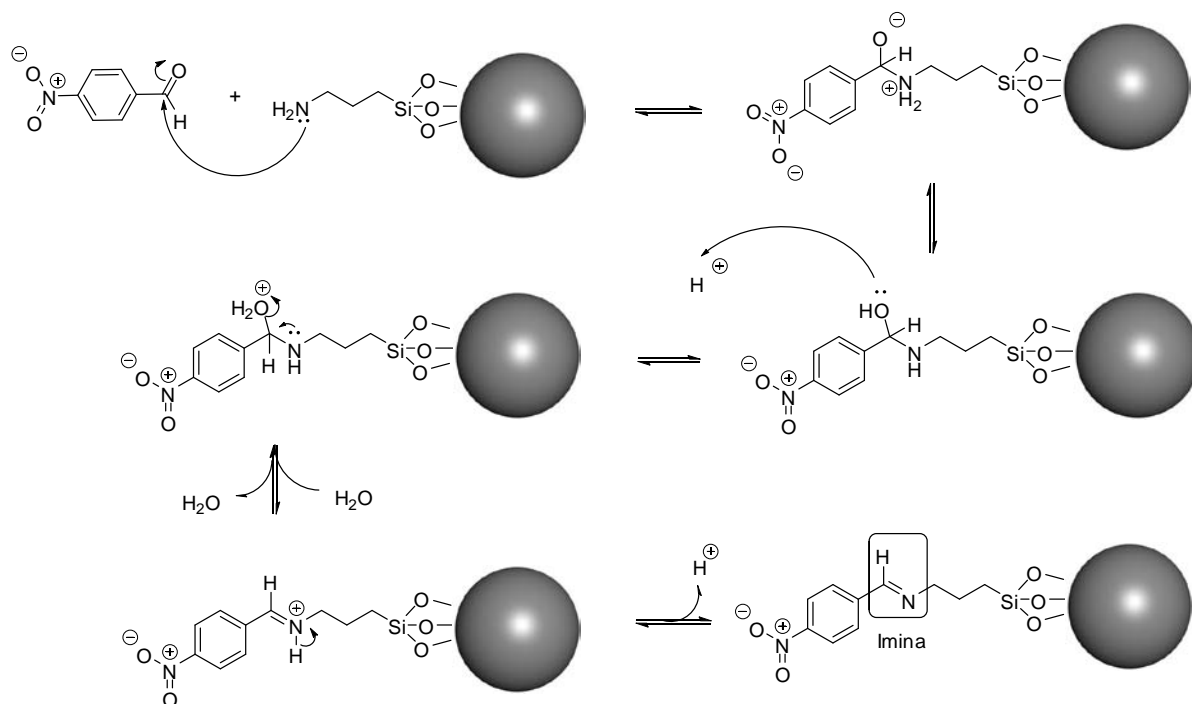


A análise por FTIR mostrou alto grau de similaridade entre os espectros obtidos, sendo que as bandas referentes às ligações Si-O, em 1126 cm⁻¹ e 1020 cm⁻¹, ao estiramento da ligação N-H, em 3390 cm⁻¹, e à deformação angular do grupo NH₂, em 1636 cm⁻¹, demonstram a condensação do APTMS sobre a superfície das nanopartículas. Ademais, em todos os espectros nota-se apenas uma pequena banda referente ao estiramento da ligação C-H de grupos CH₂, sugerindo que a substituição do ácido oleico foi mais eficiente a partir das modificações propostas. O material obtido ainda apresentou maior dispersibilidade em solventes polares, como etanol e água, o que corrobora a hipótese que a substituição do ácido oleico foi mais pronunciada que para a primeira amostra.

Como a técnica de FTIR não é a mais adequada para uma análise quantitativa, para avaliar as diferenças de recobrimento decorrentes da variação no tempo de reação, optou-se por uma determinação indireta da concentração de grupos amina livre sobre a superfície das nanopartículas.⁸⁰ Nesta determinação, a reação entre as aminas livres na superfície do

material e o 4-nitrobenzaldeído leva a formação de uma imina. O mecanismo desta reação é representado na Figura 17.

Figura 17 - Representação esquemática do mecanismo de reação entre o 4-nitrobenzaldeído e as amins livres sobre a superfície das nanopartículas dando origem a uma imina. Adaptado.80

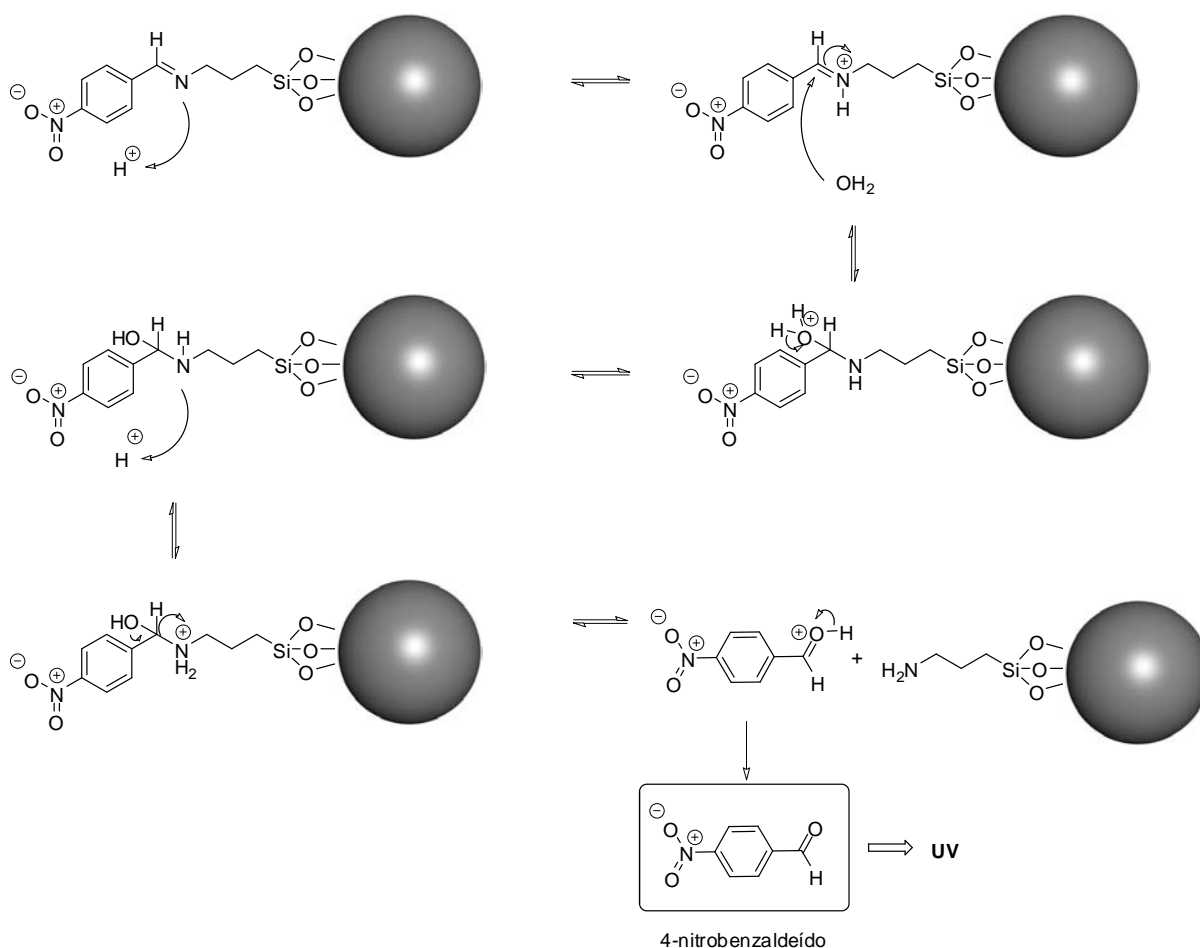


A reação para a formação da ligação de imina é realizada na ausência de água, isto porque as iminas são facilmente hidrolisadas. Aproximadamente 2 mg de cada amostra de nanopartículas, previamente secas sob vácuo, foram dispersas em uma solução $3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de 4-nitrobenzaldeído (0,8% (v/v) de ácido acético glacial) em etanol absoluto. Esta solução foi utilizada para que ocorresse a formação da imina sobre a superfície das nanopartículas, que ocorre pelo ataque nucleofílico do grupo amina sobre a carbonila do aldeído. O meio levemente ácido promove a protonação do intermediário formado e, conseqüentemente, facilita que ocorra a desidratação do mesmo. A separação das nanopartículas da solução foi realizada por centrifugação e foram realizadas lavagens sucessivas do material com uma solução 0,8 (v/v) de ácido acético em etanol absoluto para que se eliminasse o 4-nitrobenzaldeído que não tivesse reagido. A separação do material da solução de lavagem foi realizada por centrifugação.

Como já mencionado, a ligação imina é bastante sensível a presença de água. Desta forma, é a partir da hidrólise da imina que se determina a concentração de 4-nitrobenzaldeído que reagiu inicialmente com os grupos amina terminais do APTMS e,

consequentemente, determina-se a concentração de amina livre sobre a superfície das nanopartículas.⁸⁰ A hidrólise foi realizada pela adição de 1 mL de uma solução 75 mL de etanol, 75 mL de água deionizada e 0,2 mL de ácido acético. O meio reacional levemente ácido, quando na presença de excesso de água, catalisa a reação, o que ocorre pela protonação da imina, promovendo a ativação deste grupo funcional frente ao ataque nucleofílico da água. O excesso de água no meio reacional também é responsável pelo deslocamento do equilíbrio no sentido da reação de hidrólise do grupo imina. Como resultado da reação tem-se a liberação do 4-nitrobenzaldeído para a solução e o grupo amina livre sobre a superfície é restaurado. A reação de hidrólise da imina é representada na Figura 18.

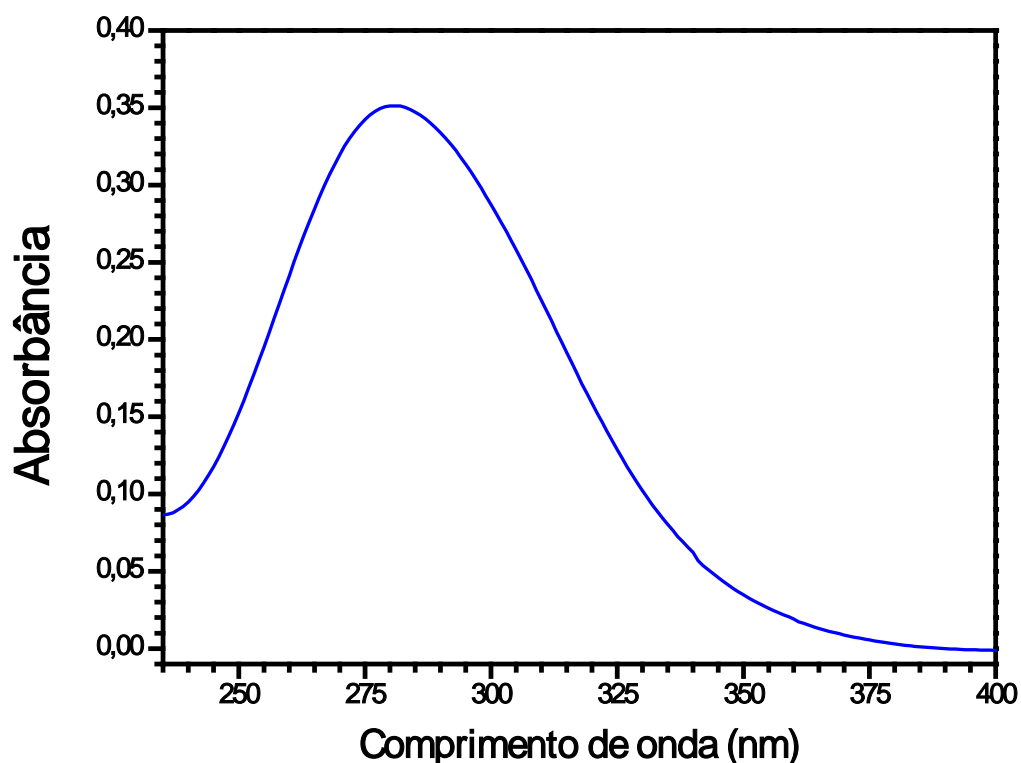
Figura 18 - Representação esquemática do mecanismo de reação de hidrólise da imina sobre a superfície das nanopartículas liberando o 4-nitrobenzaldeído. Adaptado.80



Após a liberação do 4-nitrobenzaldeído, é necessário que as nanopartículas sejam separadas da solução para que a análise seja realizada com o sobrenadante, o que é feito por centrifugação. Entretanto, a alta dispersibilidade das nanopartículas em meio aquoso

dificultava a separação completa das partículas da solução, mesmo quando se utilizava altas velocidades de rotação, como 11000 rpm. A presença de material nanoparticulado na solução inviabilizaria que a concentração de 4-nitrobenzaldeído fosse determinada, uma vez que materiais em escala nanométrica apresentam elevado coeficiente de absorção e, além disso, apresentam espalhamento de luz pronunciado. Assim, para que ocorresse a separação de fases, optou-se pela adição de base, nesse caso uma solução aquosa de NaOH $2,5 \text{ mol.L}^{-1}$, após a reação de hidrólise da imina. A elevação do pH da dispersão levou a floculação das nanopartículas e, conseqüentemente, possibilitou que a solução contendo o 4-nitrobenzaldeído fosse separada por centrifugação. Como o pH da solução de cada amostra foi alterado, foi realizada a análise do espectro de absorção do 4-nitrobenzaldeído nas mesmas condições de pH das soluções das amostras, Figura 19. Isto permitiu observar o deslocamento do máximo da banda de absorção de 267 nm ,⁸⁰ para 281 nm .

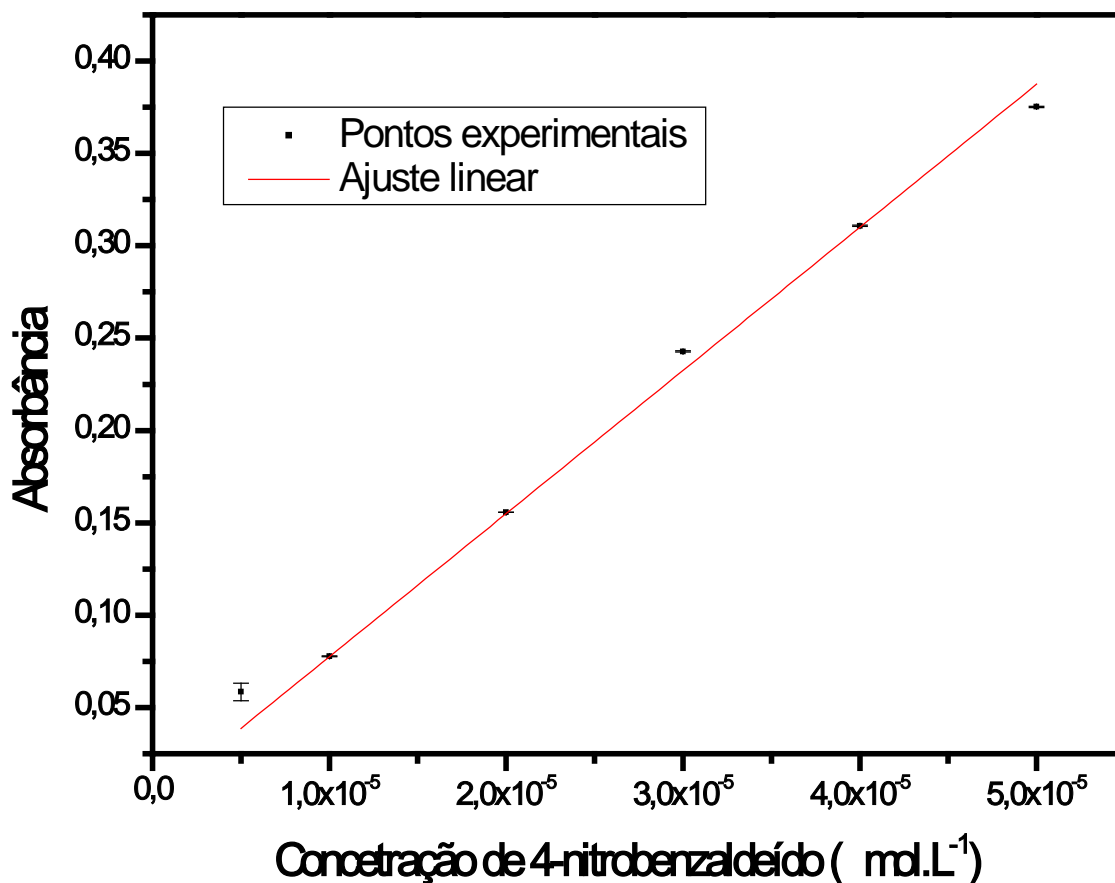
Figura 19 - Espectro de absorção molecular de uma solução padrão $5.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de 4-nitrobenzaldeído em uma mistura etanol/água (1:3 (v/v)) na presença de hidróxido de sódio.



O deslocamento do máximo da absorção no 4-nitrobenzaldeído pode ser explicado pela influência da mudança de pH sobre a estrutura eletrônica do composto e, conseqüentemente, sobre o espectro de absorção do mesmo.⁸¹ A partir da determinação do máximo de absorção, foram realizadas as análises para os padrões com diferentes

concentrações de 4-nitrobenzaldeído, o que permitiu estabelecer a região em que a absorvância apresenta variação linear em função da concentração, respeitando a lei de Beer-Lambert.⁸¹ A Figura 20 mostra a curva de calibração obtida.

Figura 20 - Curva de calibração obtida para concentrações de 4-nitrobenzaldeído variando entre 5.10^{-6} mol.L⁻¹ e 5.10^{-5} mol.L⁻¹ (Absorvância = $7749 \cdot [4\text{-nitrobenzaldeído}]$, $R^2 = 0,99959$)



A regressão linear entre os pontos experimentais permitiu determinar o coeficiente linear da equação de reta, que foi de 7749 ± 3 , ajustando-se para que o intercepto na concentração zero fosse nulo. O coeficiente de correlação linear (R^2) para a equação de reta obtida foi de 0,99959, o que caracteriza um bom ajuste da equação de reta com os valores experimentais. A partir destas informações sobre o ajuste linear foi possível determinar a concentração de 4-nitrobenzaldeído liberado na hidrólise de cada amostra e, dessa forma, determinar a concentração de amina livre por miligrama amostra, Tabela 3.

Tabela 2 - Concentração de amina livre sobre a superfície das nanopartículas em função do tempo de reação

Amostra	Concentração de amina livre (mol.mg ⁻¹)	Tempo de reação (horas)
S-06	1,93.10 ⁻⁷	24
S-07	1,64.10 ⁻⁷	48
S-03	1,70.10 ⁻⁷	72
S-08	2,01.10 ⁻⁷	96
S-05	1,52.10 ⁻⁷	120

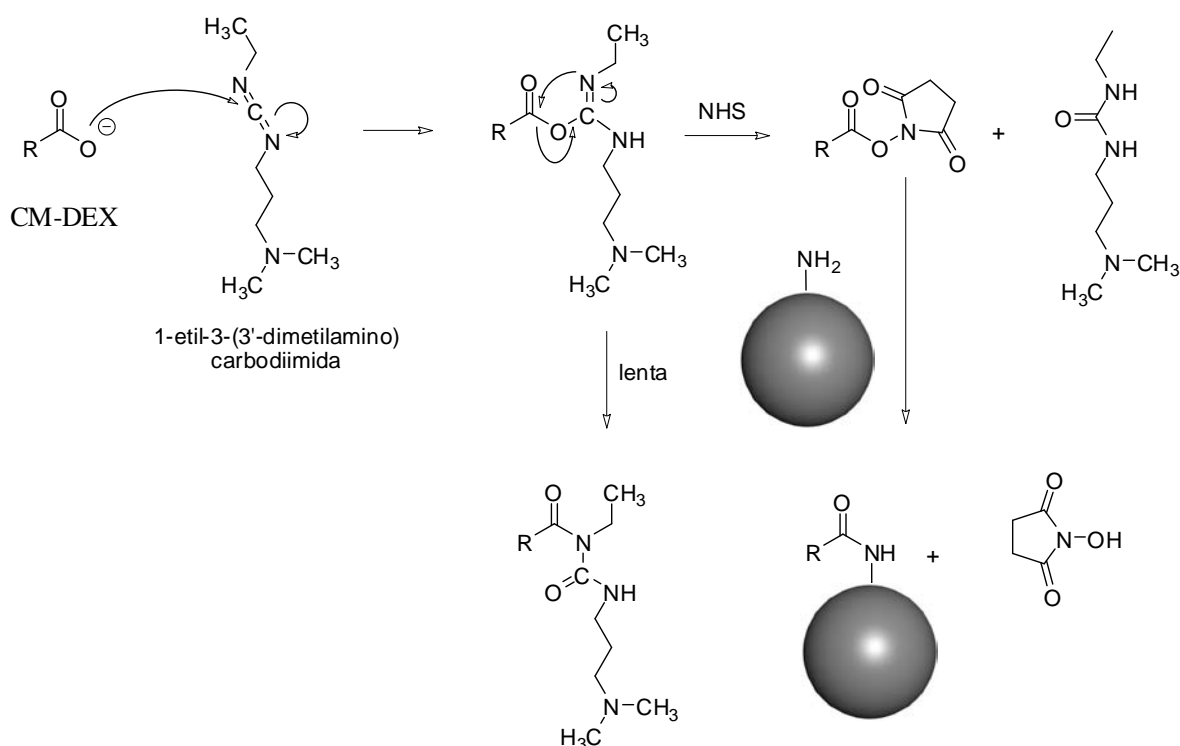
A variação na concentração de amina livre sobre a superfície das nanopartículas não apresentou uma relação direta com a variação no tempo da reação de substituição de ligantes. Este resultado, juntamente com a análise por FTIR, sugere que a diferença entre o grau de recobrimento das amostras não é significativo. Evidentemente, a análise de outros parâmetros da reação de modificação de superfície e uso de outras técnicas de caracterização, como a análise elementar, bem como a realização de amostras com tempos menores de reação, permitiria uma melhor avaliação sobre a eficiência do recobrimento das partículas por APTMS. Entretanto, o material já apresentava características suficientes para o prosseguimento com a etapa de funcionalização e este estudo fugiria ao escopo do trabalho proposto.

4.3 FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A etapa de funcionalização do material obtido foi realizada pela ligação entre o grupo carboxilato da CMDex com as aminas livres sobre a superfície das nanopartículas modificadas com APTMS. A reação de ligação entre estes dois grupos funcionais ocorre dando origem a uma amida por meio de uma ligação do tipo peptídica.⁸² Utiliza-se uma carbodiimida, no caso o cloridrato 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (CEDC), para que ocorra a reação com o grupo carboxílico do biopolímero (CMDex). O produto desta

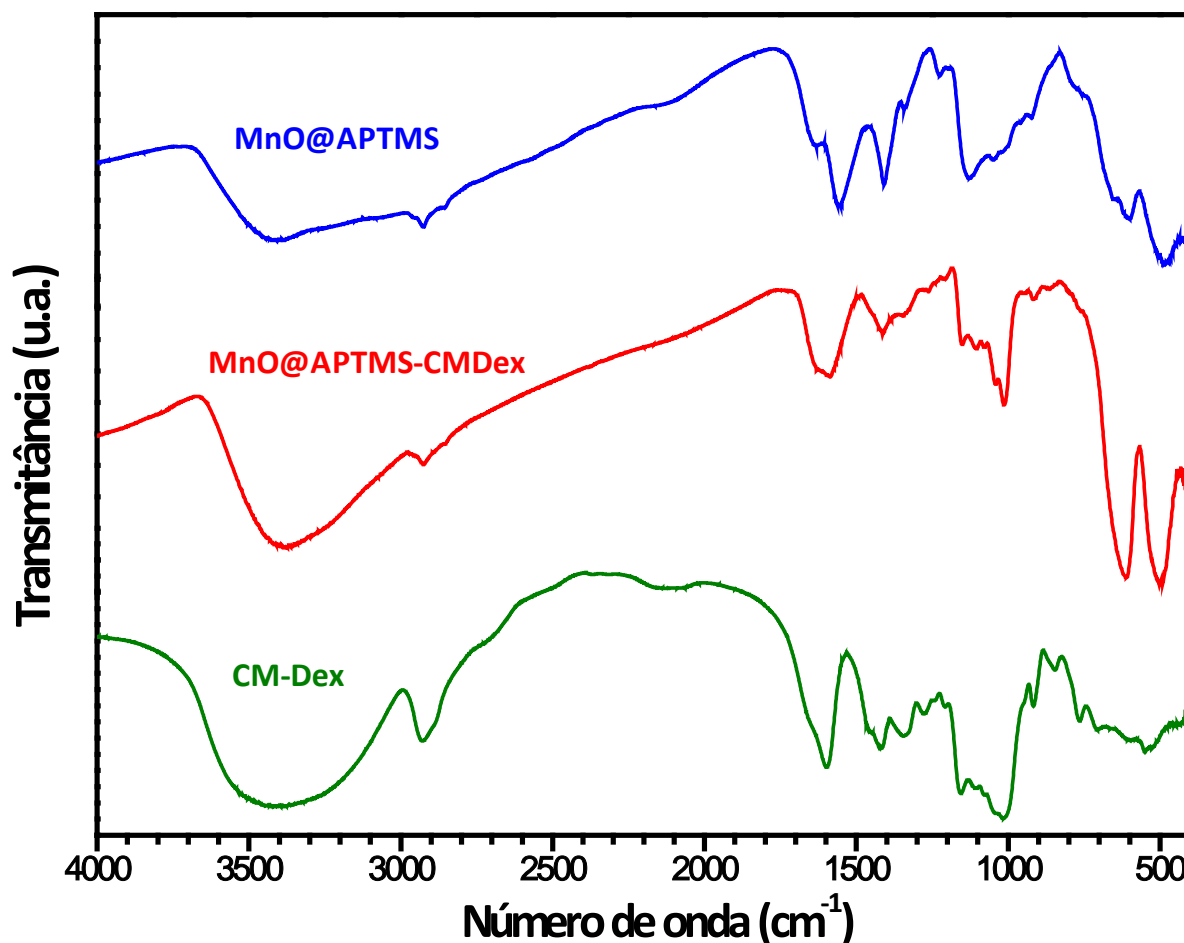
reação pode sofrer um rearranjo, levando a formação de uma espécie não reativa. Para evitar esta reação indesejada, adicionou-se a N-hidroxissuccinimida (NHS), que reage com o intermediário formado e leva a formação de uma espécie reativa frente ao ataque nucleofílico dos grupos amina livre sobre a superfície das nanopartículas. O mecanismo para a reação de formação da ligação peptídica é ilustrado na Figura 21.

Figura 21 - Representação esquemática do mecanismo de reação entre os grupos amina livre sobre a superfície das nanopartículas e o grupo carboxilato da CMDex. Adaptado.80



O excesso dos reagentes utilizados bem como os subprodutos da reação foram separados das nanopartículas por centrifugação em uma mistura etanol/água. O material obtido após a etapa de recobrimento com CMDex foi seco em estufa a vácuo a temperatura de 40 °C por 48 horas para que o solvente evaporasse. Realizou-se a caracterização do material por FTIR para que se observasse a formação da ligação amida, o que comprovaria a reação dos grupamentos amins na superfície das nanopartículas com o grupo carboxilato da CMDex, Figura 22.

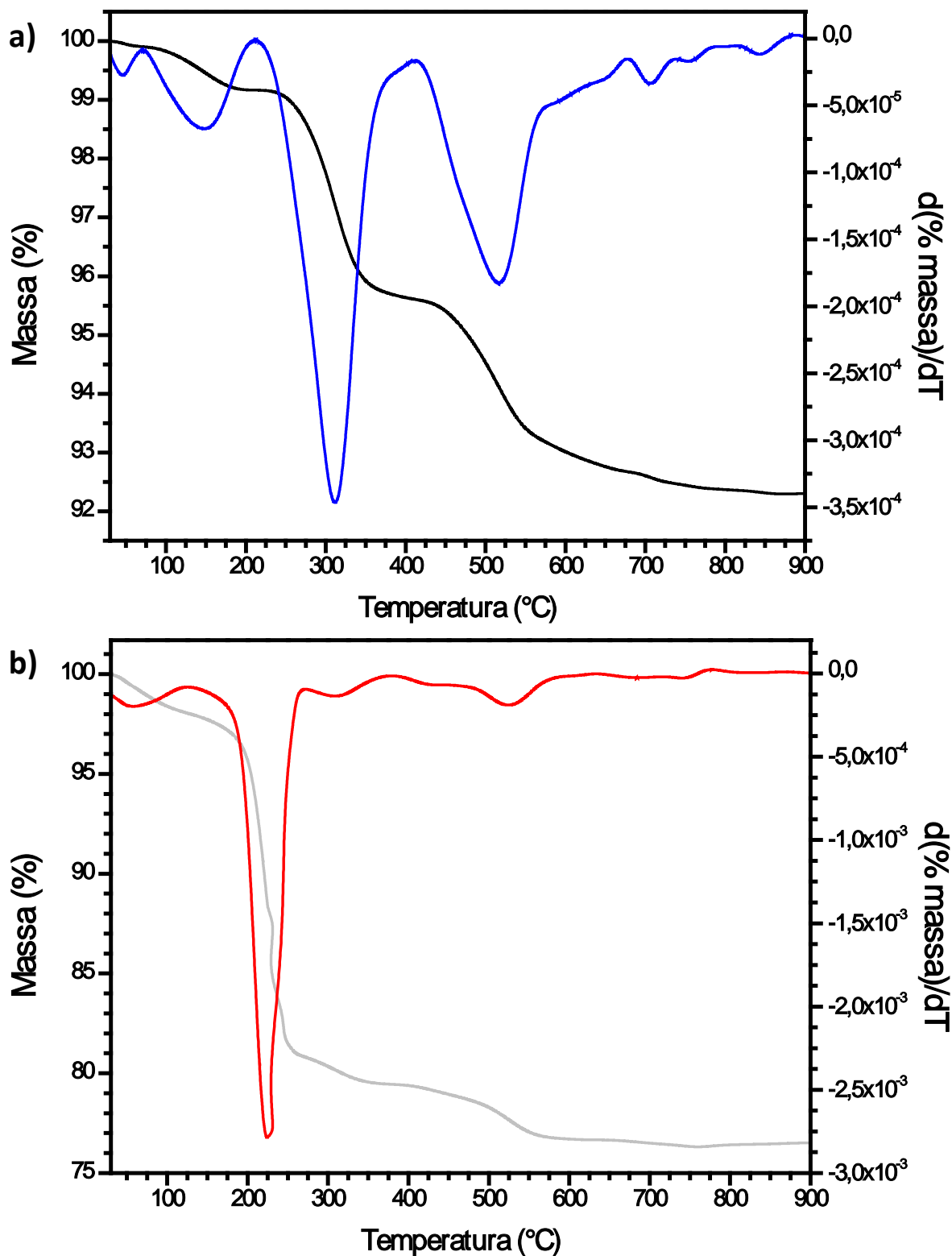
Figura 22 - Espectro FTIR da CMDex pura (em verde) e das amostras modificadas com APTMS (em azul) e recobertas com CMDex (em vermelho).



Observou-se no espectro FTIR da amostra de nanopartículas de MnO recobertas com CMDex a presença de uma banda em 1635 cm^{-1} , a qual pode ser atribuída ao estiramento de grupos C=O de amidas secundárias.⁷⁷ Também foram observadas as bandas centradas em 1415 cm^{-1} , em 1014 cm^{-1} e em 917 cm^{-1} referentes, respectivamente, ao estiramento da ligação C-N de amidas, aos modos de vibração de grupos C-O-C e à deformação angular no anel alfa-glicopirranose.^{68,79,83} Comparando-se com o espectro das nanopartículas modificadas com APTMS, notou-se o alargamento e a intensificação da banda centrada em 3390 cm^{-1} , o que é decorrente da presença de grupos hidroxila da CMDex sobre as nanopartículas recobertas. Foram observadas, também as bandas referentes aos modos vibracionais da ligação C-N-H e ao estiramento assimétrico da ligação C-N-C de amidas secundárias, respectivamente, em 1585 cm^{-1} e 1151 cm^{-1} .^{77,83} Com o intuito de complementar as observações realizadas a partir dos espectros FTIR foi realizada a análise

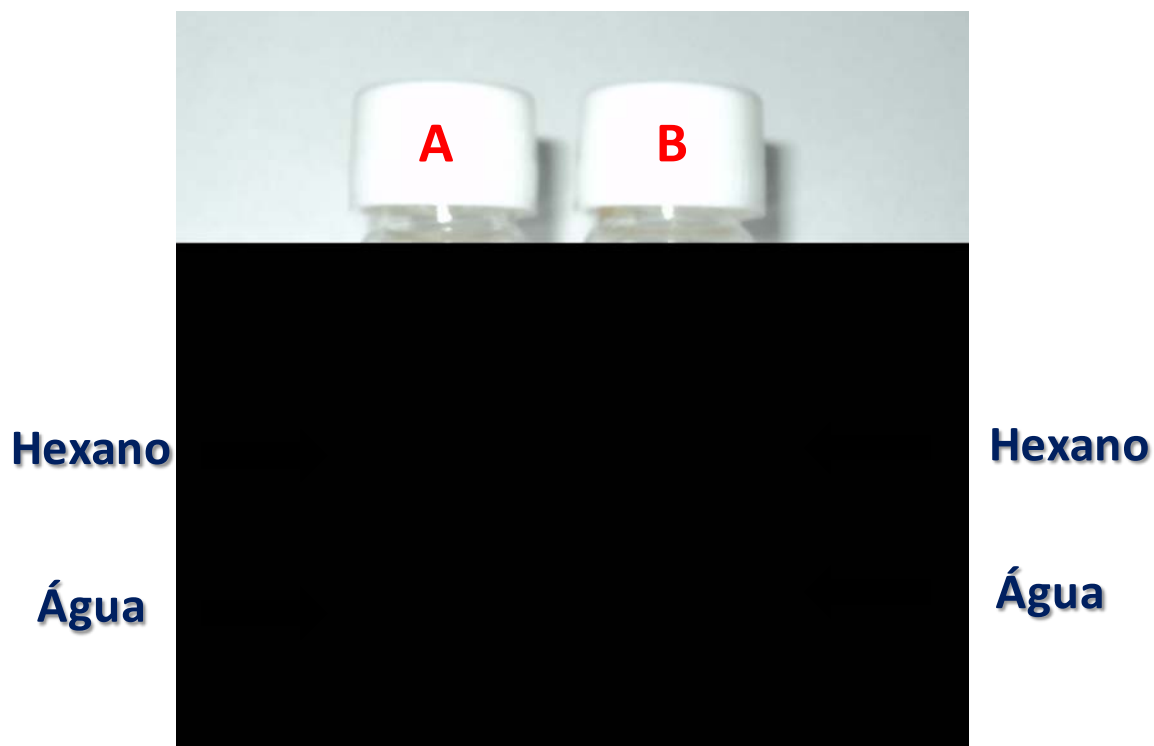
termogravimétrica das nanopartículas de MnO antes e após o recobrimento com CMDex, Figura 23.

Figura 23 - a) Análise termogravimétrica (em preto) e análise termogravimétrica diferencial (em azul) das nanopartículas de MnO modificadas com APTMS. b) Análise termogravimétrica (cinza) e análise termogravimétrica diferencial (vermelho) das nanopartículas de MnO funcionalizadas com CMDex.



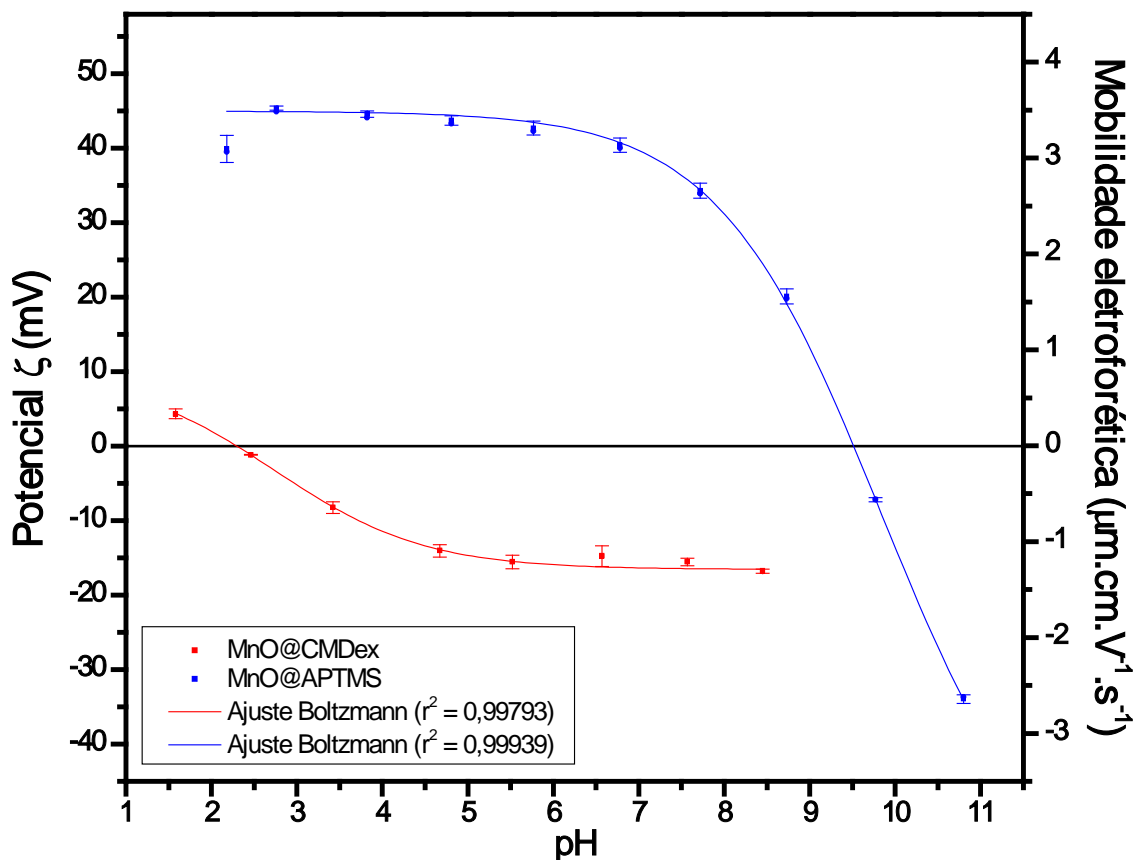
A análise termogravimétrica permitiu observar uma perda significativa de massa da amostra recoberta com CMDex entre 190 °C e 265 °C, a qual é atribuída a degradação do biopolímero.⁸⁴ A perda de massa observada entre 215 °C e 400°C na amostra de nanopartículas modificadas com APTMS também pode ser observada na amostra recoberta com CMDex, sendo esta perda atribuída a decomposição do grupo aminopropil da cadeia do APTMS.⁸⁵ Em ambas as amostras foi observada a perda de aproximadamente 2,8% de massa entre 400 °C e 600 °C, a qual é resultado da degradação de grupos O-H de silanos.⁸⁵ A presença de grupos O-H nas amostras é atribuída a hidrólise dos grupos alcossilanos que não tenham sofrido condensação.⁸⁶ A partir da massa residual ao final do processo de degradação térmica pode-se calcular de forma aproximada a concentração de MnO por miligrama de material após o recobrimento com CMDex. Assim, para determinar a concentração de nanopartículas a ser utilizada nas análises de mobilidade eletroforética para avaliar o potencial de superfície (potencial zeta, ζ) e de espalhamento de luz, normalizou-se a concentração de partículas pela massa de MnO obtida pela análise termogravimétrica. As nanopartículas de MnO recobertas com CMDex foram dispersas em água deionizada, sendo que foi possível obter dispersões estáveis com concentrações de nanopartículas superiores a 1 mg.mL⁻¹. A Figura 24 mostra as nanopartículas assim que sintetizadas dispersas em hexano e as nanopartículas recobertas com CMDex dispersas em água deionizada.

Figura 24 - Fotografia da amostra das nanopartículas assim que sintetizadas dispersas em hexano (frasco A) e da amostra das nanopartículas após a etapa de funcionalização com CMDex dispersas em água deionizada (frasco B).



Foram realizadas as análises de mobilidade eletroforética em função do pH da dispersão utilizando-se dispersões com concentração de 1 mg.mL^{-1} de nanopartículas. As análises de mobilidade eletroforética foram feitas com as nanopartículas modificadas com APTMS e após o recobrimento com CMDex para que se observa-se as mudanças no ponto isoelétrico decorrentes das modificações de superfície realizadas, Figura 25.

Figura 25 - Potencial ζ e mobilidade eletroforética em função do pH das dispersões de nanopartículas modificadas com APTMS (em azul) e recobertas com CMDex (em vermelho).



O potencial zeta (ζ) está relacionado com a mobilidade eletroforética pela via equação de Henry (Equação XVI), onde U_E é a mobilidade eletroforética, ζ o potencial zeta, ε é a constante dielétrica da amostra, η é a viscosidade do solvente e $f(\kappa a)$ é a função de Henry:⁸⁷

$$U_E = \frac{2\varepsilon\zeta f(\kappa a)}{3\eta} \quad (\text{XVI})$$

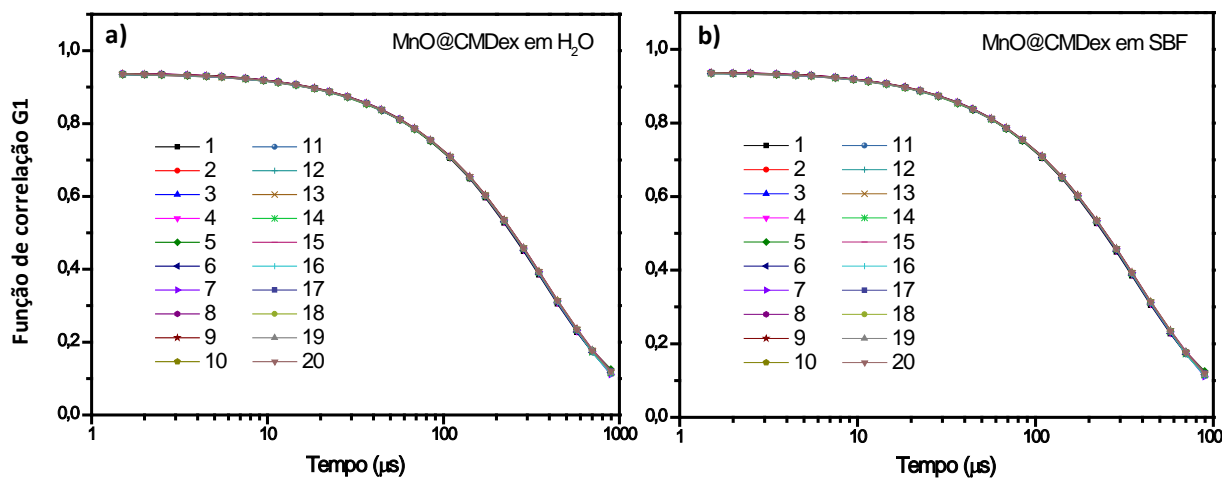
As unidades de κ são comprimento recíproco e $1/\kappa$ é a espessura da dupla camada elétrica (ou comprimento de Debye). Na função de Henry, a é o raio da partícula e κa relaciona o raio da partícula com a espessura da dupla camada. Para partículas em meios polares o valor máximo de $f(\kappa a)$ é 1,5 (aproximação de Smoluchowski) e para meios apolares o valor máximo de é 1 (aproximação de Hückel).

O pH do ponto isoelétrico (pH_{pie}) da amostra de nanopartículas modificadas com APTMS foi de 9,5, o qual é relativamente próximo ao determinado para nanopartículas de magnetita modificadas com este mesmo silano, conforme relatado na literatura, $\text{pH}_{\text{pie}} =$

9,8.⁸³ O elevado valor de pH_{pie} dessa amostra é decorrente da presença dos grupos amina livre sobre a superfície das nanopartículas, os quais encontram-se protonados abaixo do pH_{pie} e conferem as partículas uma carga de superfície positiva. O recobrimento com CMDex diminui drasticamente a concentração de grupos amina livre sobre a superfície do material, haja visto que o grupo carboxilato reage com o grupo amina dando origem a uma ligação do tipo peptídica. O pH_{pie} da amostra recoberta com CMDex foi 2,3, demonstrando grande concordância com o pH_{pie} de nanopartículas de magnetita recobertas CMDex encontrado na literatura, $pH_{pie} = 2,3$,⁸³ o que permitiu inferir o sucesso do método utilizado para a reação entre as aminas sobre a superfície das nanopartículas e o biopolímero, corroborando os resultados observados pelas análises por FTIR. Além disso, pode-se observar que as nanopartículas apresentam estabilidade em uma ampla faixa de pH, o que permitiria sua aplicação em condições fisiológicas, pH próximo a 7.

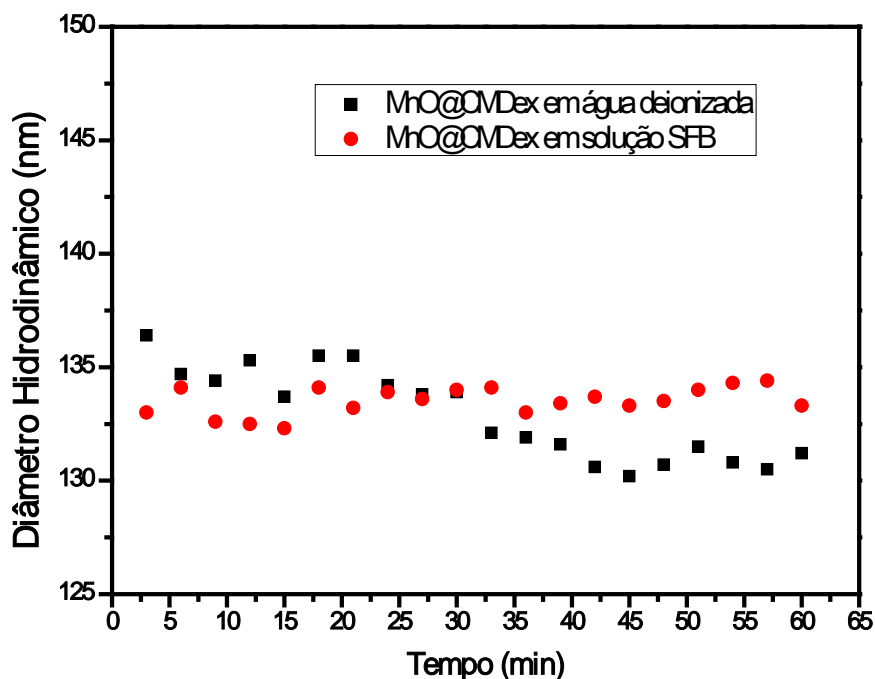
As nanopartículas de MnO recobertas com CMDex também foram caracterizadas por espalhamento de luz dinâmico para que fosse determinado o seu diâmetro hidrodinâmico. As análises foram realizadas utilizando-se dispersões do material em SBF e em água deionizada. Optou-se pela realização das análises em solução SBF para que se conhecesse o comportamento do material em condições que mimetizassem as fisiológicas, sendo utilizadas concentrações que variaram entre $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ a $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, faixa de concentração esta próxima a da utilizada nos testes de nanotoxicidade. As medidas de diâmetro hidrodinâmico também foram realizadas em uma dispersão das nanopartículas em água deionizada com concentração $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para que se pudesse comparar a estabilidade do material em diferentes condições. A Figura 26 mostra a função de correlação da intensidade de luz espalhada pelas partículas para cada análise realizada.

Figura 26 - Função de correlação obtida para cada análise em função do tempo de cada medida para a dispersão das nanopartículas a) em água e b) em solução SBF.



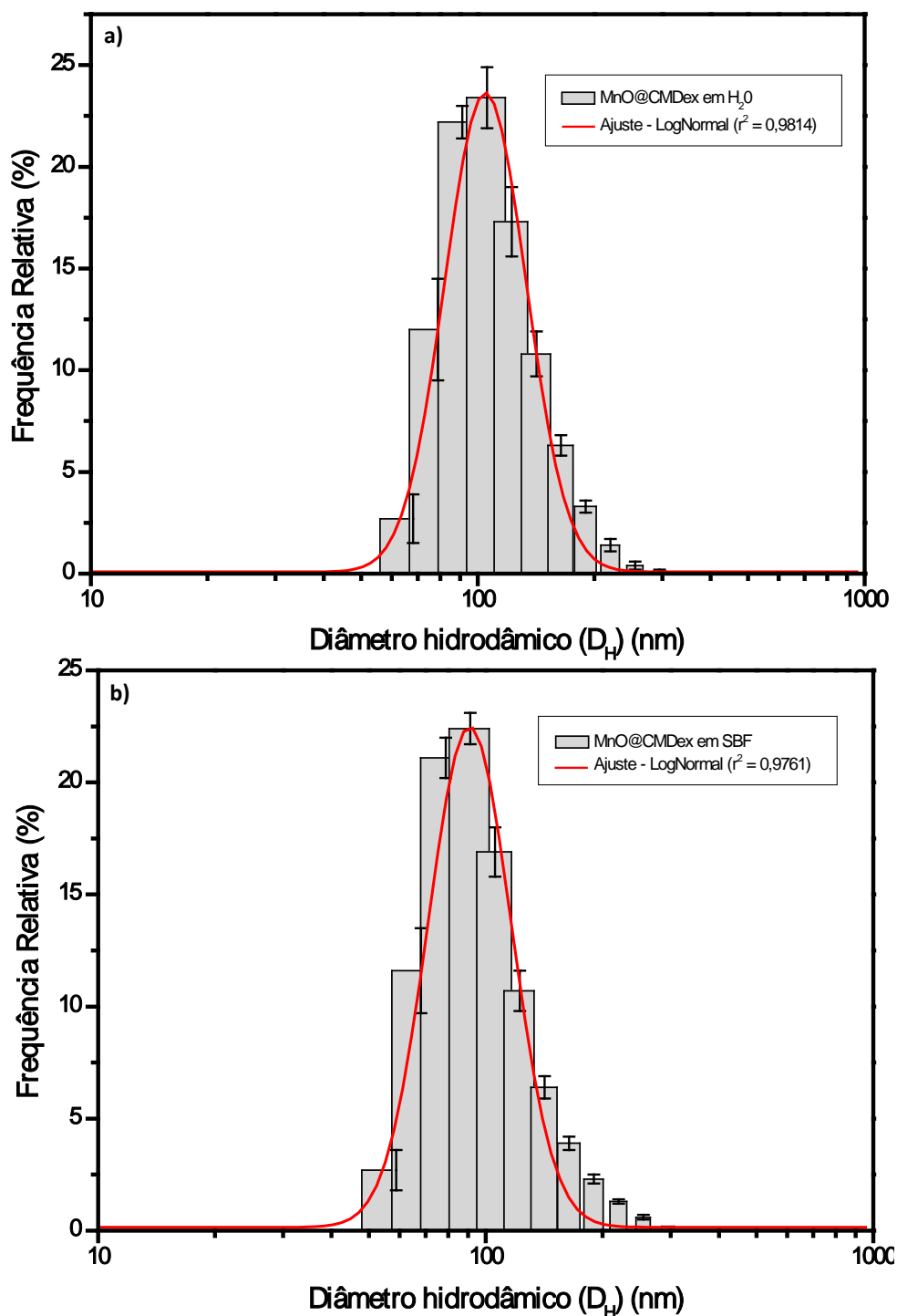
A qualidade das análises realizadas está diretamente relacionada à similaridade apresentada na função de correlação,⁸⁸ como pode ser observado pela superposição das curvas obtidas para a função de correlação em cada tempo de análise. A partir da função de correlação determina-se a constante de decaimento da função, a qual está relacionada ao movimento Browniano das partículas na dispersão e, conseqüentemente, à difusividade das partículas no meio. Utilizando-se a equação de Stokes-Einstein determina-se a distribuição de diâmetro hidrodinâmico da dispersão.^{87,88} A Figura 27 mostra o diâmetro hidrodinâmico médio obtido para cada análise em função do tempo.

Figura 27 - Diâmetro hidrodinâmico médio obtido para as dispersões 50 µg.mL⁻¹ em água deionizada e em solução SBF.



Para cada medida realizada obteve-se uma distribuição de diâmetro hidrodinâmico para cada amostra, a média entre as vinte medidas feitas permite a obtenção da distribuição de tamanho considerando todo o tempo de análise, Figura 28. Em ambas as distribuições de tamanho obtidas o melhor ajuste foi uma função lognormal, sendo que se obteve nos dois casos coeficiente de correlação (r^2) superior a 0,97, demonstrando que o ajuste da função estava adequado.

Figura 28 - Distribuições de tamanho de partículas obtidas por espalhamento de luz dinâmico da amostra recoberta com CMDex em a) água deionizada e b) em solução SBF, ambas dispersões com concentração 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.



O diâmetro hidrodinâmico médio para a dispersão em água deionizada foi de 113,9 nm e a polidispersividade foi de 8,8%, mostrando que as rotas de síntese e de modificação de superfície levaram a formação de um material monodisperso. Em contrapartida, a dispersão de mesma concentração em solução SBF apresentou um diâmetro médio de 102,4 nm com polidispersividade de 10,7%. A diminuição do diâmetro hidrodinâmico médio na

solução SBF em comparação com a dispersão em água deionizada é decorrente da compactação da dupla camada elétrica consequente do aumento da concentração de íons na camada difusa.⁸⁷ Na solução de SBF, esta dispersão não pode ser mais considerada como monodispersa, haja visto que a polidispersividade é superior a 10%.

A determinação do diâmetro hidrodinâmico também foi realizado em solução SBF variando-se a concentração de nanopartículas em cada dispersão, conforme apresentado na Tabela 4.

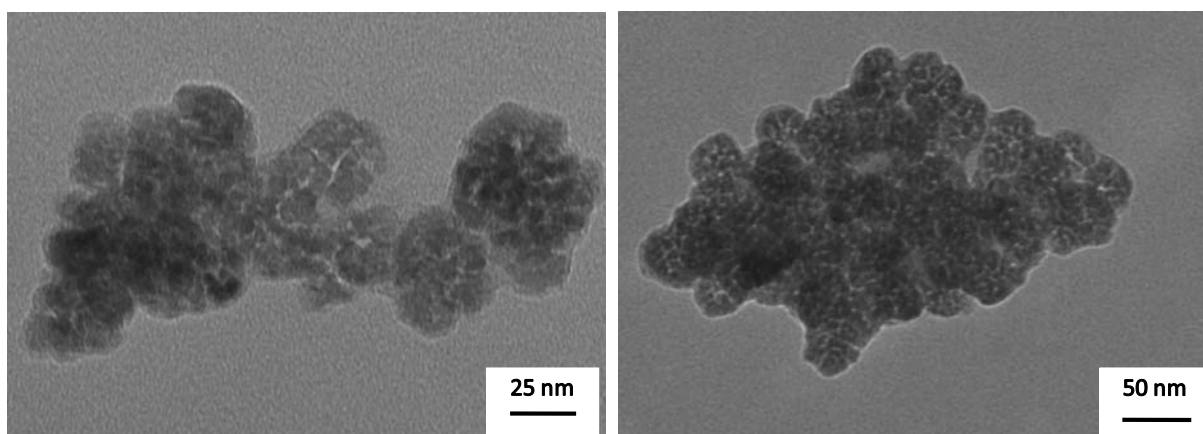
Tabela 3 - Diâmetro hidrodinâmico médio (Dh) e polidispersividade para cada distribuição de tamanho obtidas por espalhamento de luz em função da concentração da dispersão.

	Concentração das dispersões em SBF ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)							
	100		50		20		10	
	Dh (nm)	Pd (%)	Dh (nm)	Pd (%)	Dh (nm)	Pd (%)	Dh (nm)	Pd (%)
Média	106,2	10,7	102,4	10,7	116,7	8,9	115,5	8,6

Observou-se menor diâmetro hidrodinâmico médio nas dispersões com maiores concentrações de nanopartículas, $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Foi observado, também, que as dispersões com concentrações menores, $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentaram polidispersividade inferior a 10%, sendo sistemas monodispersos. Estas diferenças podem ser atribuídas aos erros experimentais envolvidos nas análises e aos ajustes de funções de distribuição sobre os valores obtidos.

Analisou-se o tamanho do material por MET, para observar se o tamanho médio apresentava concordância com o diâmetro hidrodinâmico médio obtido por espalhamento de luz. As imagens obtidas por MET são mostradas na Figura 29.

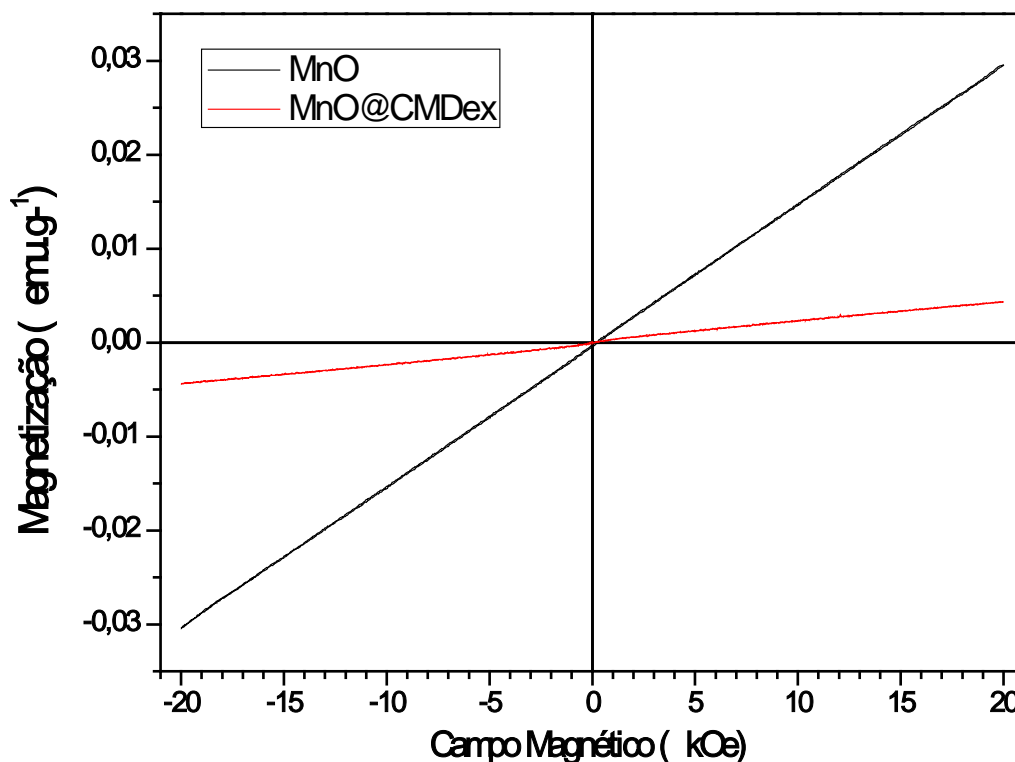
Figura 29 - Microscopia da amostra de nanopartículas de MnO após o recobrimento com CMDex.



A caracterização por MET não permitiu uma análise estatística sobre o tamanho médio de partícula em decorrência de dificuldades no preparo da mesma. A amostra preparada apenas com água deionizada levou a formação de grandes agregados, sem que se pudesse inferir se cada agregado era uma partícula individual formado no processo de recobrimento ou se era a floculação das nanopartículas como consequência da secagem do solvente. Assim, tentou-se realizar o preparo da amostra em uma mistura 50% (v/v) de água deionizada e acetonitrila. Observou-se dessa vez, Figura 29, a presença de agregados menores e que apresentavam melhor concordância com o obtido por espalhamento de luz. Entretanto, ainda não foi possível por microscopia se determinar o tamanho médio das nanopartículas devido a pouca amostragem obtida.

As nanopartículas foram caracterizadas quanto as suas propriedades magnéticas para que se observasse o comportamento do material após a etapa de funcionalização. A curva de magnetização da amostra de nanopartículas assim que sintetizadas e após o recobrimento com CMDex é mostrada na Figura 30.

Figura 30 - Curva de magnetização das amostras de nanopartículas assim que sintetizadas (em preto) e após a etapa de funcionalização (em vermelho).



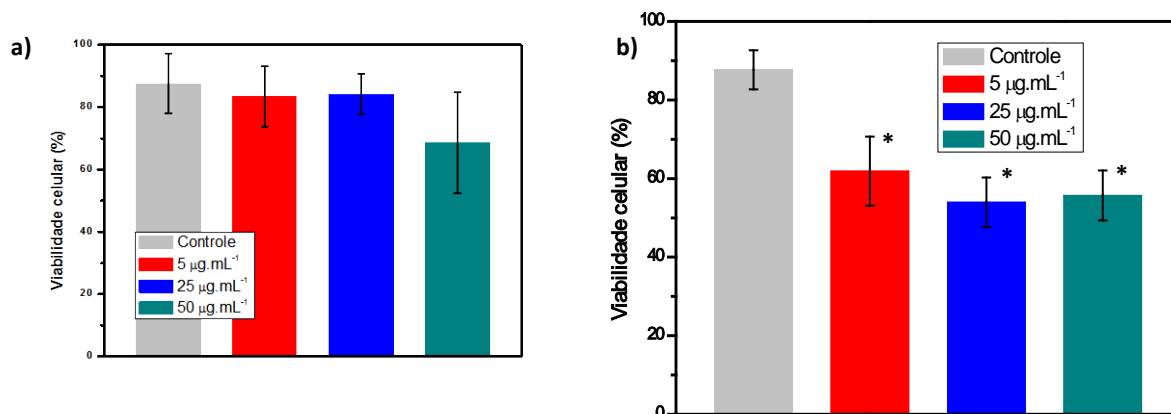
A partir da curva de magnetização pode-se observar um comportamento típico de material antiferromagnético e que o material apresentou uma diminuição significativa em sua magnetização após as etapas de modificação e superfície e de recobrimento. Esta diminuição era esperada, uma vez que o núcleo antiferromagnético de MnO foi recoberto com uma quantidade relativamente grande de materiais não magnético. Além disso, pode-se inferir que as etapas de modificação de superfície e de recobrimento não levaram a mudança no comportamento magnético do material e que não ocorreu a formação de fases mais oxidadas do manganês em quantidade suficiente para que alterasse o comportamento do material como um agente de contraste.

4.3.1 TESTES DE CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade das nanopartículas foi estudada para diferentes concentrações de nanopartículas no meio de cultura celular. Para a linhagem de células não cancerosas NCTC clone L929, Figura 31a, na faixa de concentração estudada as nanopartículas não

apresentaram citotoxicidade significativa, demonstrando que o material apresenta potencialidade para a aplicação como um agente de contraste em imagem por ressonância magnética.

Figura 31 - Viabilidade celular da linhagem NCTC clone L929 (fibroblastos de tecido conectivo) incubadas com diferentes concentrações de nanopartículas de MnO@CMDex.



A viabilidade celular também foi estudada em uma linhagem de células cancerosas, no caso a linhagem HeLa, Figura 31b. As nanopartículas apresentaram citotoxicidade significativa em todas as concentrações utilizadas.

Muito embora a toxicidade do material em células cancerosas não seja necessariamente um fator negativo, conhecer o mecanismo pelo qual o material leva a morte celular para esta linhagem permitiria um melhor entendimento das limitações do emprego deste mesmo para outras linhagens celulares. Assim, ainda faz-se necessário um estudo mais aprofundado sobre a toxicidade das nanopartículas em diferentes condições

5 CONCLUSÕES

O método de síntese empregado levou a formação de nanopartículas de MnO em sua estrutura cristalina do tipo sal-gema, tipicamente antiferromagnética. Entretanto, o material obtido inicialmente apresentou duas distribuições de tamanho distintas, uma com tamanho médio de aproximadamente 3 nm e outra com tamanho de partícula superior a 40 nm. As adaptações realizadas no método de síntese em estudo levaram a formação de apenas uma distribuição de tamanho, com tamanho médio das nanopartículas de $21 \pm 3,9$ nm, adequado para o prosseguimento com as etapas de modificação de superfície e biocompatibilização.

A modificação de superfície das nanopartículas foi realizada com diferentes tempos de reação, sendo que não se observou diferença significativa na concentração de grupos amina livres sobre a superfície do material em função do tempo de reação. As caracterizações por FTIR e MET permitiram inferir que não ocorreu a policondensação do APTMS e a formação de partículas de sílica livres, demonstrando o sucesso desta etapa. As nanopartículas modificadas com APTMS apresentaram um $pH_{pie} = 9,5$ em decorrência da presença dos grupos amina sobre a superfície destas.

A funcionalização do material foi realizada pela reação entre o grupo carboxilato da CMDex e os grupos amina livres sobre a superfície das nanopartículas, o que levou a formação de uma ligação do tipo peptídica. A presença do grupo amida foi observada por FTIR, sendo que também foi observada a modificação no pH_{pie} do material, que mudou de 9,5 para 2,3. A análise por espalhamento de luz dinâmico permitiu determinar o diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas em água deionizada e em solução SBF para diferentes concentrações do material. A diferença observada entre no diâmetro hidrodinâmico médio em relação à variação da concentração de nanopartículas da solução de SBF pode ser atribuída aos erros experimentais e aos ajustes das funções de distribuição, sendo em todos os casos o diâmetro hidrodinâmico médio pouco superior a 100 nm e a polidispersividade próxima a 10%. O comportamento magnético do material sintetizado com caráter antiferromagnético, não foi alterado após as etapas de modificação de superfície e de funcionalização, sendo observado apenas uma diminuição da magnetização deste.

As nanopartículas de MnO@CMDex apresentaram citotoxicidade para a linhagem de células cancerosas HeLa (carcinoma cervical humano), em contrapartida, não apresentaram

citotoxicidade para a linhagem de células não cancerosas NCTC clone L929 (fibroblastos de tecido conectivo). Tendo em vista as propriedades magnéticas, o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas e a citotoxicidade das nanopartículas de MnO@CMDex, o material obtido apresentou características adequadas para ser considerado como um potencial agente de contraste T₁ em imagem por ressonância magnética, sendo que um estudo mais detalhado sobre a toxicidade e a determinação da relaxatividade das nanopartículas ainda se mostra necessário.

REFERÊNCIAS

1. ARTUS, M.; AMMAR, S.; SICARD, L.; PIQUEMAL, J. -Y.; HERBST, F.; VAULAY, M. -J.; FIÉVET, F.; RICHARD, V. Synthesis and magnetic properties of ferrimagnetic CoFe_2O_4 nanoparticles embedded in an antiferromagnetic NiO matrix. **Chemistry of Materials** v. 20, n. 15, p. 4861-4872, 2008.
2. SIMEONIDIS, K.; MOURDIKLOUDIS, S.; TSIAOUSSIS, I.; ANGELAKERIS, M.; DENDRINOUSAMARA, C.; KALOGIROU, O. Structural and magnetic features of heterogeneously nucleated Fe-oxide nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 320, n. 9, p. 1631-1638, 2008.
3. LEE, G. H.; HUH, S. H.; JEONG, J. W.; CHOI, B. J.; KIM, S. H.; RI, H. -C. Anomalous magnetic properties of MnO nanoclusters. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 41, p. 12094-12095, 2002.
4. VARANDA, L. C.; JAFELICCI, M. Self-assembled FePt nanocrystals with large coercivity: reduction of the fcc-to- $L1_0$ ordering temperature. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 34, p. 11062-11066, 2006.
5. VARANDA, L. C.; JAFELICCI JUNIOR, M.; IMAIZUMI, M. Temperature dependence and magnetocrystalline anisotropy studies of self-assembled $L1_0$ - $\text{Fe}_{55}\text{Pt}_{45}$ ferromagnetic nanocrystals. **Journal of Applied Physics**, v. 101, n. 12, p. 123918-1-123918-5, 2007.
6. LU, A. -H.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1222-1244, 2007.
7. NA, H. B.; SONG, I. C.; HYEON, T. Inorganic nanoparticles for MRI contrast agent. **Advanced Materials**, v. 21, n. 21, p. 2133-2148, 2009.
8. TERRENO, E.; CASTELLI, D. D.; VIALE, A.; AIME, S. Challenges for molecular magnetic resonance imaging. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 5, p. 3019-3042, 2010.
9. NA, H. B.; HYEON, T. Nanostructured T1 MRI contrast agents. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 35, p. 6267-6273, 2009.

-
10. CASULA, M. F.; FLORIS, P.; INNOCENTI, C.; LASCIALFARI, A.; MARINONE, M.; CORTI, M.; SPERLING, R. A.; PARAK, W. J.; SANGREGORIO, C. Magnetic resonance imaging contrast agents based on iron oxide superparamagnetic ferrofluids. **Chemistry of Materials**, v. 22, n. 5, p. 1739-1748, 2010.
11. CHOI, J. Y.; LEE, S. H.; NA, H. B.; AN, K.; HYEON, T.; SEO, T. S. In vitro cytotoxicity screening of water-dispersible metal oxide nanoparticles in human cell lines. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, n. 1, p. 21-30, 2010.
12. NA, H. B.; LEE, J. H.; AN, K.; PARK, Y. I.; PARK, M.; LEE, I. S.; NAM, D. H.; KIM, S. T.; KIM, S. H.; KIM, S. W.; LIM, K. H.; KIM, K. S.; KIM, S. O.; HYEON, T. Development of a T1 contrast agent for magnetic resonance imaging using MnO nanoparticles. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 28, p. 5397-5401, 2007.
13. GILAD, A. A.; WALCZAK, P.; McMAHON, M. T.; NA, H. B.; LEE, J. H.; AN, K.; HYEON, T.; van ZIJL, P. C. M.; BULTE, J. W. M. MR tracking of transplanted cells with "positive contrast" using manganese oxide nanoparticles. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 60, n. 1, p. 1-7, 2008.
14. FANG, C.; ZHANG, M. Multifunctional magnetic nanoparticles for medical imaging applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 35, p. 6258-6266, 2009.
15. LIONG, M.; ANGELOS, S.; CHOI, E.; PATEL, K. Mesostructured multifunctional nanoparticles for imaging and drug delivery. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 35, p. 6251-6257, 2009.
16. 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.
17. SHIN, J.; ANISUR, R. M.; KO, M. K.; IM, G. H.; LEE, J. H.; LEE, I. S. Hollow manganese oxide nanoparticles as multifunctional agents for Magnetic Resonance Imaging and drug delivery. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 48, n. 2, p. 321-324, 2009.
18. KIM, K.; DOBSON, J. Nanomedicine for targeted drug delivery. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 35, p. 6294-6307, 2009.

-
19. PRADHAN, P.; GIRI, J.; SAMANTA, G.; SARMA, H. D.; MISHRA, K. P.; BELLARE, J.; BANERJEE, R.; BAHADUR, D. Comparative evaluation of heating ability and biocompatibility of different ferrite-based magnetic fluids for hyperthermia application. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 81B, n. 1, p. 12-22, 2007.
20. SHARMA, A.; QIANG, Y.; MEYER, D.; SOUZA, R.; McCONNAUGHOY, A.; MULDOON, L.; BAER, D. Biocompatible core-shell magnetic nanoparticles for cancer treatment. **Journal of Applied Physics**, v. 103, n. 7, p. 07A308-1-07A308-3, 2008.
21. JEONG, U.; TENG, X.; WANG, Y.; YANG, H.; XIA, Y. Superparamagnetic colloids: Controlled synthesis and niche applications. **Advanced Materials**, v. 19, n. 1, p. 33–60, 2007.
22. NEUBERGER, T.; SHÖPF, B.; HOFMANN, H.; HOFMANN, M.; von RECHENBERG, B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, n. 1, p. 483-496, 2005.
23. WEISHAUP, D.; KÖCHLI, V.D.; MARINCEK, B. **How does MRI work?** 2nd ed. New York: Springer, 2006. 169 p.
24. GIL, V.S.M. **Ressonância magnética nuclear: fundamentos, métodos e aplicações.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 39-61, 1987.
25. SANDERS, J.K.M.; HUNTER, B.K. **Modern NMR spectroscopy: a guide for chemists.** 2nd ed. New York: Oxford University, 1993. 127 p.
26. KUPERMAN, V. **Magnetic resonance imaging: physical principles and applications.** San Diego: Academic Press, 2000. 182 p.
27. CARAVAN, P.; ELLISON, J.J.; McMURRAY, T.J.; LAUFFER, R.B. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2293-2352, 1999.
28. CLIME, L.; LE DROGOFF, B.; ZHAO, S.; ZHANG, Z.; VERES, T. Magnetic nanocarriers: from material design to magnetic manipulation. **International Journal of Nanotechnology**, v. 5, n. 9-12, p. 1268-1305, 2008.

-
29. NAMDEO, M.; SAXENA, S.; TANKHIWALE, R.; BAJPAI, M.; MOHAN, Y. M.; BAJPAI, S. K. Magnetic nanoparticles for drug delivery applications. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 7, p. 3247-3271, 2008.
30. BABINCOVA, M.; BABINEC, P. Magnetic drug delivery and targeting: principles and applications. **Biomedical Papers-Olomouc**, v. 153, n. 4, p. 243-250, 2009.
31. GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, 2005.
32. TARTAJ, P.; MORALES, M. D.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; GONZALEZ-CARRENO, T.; SERNA, C. J. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D-Applied Physics**, v. 36, n. 13, p. R182-R197, 2003.
33. LI, Z. X.; KAWASHITA, M.; ARAKI, N.; MITSUMORI, M.; HIRAOKA, M.; DOI, M. Magnetite nanoparticles with high heating efficiencies for application in the hyperthermia of cancer. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 30, n. 7, p. 990-996, 2010.
34. MORGAN, S. M.; VICTORA, R. H. Use of square waves incident on magnetic nanoparticles to induce magnetic hyperthermia for therapeutic cancer treatment. **Applied Physics Letters**, v. 97, n. 9, p. 093705-1-093705-3, 2010.
35. GUEDES, M. H. A.; SADEGHIANI, N.; PEIXOTO, D. L. G.; COELHO, J. P.; BARBOSA, L. S.; AZEVEDO, R. B.; KUCKELHAUS, S.; DA SILVA, M. D.; MORAIS, P. C.; LACAVA, Z. G. M. Effects of AC magnetic field and carboxymethyl-dextran-coated magnetite nanoparticles on mice peritoneal cells. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, n. 1, p. 283-286, 2005.
36. GROMAN, E. V.; BOUCHARD, J. C.; REINHARDT, C. P.; VACCARO, D. E. Ultrasmall mixed ferrite colloids as multidimensional magnetic resonance imaging, cell labeling, and cell sorting agents. **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 1763-1771, 2007.
37. ZHANG, C.; LIU, T.; GAO, J. N.; SU, Y. P.; SHI, C. M. Recent development and application of magnetic nanoparticles for cell labeling and imaging. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 194-203, 2010.

38. KIM, J.; PIAO, Y.; HYEON, T. Multifunctional nanostructured materials for multimodal imaging, and simultaneous imaging and therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 372-390, 2009.
39. PEER, D.; KARP, J.M.; HONG, S.; FAROKHZAD, O.C.; MARGALIT, R.; LANGER, R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, v. 2, p. 751-760, 2007.
40. JUNG, C.W.; JACOBS, P. Physical and chemical properties of superparamagnetic iron oxide MR contrast agents: ferumoxides, ferumoxtran, ferumoxsil. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 13, n. 5, p. 661-67, 1995.
41. BULTE, J.W.M.; KRAITCHMAN, D. L. Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging. **NMR Biomedicine**, v. 17, n. 7, p. 484-499, 2004.
42. JUN, Y. -W.; SEO, J. -W.; CHEON, J. Nanoscaling laws of magnetic nanoparticles and their applicabilities in biomedical sciences. **Accounts of Chemical Research**, v. 41, n. 2, p. 179-189, 2008.
43. JUN, Y. -W.; LEE, J. -H.; CHEON, J. Chemical design of nanoparticle probes for high-performance magnetic resonance imaging. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, n. 28, p. 5122-5135, 2008.
44. FORTIN, M. A.; PETORAL, JR, R. M.; SÖDERLIND, F.; KLASSON, A.; ENGSTRÖM, M.; VERES, T.; KÖALL, P.O.; UVDAL, K. Polyethylene glycol-covered ultra-small Gd₂O₃ nanoparticles for positive contrast at 1.5 T magnetic resonance clinical scanning. **Nanotechnology**, v. 18, n. 39, p. 395501-1-395501-9, 2007.
45. BRIDOT, J. L.; FAURE, A. C.; LAURENT, S.; RIVIÈRE, C.; BILLOTEY, C.; HIBA, B.; JANIER, M.; JOSSERAND, V.; COLL, J. -L.; ELST, L. V.; MULLER, R.; ROUX, S.; PERRIAT P.; TILLEMENT, O. Hybrid gadolinium oxide nanoparticles: multimodal contrast agents for in vivo imaging **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 16, p. 5076-5084, 2007.
46. EVANICS, F.; DIAMENTE, P. R.; van VEGGEL, F. C. J. M.; STANISZ, G.J.; PROSSER, R.S.; Water-soluble GdF₃ and GdF₃/LaF₃ nanoparticles - physical characterization and NMR relaxation properties. **Chemistry of Materials**, v. 18, n. 16, p. 2499-2505, 2006.

47. HIFUMI, H.; YAMAOKA, S.; TANIMOTO, A.; CITTERIO, D.; SUZUKI, K. Gadolinium-based hybrid nanoparticles as a positive MR contrast agent. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 47, p. 15090-15091, 2006.
48. PARK, J.; JOO, J.; KWON, S. G.; JANG, Y.; HYEON, T. Synthesis of monodisperse spherical nanocrystals. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 25, p. 4630-4660, 2007.
49. VARANDA, L. C.; JAFELLICI JUNIOR, M.; BECK JUNIOR, W. Magnetic and multifunctional magnetic nanoparticles in nanomedicine: challenges and trends in synthesis and surface engineering for diagnostic and therapy applications. In: LASKOVSKI, A.N. (Ed.) **Biomedical engineering, trends in materials science**. Rijeka: InTech, 2011, p. 397-424. Acesso em: 12 set. 2011. Disponível: <<http://www.intechopen.com/books/biomedical-engineering-trends-in-materials-science>>.
50. SEO, W. S.; JO, H. H.; LEE, K.; KIM, B.; OH, S. J.; PARK, J. T. Size-dependent magnetic properties of colloidal Mn₃O₄ and MnO nanoparticles. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, n. 9, p. 1115-1117, 2004.
51. YIN, M.; O'BRIEN, S. Synthesis of monodisperse nanocrystals of manganese oxides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 34, p. 10180-10181, 2003.
52. PARK, J.; AN, K.; HWANG, Y.; PARK, J. -G.; NOH, H. -J.; KIM, J. -Y.; PARK, J. -H.; HWANG, N. -M.; HYEON, T. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. **Nature Materials**, v.3, p. 891-895, 2004.
53. QI, L.; WANG, J.; HE, Y.; LIU, W.; QIU, X. Growth of nearly monodisperse MnO nanocrystals in a two-size distribution system. **Crystal Growth & Design**, v. 9, n.7, p. 3100-3103, 2009.
54. SCHLADT, T. D.; GRAF, T.; TREMEL, W. Synthesis and characterization of monodisperse manganese oxide nanoparticles – evaluation of the nucleation and growth mechanism. **Chemistry of Materials**, v. 21, n. 14, p. 3183-3190, 2009.
55. CHEN, Y.; JOHNSON, E.; PENG, X. Formation of monodisperse and shape-controlled MnO nanocrystals in non-injection synthesis: self-focusing via ripening. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 35, p. 10937-10947, 2007.

-
56. OULD-ELY, T.; CENTURION, D.P.; KUMAR, A.; GUO, W.; KNOWLES, W.V.; ASOKAN, S.; WONG, M.S.; RUSAKOVA, I.; LÜTTGE, A.; WHITMIRE, K.H. Manganese(II) oxide nanohexapods: insight into controlling the form of nanocrystals. **Chemistry of Materials**, v. 18, n. 7, p. 1821-1829, 2006.
57. LYNCH, J.; ZHUANG, J.; WANG, T.; LAMONTAGNE, D.; WU, H.; CAO, Y.C. Gas-bubble effects on the formation of colloidal iron oxide nanocrystals. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 32, p. 12664-12674, 2011.
58. KUCHIBHATLA, S. V. N. T.; KARAKOTI, A. S.; SEAL, S. Colloidal stability by surface modification. **JOM**, v. 57, n. 12, p. 52-56, 2005.
59. SCHMIDT, A. M. Thermoresponsive magnetic colloids. **Colloid and Polymer Science**, v. 285, n. 9, p. 953-966, 2007.
60. ZANCHET, D.; MORENO, M. S.; UGARTE, D. Anomalous packing in thin nanoparticle supercrystals. **Physical Review Letters**, v. 82, n. 26, p. 5277-5280, 1999.
61. ZANCHET, D.; HALL, B. D.; UGARTE, D. Structure population in thiol-passivated gold nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 47, p. 11013-11018, 2000.
62. ZANCHET, D.; TOLENTINO, H.; ALVES, M. C. M.; ALVES, O. L.; UGARTE, D. Inter-atomic distance contraction in thiol-passivated gold nanoparticles. **Chemical Physics Letters**, v. 323, n. 1-2, p. 167-172, 2000.
63. LIM, E. -K.; JANG, E.; KIM, B.; CHOI, J.; LEE, K.; SUH, J. -S.; HUH, Y. -M.; HAAM, S. Dextran-coated magnetic nanoclusters as highly sensitive contrast agents for magnetic resonance imaging of inflammatory macrophages. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 33, p. 12473-12478, 2011.
64. HOU, Y.; XU, Z.; SUN, S. Controlled synthesis and chemical conversion of FeO nanoparticles. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 33, p. 6329-6332, 2007.
65. BECK Jr, W. **Nanopartículas metálicas recobertas com óxido de ferro: intensificação das propriedades magnéticas da nanopartícula e funcionalização para aplicação em biomedicina**. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

66. DE PALMA, R.; PEETERS, S.; VAN BAELE, 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.
67. 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.
68. 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.
69. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunologic Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
70. MALVERN INSTRUMENTS. **Zetasizer nano series user manual**. Worcestershire, 2005. 1 CD-ROM.
71. APARECIDA, A.H. **Recobrimento de apatitas empregando-se o método biomimético: estudo da influência dos íons K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} e HCO_3^- na formação de hidroxiapatita**. 2006. 115 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.
72. MELLOR, J. W. **A comprehensive treatise on inorganic and theoretical chemistry**. London: Novografic Process, 1953. v. 12, p. 220,.
73. DOBROVOLSKAIA, M. A.; MCNEIL, S. E. Immunological properties of engineered nanomaterials. **Nature Nanotechnology**, v. 2, n. 8, p. 469-478, 2007.
74. NEL, A.; XIA, T.; MÄDLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622-627, 2006.
75. KWON, G. S.; PIAO, Y.; PARK, J.; ANGAPPANE, S.; JO, Y.; HWANG, N. -M.; PARK, J. -G.; HYEON, T. Kinetics of monodisperse iron oxide nanocrystal formation by "heating-up" process. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 41, p. 12571-12584, 2007.

76. 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.
77. SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica e compostos orgânico**. Rio de Janeiro: LCT, 2007. 490 p.
78. 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.
79. 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.
80. BINI, R.A. **Síntese e funcionalização de superfície de óxidos de ferro superparamagnético**. 2011. 122 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
81. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 2002. 836 p.
82. MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, n. 46, p. 10827-10852, 2005.
83. HERRERA, A. P.; BARRERA, C.; RINALDI, C. Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with aminopropylsilane and carboxymethyl dextran. **Journal of Materials Chemistry**, v. 18, n. 31, p. 3650-3654, 2008.
84. LIU, G.; HONG, R. Y.; GUO, L.; LI, Y. G.; LI, H. Z. Preparation, characterization and MRI application of carboxymethyl dextran coated magnetic nanoparticles. **Applied surface science**, v. 257, n. 15, p. 6711-6717, 2011.
85. CAMPELJ, S.; MAKOVEC, D.; DROFENIK, M. Functionalization of magnetic nanoparticles with 3-aminopropyl silane. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, n. 10, p. 1346-1350, 2009.

86. XU, Z.; LIU, Q.; FINCH, J. A. Silanation and stability of 3-aminopropyl triethoxy silane on nanosized superparamagnetic particles: direct silanation. **Applied Surface Science**, v. 120, n. 3-4, p. 269-278, 1997.

87. HUNTER, R. J. **Introduction to modern colloid science**. New York: Oxford University, 1993, 338 p.

88. MALVERN. **Zetasizer nano series: user manual**. Worcestershire, 2004. 270 p.