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

Mônica Freitas da Silva

**Engenharia de superfície de nanopartículas magnéticas para
biomedicina: recobrimentos com macromoléculas visando
estabilização e compatibilidade em meio fisiológico**

São Carlos
2013

Mônica Freitas da Silva

**Engenharia de superfície de nanopartículas magnéticas para biomedicina:
recobrimentos com macromoléculas visando estabilização e compatibilidade em
meio fisiológico**

Exemplar revisado

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

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

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Laudemir Carlos Varanda

São Carlos

2013

*Tudo que sempre ofereceram para tornar-me
a pessoa que sou. Aos meus pais Paulo e Ana.*

Agradecimentos

Agradeço de forma geral àqueles que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, que é parte da minha vitória pessoal e profissional.

Ao professor Laudemir Carlos Varanda, pela confiança, convivência, oportunidade de trabalho e contribuição para a minha formação.

A todos os amigos do Grupo de Materiais Coloidais, que muito me apoiaram, incentivaram e auxiliaram.

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

A todos da minha família que de alguma forma me incentivaram, principalmente aos meus avós Ovídio e Laurindo, que mesmo não estando mais entre nós, deixaram grandes ensinamentos para que eu jamais desistisse. À Neide, que desde a época da graduação me auxilia nos mais diversos assuntos acadêmicos.

Ao Danilo, pelo amor, companheirismo e lealdade nos melhores e piores momentos.

Aos amigos que conquistei nesta jornada e também ao longo da minha vida, que jamais permitiram que eu desanimasse nas dificuldades: Aline, Sarah, Nayane, Mayara, Carol, Noelle, Ana Paula, Carina, Tiago, Vinícius. E a todos os amigos que fiz no período de graduação na UNESP.

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

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

À FAPESP pelo apoio financeiro e bolsa concedida.

*"Cada dia que amanhece assemelha-se a uma página em branco
na qual gravamos os nossos pensamentos ações e atitudes.*

Na essência, cada dia é a preparação de nosso próprio amanhã."

Chico Xavier

Resumo

Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro tem sido amplamente utilizadas em diversas áreas da biotecnologia e biomedicina, tais como no tratamento de câncer, marcação de célula e como agentes de contraste em imagem por ressonância magnética. O intuito deste trabalho foi sintetizar as nanopartículas magnéticas com magnetização de saturação intensificadas via processo do poliol modificado, e usando agentes de superfície para melhorar as propriedades de superfície. Carboximetildextrana, metilpolietilenoglicol (MPEG), quitosana, sílica e 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTMS) foram utilizados para a modificação da superfície. Através da microscopia eletrônica de transmissão (TEM), foi obtido que as nanopartículas magnéticas de magnetita obtiveram um diâmetro médio de 5nm, em uma estreita distribuição de tamanho. A difração de raios-X (DRX) indicou a formação de magnetita em todos os sistemas em que o método do poliol modificado foi utilizado. As medidas de espectroscopia no infravermelho (FTIR) evidenciaram a presença de modos de vibração relacionados às macromoléculas e compostos inorgânicos utilizados na modificação de superfície das nanopartículas magnéticas. A TEM das diferentes modificações de superfície mostram a formação de aglomerados dependendo do modificador utilizado. As nanopartículas recobertas com APTMS foram funcionalizadas com ácido fólico, mostrando resultados satisfatórios, porém serão necessárias outras técnicas de caracterização. Para a funcionalização foi determinada a quantidade de amina livre na superfície da nanopartícula recoberta com APTMS e a técnica de UV-Vis determinou um bom resultado. A magnetometria de amostra vibrante (VSM) mostrou comportamentos semelhantes para todas as amostras recobertas em comparação a amostra sem recobrimento. Estes resultados evidenciam que a modificação de superfície foi realizada satisfatoriamente. Os métodos utilizados para realizar a mudança para hidrofóbica a superfície inicialmente hidrofílica se mostraram efetivos, porém a quantidade de agentes modificadores deve ser melhor estudada. Portanto, as nanopartículas magnéticas funcionalizadas com diferentes superfícies foram obtidas e possuem um alto potencial para serem utilizadas em aplicações em biomedicina.

Abstract

Superparamagnetic iron oxides nanoparticles (SPION) have been highlighted in several areas of biotechnology and biomedicine, for example in cancer treatment, in labeling of cells and as contrast agent in magnetic resonance imaging (MRI). The purpose of this study was synthesizing SPION with intensified saturation magnetization by modified polyol process, and using surface agents to enhance the surface properties. Carboxymethildextran, metylpolietileneglycol, chitosan, silica and 3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS) were utilized as surface modifiers. By transmission electron microscopy (TEM), SPION showed narrow particle size distribution, with an average diameter around 5 nm. The X-ray diffraction studies indicated the formation of magnetite in all synthesized systems in which the modified polyol process was utilized. FTIR measurements showed the presence of vibration modes related to the macromolecules and inorganic compounds used to SPION surface modifications. TEM of the different surface modifications showed the agglomerate formation, which depends on the used surface modifier. SPION coated with APTMS was functionalized with folic acid, showing satisfactory results. However other characterization techniques will be necessary for study this modification. Quantity of free amine groups was determinate in the amount coated with APTMS for functionalization, and UV-Vis spectroscopy determinates a good result. Vibrating sample magnetometry (VSM) indicates similar behaviors in all cases against SPION without surface modifiers. These results suggest that the surface modifications were performed satisfactorily. Utilized methods for changing the hydrophobic to hydrophilic surface showed effectives, however, the quantity of surface modifiers should be better studied. Therefore, SPION functionalized with different hydrophilic surfaces were obtained, which possess high potential to be used as devices in biomedical applications.

Lista de abreviaturas e siglas

- M01 – magnetita com o objetivo de tamanho de 12 nm
- M02 – magnetita utilizando-se oleilamina como agente redutor e solvente
- M03 – magnetita via método do poliol modificado com diminuição da quantidade de surfactante
- M04 – magnetita via método do poliol modificado
- M06D – magnetita recoberta com ácido aminocapróico em meio básico
- M10A1 – magnetita recoberta com ácido aminocapróico em meio ácido
- M10A2 - magnetita recoberta com ácido aminocapróico em meio ácido e presença de NaCl
- M03A – magnetita recoberta com APTMS
- M06A – magnetita recoberta com APTMS via troca de ligantes
- M03B – magnetita recoberta com MPEG
- M06B – magnetita recoberta com MPEG após troca de ligantes
- M05A – magnetita recoberta com sílica
- M08A – magnetita recoberta com APTMS e posteriormente recoberta com quitosana
- M09A – magnetita recoberta com ácido aminocapróico e posteriormente recoberta com quitosana
- M06E – magnetita recoberta com carboximetildextrana
- M12B – magnetita recoberta com carboximetildextrana e posterior diálise
- M10D – magnetita recoberta com APTMS com procedimento de 24 horas
- M11A – magnetita recoberta com APTMS com procedimento de 12 horas
- M11A1 – magnetita funcionalizada com ácido fólico
- APTMS – 3-aminopropiltrimetoxisilano
- D_p – diâmetro crítico de partícula
- D_s – diâmetro crítico
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DRX – difratometria de raios X
- EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
- FTIR - infravermelho com transformada de Fourier
- FM – ferromagnético
- H_C - campo coercivo ou coercividade
- H_{ci} – coercividade intrínseca
- IRM – imagem por ressonância magnética
- M_S – magnetização de saturação

M_R – magnetização remanente

MD – múltiplos domínios

MET – microscopia eletrônica de transmissão

MPEG – metilpolietilenoglicol

NHS – N-hidroxisuccinamida

SD – single domain

SPM – superparamagnético

VSM – magnetometria de amostra vibrante

Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura cristalina da magnetita (Fe_3O_4) cúbica de espinélio invertido, com estaques as posições dos cátions de Fe e do oxigênio. Adaptado de ³	16
Figura 2 - Momentos magnéticos atômicos associados com (a) movimento orbital e (b) movimento de spin eletrônico. Adaptado de ⁸	17
Figura 3 - Representação da estrutura de domínios magnéticos aleatórios em um material policristalino constituído por multidomínios magnéticos, separados por paredes de domínios.....	19
Figura 4 - Curva teórica da magnetização versus campo magnético para nanopartículas superparamagnético (SPM) e ferromagnéticas (FM), onde o campo coercitivo (H_C), a magnetização de saturação (M_S) e da magnetização remanescente (M_R) são parâmetros indicados ⁵	20
Figura 5 - Variação da coercividade intrínseca em função do diâmetro da partícula. Adaptado de ⁸	20
Figura 6 - Ilustração do mecanismo de formação de partículas uniformes baseado no modelo clássico de LaMer e Dinegar. Adaptado de ¹⁶	23
Figura 7 - Modificação da superfície de uma nanopartícula pelo processo de troca de ligantes. Adaptado de ¹⁸	25
Figura 8 - Esquema mostrando uma nanopartícula magnética com diversos ligantes funcionais possibilitando multifuncionalidade numa única nanopartícula. Adaptado de ⁴⁰	27
Figura 9 - Representação por diagrama do processo de endocitose mediada pelo receptor folato. Adaptado de ⁴³	29
Figura 10 - Representação do esquema de aparato experimental utilizado na síntese de nanopartículas magnéticas.....	32
Figura 11 – Procedimento experimental utilizado para síntese de magnetita com tamanho aproximado de 12nm.....	33
Figura 12 – Esquema de rampa de aquecimento utilizado para o experimento de síntese de magnetita de 12nm (M01).....	34
Figura 13 – Procedimento experimental para síntese de nanopartículas de magnetita utilizando-se a oleilamina como agente redutor e como solvente.....	35
Figura 14 – Esquema de rampa de aquecimento utilizado para o experimento de síntese de magnetita utilizando-se oleilamina como redutor e solvente (M02).....	35
Figura 15 – Fluxograma da síntese do poliol modificado para produção de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4	36
Figura 16 – Esquema de rampa de aquecimento utilizado para a síntese de nanopartículas via síntese do poliol modificado(M03).....	37
Figura 17 - Aparato experimental utilizado no recobrimento das nanopartículas com APTMS.....	39

Figura 18 - Esquema do mecanismo da reação entre benzaldeído e amina para a formação de imina na superfície de NP funcionalizadas com alcóxissilanos ⁵⁶	42
Figura 19 - Esquema mecanístico da reação de hidrólise da ligação imina ⁵⁶	43
Figura 20 - Curva de calibração com diferentes concentrações de nitrobenzaldeído para determinação da concentração de amina livre.....	44
Figura 21 - (a) e (b)MET da amostra de magnetita M01. (c) Histograma da distribuição de tamanho.....	48
Figura 22 – DRX da amostra de magnetita M02.....	49
Figura 23 – (a) e (b)MET da amostra de magnetita M03.....	51
Figura 24 – (a) e (b)MET da amostra de magnetita M04. (c) Histograma da distribuição de tamanho.....	52
Figura 25 – Difratoograma de raios X da amostra em azul e abaixo, o padrão para a magnetita.....	53
Figura 26 - Espectro de FTIR da magnetita (amostra M04).....	54
Figura 27 – (a) Esquematisação da forma com que a superfície da magnetita fica protegida pelo ácido oleico. (b) Estrutura do ácido aminocapróico, que efetua mecanismo de troca com o ácido oleico da superfície.....	55
Figura 28 – (a) e (b) MET da amostra de magnetita com superfície recoberta por ácido aminocapróico M06D. (c) Histograma da distribuição de tamanho.....	56
Figura 29 – Espectro de FTIR do ácido aminocapróico e da amostra após recobrimento e suas respectivas bandas coincidentes.....	57
Figura 30 - (a) e (b) MET da amostra de magnetita recoberta com ácido aminocapróico em meio ácido M10A1.....	58
Figura 31 - (a) e (b)MET da amostra de magnetita recoberta com ácido aminocapróico, em meio ácido e presença de NaCl, M10A2. (c) Histograma da distribuição de tamanho.....	59
Figura 32 - Espectro de FTIR do recobrimento utilizando ácido aminocapróico em meio ácido e suas respectivas bandas coincidentes.....	60
Figura 33 - Curva de potencial zeta em função do pH da amostra de magnetita com superfície hidrofílica M06D.....	61
Figura 34 – Curvas de magnetização em função do campo magnético aplicado obtidas a temperatura ambiente para as amostras de magnetita com caráter hidrofóbico e hidrofílico. Em destaque, ampliação da região central das curvas.....	62
Figura 35 – (a) e (b) MET da amostra de magnetita com superfície recoberta com APTMS M03A. (c) Processo de ligações covalentes do APTMS na superfície da nanopartículas. Adaptado de ⁶⁴	63
Figura 36 – (a) e (b)MET da amostra de magnetita recoberta com APTMS M06A. (c) Histograma da distribuição de tamanho.....	64

Figura 37 - Espectro no infravermelho da amostra de magnetita recoberta com APTMS.....	65
Figura 38 - Esquema mostrando como o MPEG liga-se para recobrir a superfície da nanopartícula de Fe_3O_4 . Adaptado de ²⁰	66
Figura 39 - (a) e (b)MET da amostra de magnetita recoberta com MPEG, M03B. (c) Histograma da distribuição de tamanho.....	67
Figura 40 - (a) e (b)MET da amostra de magnetita recoberta com MPEG, M06B. (c) Histograma da distribuição de tamanho.....	68
Figura 41 - Espectro no infravermelho da magnetita recoberta com MPEG.....	69
Figura 42 - (a) e (b)MET da amostra de magnetita recoberta com sílica, M05A. (c) Histograma da distribuição de tamanho.....	70
Figura 43 - Espectro no infravermelho da magnetita recoberta com sílica, M05A.....	71
Figura 44 – (a) Ilustração esquemática da formação de magnetita recoberta por quitosana. Adaptado de ⁵⁴ . (b) Fórmula estrutural da quitosana.....	72
Figura 45 - (a) e (b)MET da amostra de magnetita recoberta com quitosana, M08A. (c) Histograma da distribuição de tamanho.....	72
Figura 46 - (a) e (b)MET da amostra de magnetita recoberta com quitosana, M09A. (c) Histograma da distribuição de tamanho.....	73
Figura 47 – (a) Espectro FTIR das amostras de magnetita recobertas com quitosana, M08A e M09A.....	74
Figura 48 - (a) e (b)MET da amostra de magnetita recoberta com carboximetildextrana, M06E. (c) Histograma da distribuição de tamanho.....	76
Figura 49 - (a) e (b)MET da amostra de magnetita recoberta com carboximetildextrana, M12B. (c) Histograma da distribuição de tamanho.....	77
Figura 50 – Espectro FTIR da magnetita recoberta com carboximetildextrana, M12B.....	77
Figura 51- Curvas de VSM realizadas com todas as amostras.....	78
Figura 52- Representação do mecanismo de reação entre os grupos amina livre sobre a superfície das nanopartículas e o grupo carboxilato do ácido fólico. Adaptado de ⁷⁴	80
Figura 53 - (a) e (b)MET da amostra de magnetita funcionalizada com ácido fólico, M11A1. (c) Histograma da distribuição de tamanho. (d) estrutura do ácido fólico.....	81
Figura 54 - FTIR comparativo das amostras de nanopartículas recobertas com APTMS e funcionalizadas com ácido fólico.....	82

Lista de Tabelas

Tabela 1- Distribuição eletrônica no estado fundamental para os átomos de ferro (Fe), cobalto (Co) e níquel (Ni) demonstrando a presença de elétrons desemparelhados e justificando seus comportamentos magnéticos.....	18
Tabela 2 - Comparação entre os métodos de síntese de nanopartículas mais conhecidos.....	22
Tabela 3 - Exemplos de substâncias biocompatíveis utilizadas no recobrimento de nanopartículas magnéticas. Adaptado de ¹	26
Tabela 4 - Concentrações de amina livre calculadas para cada amostra.....	79

Sumário

1	Introdução	16
1.1	Magnetismo	17
1.1.1	Magnetismo em nanoescala	18
1.2	Síntese de nanopartículas magnéticas	21
1.3	Engenharia de superfície de nanopartículas magnéticas	23
1.4	Recobrimentos com macromoléculas e aplicações em biomedicina.....	24
2	Objetivos.....	31
3	Procedimento experimental	32
3.1	Síntese das nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) por decomposição térmica.....	32
3.1.1	Síntese de magnetita 12 nm (M01)	33
3.1.2	Síntese de magnetita utilizando-se oleilamina como agente redutor e solvente (M02)	34
3.1.3	Síntese de magnetita utilizando-se do método do poliol modificado (M03)	36
3.1.4	Síntese de magnetita utilizando-se do método do poliol modificado (M04)	37
3.2	Hidrofilição da superfície da magnetita através da troca de ligantes	37
3.2.1	Hidrofilição da superfície da magnetita por método de ultrassom	37
3.2.2	Hidrofilição da superfície da magnetita via agitação mecânica	38
3.3	Recobrimentos das nanopartículas de magnetita.....	38
3.3.1	Recobrimento com aminopropiltrimetoxissilano (APTMS)	38
3.3.2	Recobrimento com metilpolietilenoglicol (MPEG)	39
3.3.3	Recobrimento com sílica	40
3.3.4	Recobrimento com quitosana	40
3.3.5	Recobrimento com carboximetildextrana	41
3.4	Funcionalização das nanopartículas de magnetita com ácido fólico.....	41
3.4.1	Quantificação da concentração dos grupos amina livres na superfície das nanopartículas sintetizadas	41

3.4.2	Recobrimento das nanopartículas com ácido fólico.....	44
3.5	Caracterização dos sistemas nanoestruturados.....	45
4	Resultados e discussão.....	47
4.1	Síntese das nanopartículas de magnetita (Fe ₃ O ₄) por decomposição térmica.....	47
4.2	Hidrofilização da superfície das nanopartículas de magnetita através da troca de ligantes	54
4.3	Recobrimentos da superfície das nanopartículas de magnetita	62
4.3.1	Recobrimento com aminopropiltrimetoxissilano (APTMS)	62
4.3.2	Recobrimento com metilpolietilenoglicol (MPEG)	66
4.3.3	Recobrimento com sílica	69
4.3.4	Recobrimento com quitosana	71
4.3.5	Recobrimento com carboximetildextrana	75
4.4	Curvas de magnetização de todas as amostras recobertas.....	78
4.5	Funcionalização das nanopartículas de magnetita com ácido fólico.....	79
5	Conclusões	83
6	Referências	85

1 Introdução

Nanopartículas magnéticas são de grande interesse para pesquisas incluindo uma vasta gama de áreas e disciplinas, tais como: catálise, biotecnologia/biomedicina, imagem por ressonância magnética, armazenamento de dados e desenvolvimento de fármacos. A aplicação nestas mais diversas áreas requer inicialmente que estas nanopartículas sejam estáveis em diferentes condições e por este motivo são desenvolvidos métodos de síntese a partir de várias técnicas e composições.^{1,2}

A síntese de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) com controle de tamanho possui interesses tecnológicos e científicos. A magnetita é um óxido de ferro comum, com estrutura cúbica de espinélio invertido, com o oxigênio formando um empacotamento denso fcc (cúbico de face centrada), e os cátions de Fe (Fe^{2+} e Fe^{3+}) ocupando os sítios intersticiais tetraédricos e octaédricos (Figura 1).³

Figura 1 - Estrutura cristalina da magnetita (Fe_3O_4) cúbica de espinélio invertido, com estaques as posições dos cátions de Fe e do oxigênio. Adaptado de³

Materiais magnéticos em escala nanométrica que apresentam magnetização apenas na presença de um campo magnético externo, mas que não apresentam magnetização de saturação nem coercividade quando ocorre a remoção do campo, são denominados superparamagnéticos. Esta é uma propriedade exclusiva de nanopartículas magnéticas, as quais melhoram a relaxação do próton em tecidos específicos servindo, por exemplo, como agentes de contraste em imagem por ressonância magnética. As nanopartículas magnéticas também podem ser utilizadas como mediadores de calor em tratamentos de hipertermia e como guia magnético em aplicações de liberação controlada de fármacos.^{4,5}

O uso de nanopartículas de magnetita apropriadamente recobertas em biomedicina está sendo intensificado. Com revestimentos adequados, estas nanopartículas podem ser dispersas em água, já que nanopartículas dispersas em soluções aquosas tem estabilidade através de repulsões

eletrostáticas ou estéricas. Como já citado, estas aplicações requerem que nanopartículas sejam superparamagnéticas e com tamanhos menores que 20nm, e sua distribuição de tamanho global seja estreita, de modo que as partículas tenham propriedades químicas e físicas uniformes.^{6,7}

1.1 Magnetismo

O fenômeno do magnetismo é conhecido há milhares de anos, e é consequência da existência dos movimentos dos elétrons nos átomos e seus consequentes momentos magnéticos nos átomos individuais. Os momentos magnéticos tem origem em duas fontes: movimento orbital do elétron em torno do núcleo, μ_o , e movimento de spin do elétron em torno do seu eixo de rotação, μ_s . (Figura 2)

Figura 2 - Momentos magnéticos atômicos associados com (a) movimento orbital e (b) movimento de spin eletrônico. Adaptado de ⁸

Em cada átomo individual, os momentos magnéticos de orbital e de spin do conjunto de todos os elétrons se acoplam, dando resultado ao cancelamento total ou a soma resultante destes momentos. O momento magnético total de um átomo multieletrônico, portanto, é a soma dos momentos magnéticos de todos os seus elétrons, incluindo dessa forma, as contribuições de spin e de orbital e levando-se em conta o cancelamento dos momentos. Com isso, o magnetismo observado nos átomos é uma consequência da existência ou não do cancelamento desses momentos, sendo que o não cancelamento leva ao momento magnético atômico resultante.^{8,9}

Em um átomo, segundo o princípio de exclusão de Pauli, somente dois elétrons de spins opostos, e consequentemente momentos magnéticos opostos, podem ser alocados em cada orbital, ou seja, os seus números quânticos magnéticos de spin, m_s , devem ser diferentes e seus momentos magnéticos cancelam-se. Assim, átomos que possuem subcamadas (s, p, d, f) completamente preenchidas e aqueles que em todos os elétrons estão emparelhados não manifestam um magnetismo permanente ou resultante. Por outro lado, segundo a regra de Hund, nos átomos que

não possuem a subcamada preenchida a distribuição eletrônica em uma mesma subcamada deve ser a que leve ao maior número de elétrons desemparelhados, pois esta configuração leva ao seu estado de menor energia. Por esta razão, átomos contendo a camada de valência parcialmente preenchida podem exibir um momento magnético permanente (Tabela 2). Embora isto ocorra para alguns átomos, tal explicação não pode ser aplicada como uma regra geral para definir seus comportamentos magnéticos, pois os elétrons de valência podem também interagir com outros elétrons de ligantes ou átomos vizinhos levando a um cancelamento parcial ou total dos momentos magnéticos.^{8, 9}

Tabela 1 - Distribuição eletrônica no estado fundamental para os átomos de ferro (Fe), cobalto (Co) e níquel (Ni) demonstrando a presença de elétrons desemparelhados e justificando seus comportamentos magnéticos

Átomo	Configuração Eletrônica					
Fe	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$
	[Ar]	$4s^2$	$4d^6$			
Co	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow$	$\uparrow$	$\uparrow$
	[Ar]	$4s^2$	$4d^7$			
Ni	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow$	$\uparrow$
	[Ar]	$4s^2$	$4d^8$			

1.1.1 Magnetismo em nanoescala

Uma das principais características das nanopartículas é o fato de que algumas das suas propriedades podem diferir significativamente das características apresentadas em um sólido estendido. Este comportamento é conhecido como “efeito de tamanho”. Para nanopartículas magnéticas, tem-se dois efeitos de tamanho mais estudados: limite de monodomínio e limite superparamagnético.¹

Em partículas grandes, observa-se uma estrutura composta por multidomínios magnéticos, sendo que todos estes são separados entre si por paredes de domínios (Figura 3). Estas paredes são formadas por um processo rígido de balanço de energia, que é diretamente proporcional ao volume dos materiais, e a energia de paredes de domínios (E), que é diretamente proporcional à área de interface entre os domínios. Ressalta-se que tal interface não é rígida, podendo sofrer processos de

rotação de orientação de momentos magnéticos se deslocando e modificando o tamanho dos domínios do longo do material.

Figura 3 - Representação da estrutura de domínios magnéticos aleatórios em um material policristalino constituído por multidomínios magnéticos, separados por paredes de domínios.

Este processo de formação dos domínios é governado pelo balanço energético entre a energia magnetostática, que é proporcional ao volume do material, e a energia de formação das paredes de domínio, que aumenta proporcionalmente com a área interfacial entre os domínios. Ao diminuir a dimensão destes materiais, a energia magnetostática também diminui até um determinado volume crítico, onde a partir deste ponto o custo energético de criação das paredes de domínio é maior que sustentar a energia magnetostática de um estado de monodomínio (*single-domain*, SD). Consequentemente, as nanopartículas possuem um diâmetro crítico, D_s , característico de cada material, onde abaixo desta dimensão as nanopartículas não mais exibem múltiplos domínios (MD) e passam a existir como SD¹. Abaixo deste volume crítico, se consome mais energia para criar uma parede de domínios do que suportar a energia magnetoestática do estado de monodomínio.

De maneira semelhante, a coercividade do material é dependente do seu tamanho⁸. Cada nanopartícula, individualmente, possui uma alta constante de momento magnético e se comporta como um grande átomo paramagnético, apresentando rápida resposta a um campo magnético aplicado, com remanência insignificante e coercividade. A remanência é o magnetismo residual que permanece no circuito magnético após a remoção do campo magnético externo aplicado, e coercividade é o campo que deve ser aplicado para que a magnetização seja igual a zero, neutralizando, dessa forma, qualquer magnetização remanente (Figura 4). Estas são as propriedades que tornam as nanopartículas superparamagnéticas muito atrativas para uma ampla gama de aplicações biomédicas devido ao baixo risco de formação de aglomerados a temperatura ambiente,

já que a ausência de remanência e coercividade minimizam efeitos de aglomeração por interações de acoplamento magnético.¹

Figura 4 - Curva teórica da magnetização versus campo magnético para nanopartículas superparamagnéticas (SPM) e ferromagnéticas (FM), onde o campo coercitivo (H_C), a magnetização de saturação (M_S) e da magnetização remanente (M_R) são parâmetros indicados⁵.

Observando a Figura 5, nota-se que na região de multidomínios, a coercividade intrínseca aumenta à medida que o diâmetro da partícula diminui. Assim, o número de domínios magnéticos diminui conforme se diminui o tamanho da partícula, e os poucos domínios tornam-se fortemente acoplados aumentando a coercividade intrínseca da partícula.

Figura 5 - Variação da coercividade intrínseca em função do diâmetro da partícula. Adaptado de⁸

Por dados experimentais, foi encontrado que para alguns materiais a dependência da coercividade intrínseca com o tamanho é dada aproximadamente pela Equação 1, onde a e b são constantes fenomenológicas⁸

$$H_{ci} = a + \frac{b}{D} \quad (\text{Eq. 1})$$

Abaixo do diâmetro crítico D_s , a partícula torna-se monodomínio e a coercividade atinge um máximo nesta faixa de tamanho. Nessa situação, cada partícula comporta-se como um pequeno imã e os acoplamentos interpartículas acontecem de forma que o alinhamento depende da rotação da partícula toda e não das paredes de domínio, que podem rotacionar gradativamente. Ao diminuir ainda mais o tamanho da partícula, abaixo do diâmetro crítico, a coercividade da partícula diminui à medida que o diâmetro da partícula diminui de acordo com a Equação 2, onde g e h são constantes:

$$H_{ci} = g - \frac{h}{D^{3/2}} \quad (\text{Eq. 2})$$

A coercividade é nula quando alcança o diâmetro crítico D_p . Nesta faixa de tamanho, as partículas são chamadas superparamagnéticas. Em partículas compostas apenas por um monodomínio, a energia anisotrópica magnética, responsável em manter o momento magnético estabilizado em uma determinada direção, é expressa pela Equação 3, na qual V é o volume da partícula, K_{ef} é a constante anisotrópica e θ é o ângulo entre a magnetização e o eixo de fácil magnetização:

$$E(\theta) = K_{ef}V \sin^2 \theta \quad (\text{Eq. 3})$$

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

1.2 Síntese de nanopartículas magnéticas

Encontra-se na literatura uma vasta gama de trabalhos referentes à síntese de nanopartículas magnéticas por diversos métodos. Isto ocorre a fim de que se desenvolvam metodologias para controle de forma e tamanho das nanopartículas, bem como sua estabilidade físico-química em um determinado meio. Entre as rotas sintéticas mais conhecidas estão os métodos de coprecipitação, decomposição térmica, microemulsão, métodos aerosol/vapor e síntese hidrotérmica, Tabela ¹.

Tabela 2 - Comparação entre os métodos de síntese de nanopartículas mais conhecidos

Método	Síntese	Temperatura de reação (°C)	Tempo de reação	Solvente	Agentes de superfície	Distribuição de tamanho	Controle de forma
Co-precipitação	Muito simples, condição ambiente	20-90	Minutos	Água	Necessário durante ou após reação	Relativamente estreita	Ruim
Decomposição térmica	Complicado, atmosfera inerte	100-320	Horas/dias	Orgânico	Necessário durante a reação	Muito estreita	Muito bom
Microemulsão	Complicado, condições ambiente	20-50	Horas	Orgânico/água	Necessário durante a reação	Relativamente estreita	Bom
Síntese hidrotérmica	Simple, altas pressões	220	Horas/dias	Água-etanol	Necessário durante a reação	Muito estreita	Bom

Observando-se os dados da Tabela 2, quatro métodos destacam-se, cada qual com suas particularidades, vantagens e desvantagens. Neste trabalho, pode-se ressaltar o método de decomposição térmica como sendo o principal.

Métodos químicos envolvendo decomposição térmica de precursores organometálicos têm demonstrado grande eficácia no controle de tamanho, morfologia, arranjos bi e tridimensionais, composição, entre outras propriedades desejadas das nanopartículas obtidas. Em sua grande maioria, tais métodos consistem na utilização direta ou com pequenas modificações do método conhecido como processo poliol.

O método poliol foi publicado inicialmente por Fiévet *et al.*¹⁰ na síntese de nanopartículas através da utilização de etilenoglicol na redução de íons metálicos em altas temperaturas. Mas este método ficou realmente conhecido após os trabalhos de Sun, S. *et al.*^{11,12}, em que o etilenoglicol foi substituído por um alcanodiol de cadeia longa (1,2-hexadecanodiol), e baseia-se na decomposição térmica de um composto organometálico contendo o metal e/ou metais de interesse em um solvente orgânico com alto ponto de ebulição e na presença de surfactantes permitindo a obtenção de nanopartículas monodispersas. Entre os precursores metálicos mais utilizados atualmente encontram-se os acetilacetatos metálicos e carboníis metais, sendo que ácidos graxos, tais como: ácido oléico, oleilamina e hexadecilamina são frequentemente utilizados como surfactantes¹.

Atualmente existem muitas variantes do método poliol e suas modificações são feitas principalmente na substituição dos precursores metálicos carbonílicos por precursores de menor toxicidade. Além disso, existe uma dificuldade associada à utilização de compostos carbonílicos em sínteses como estas que requerem altas temperaturas, que é a volatilidade destes compostos, pois parte do reagente adicionado à síntese acaba não participando da reação, dificultando assim o controle sobre a composição das partículas. Neste ponto reside a maior vantagem da utilização de sais acetatos e acetilacetatos como precursores metálicos, uma vez que por apresentarem

volatilidade desprezível, o controle sobre a composição do produto final é amplamente facilitado. Seguindo esta linha de pesquisa, inúmeros trabalhos já foram publicados acerca da utilização de acetatos e acetilacetoados, como os descritos por Varanda, L.C.^a Sun, S. *et al.*¹³, Yu, W.W. *et al.*¹⁴ Whang, C.; Sun, S.¹⁵, dentre outros.

Os fatores determinantes neste método de síntese são o controle e a separação das fases de nucleação (formação inicial dos *clusters* atômicos de forma homogênea) e o crescimento. Tendo como base o diagrama de LaMer e Dinegar (Figura 6), alcança-se a monodispersividade quando, primeiramente, a nucleação ocorre rapidamente em um curto período de tempo, através de uma solução supersaturada seguida de uma etapa de crescimento lenta sem que ocorra nucleação significativa novamente. Tal mecanismo favorece a formação de nanopartículas relativamente pequenas e monodispersas (processo I). Porém, partículas uniformes, mas com tamanhos maiores, também podem ser obtidas por múltiplas nucleações através de processos em que pequenas partículas se dissolvem para posterior redeposição sobre a superfície das partículas maiores, processo este conhecido por envelhecimento de Ostwald (processo III). Por este motivo, controla-se o tempo de síntese e interrompe-se após a formação das partículas, para evitar que ocorram processos de envelhecimento e agregação (processo II), é possível evitar a ocorrência de polidispersividade do sistema.^{1, 16, 17}

Figura 6 - Ilustração do mecanismo de formação de partículas uniformes baseado no modelo clássico de LaMer e Dinegar. Adaptado de¹⁶

1.3 Engenharia de superfície de nanopartículas magnéticas

Para realizar um monitoramento em tempo real e um tratamento medicamentoso com alta precisão, frequentemente associa-se nanopartículas magnéticas aos agentes com alvos específicos, fármacos e outros grupos funcionais aderidos ou ligados à superfície do mesmo. Embora uma série

de métodos tenha sido desenvolvidos para a síntese de nanopartículas magnéticas de diversas composições, a aplicação bem sucedida de tais nanopartículas em áreas médicas é altamente dependente da estabilidade das partículas em uma gama de diferentes condições impostas pelo meio em que são utilizadas e por isso a necessidade da associação à grupos funcionais aderidos ^{1, 18}. A escolha química é ditada, em parte, pelas propriedades químicas e grupos funcionais encontrados na superfície da nanopartícula magnética e também pelo ligante a ser conjugado. O principal objetivo é vincular as biomoléculas, ou grupo terapêutico, sem comprometer sua funcionalidade quando conjugadas nas superfícies das nanopartículas. A funcionalidade em tais sistemas é conduzida pela natureza do ligante (por exemplo, a conformação de biomoléculas) e a maneira pela qual é conjugado. Por exemplo, se um anticorpo é ligado à nanopartícula de tal forma que seu local de reconhecimento é blindado, pode perder sua capacidade de vincular-se a um alvo específico.¹⁹

Ligações covalentes são ligações fortes e estáveis, que podem ser formadas especificamente entre os grupos funcionais, normalmente aminoácidos, ácidos carboxílicos e tióis e os grupos encontrados na superfície das nanopartículas. Normalmente, os grupos funcionais são adicionados através de modificação de superfície, que pode conduzir o tipo e o número de grupos funcionais em cada NP. Interações físicas incluem interações eletrostáticas e hidrofílicas/hidrofóbicas.²⁰

1.4 Recobrimentos com macromoléculas e aplicações em biomedicina

No sistema de transportadores em escala nanométrica, nanopartículas alvo podem entregar um fármaco diretamente às células doentes, resultando em melhor eficácia e em menos efeitos colaterais aos pacientes com relação à quimioterapia no caso de câncer, por exemplo. Vale lembrar que este desafio é interdisciplinar, envolvendo físicos, químicos, biológicos, farmacologistas, e assim por diante. Estas áreas devem colaborar para desenvolver tais sistemas de transporte em meio coloidal com características fisiológicas.²¹

Nanopartículas monodispersas podem, como exemplo, serem revestidas com um hidrocarboneto de cadeia longa, levando a uma superfície hidrofóbica. Para tornar estas nanopartículas biocompatíveis, a fim de torná-las assim úteis para aplicações biológicas, suas superfícies são frequentemente funcionalizadas por meio da adição de surfactantes ou através da troca do surfactante, conforme mostrado na Figura 7 conferindo um caráter hidrofílico ao sistema nanoparticulado.¹⁸

Figura 7 - Modificação da superfície de uma nanopartícula pelo processo de troca de ligantes.
Adaptado de ¹⁸

Um surfactante iônico consiste de uma molécula que contém um segmento hidrofóbico e um componente hidrofílico. O segmento hidrofóbico forma uma estrutura de dupla camada com a cadeia de hidrocarbonetos original, enquanto os grupos hidrofílicos são expostos para o exterior das nanopartículas, o que permite sua dispersão em meio aquoso. A troca de surfactante é a substituição direta do surfactante original por um novo surfactante bifuncional. Este novo surfactante por sua vez tem um grupo funcional capaz de ligar-se a superfície da nanopartícula através de uma forte ligação química e o outro grupo funcional tem um lado polar de modo que a nanopartícula pode ser dispersa em água, ou sofrer funcionalizações adicionais¹⁸. Surfactantes e/ou polímeros são utilizados frequentemente para “passivar” a superfície das nanopartículas, durante ou após a síntese evitando sua aglomeração. As propriedades das partículas magnéticas são os principais fatores para a determinação da estabilidade coloidal, incluindo todas as modificações de superfície que visem promover maior afastamento das nanopartículas e/ou aumentar o tempo na qual a mesma permanece em suspensão. As principais medidas usadas para melhorar a estabilidade de ferrofluidos, por exemplo, são o controle da superfície carregada (repulsão eletrostática) e a utilização de tensoativos específicos (repulsão estérica).²²

Existem vários tipos de materiais que podem ser selecionados para realizar-se o revestimento de nanopartículas, tais como polímeros de lipídios, proteínas, dendrímeros, gelatina,

dextrana, quitosana, polietilenoglicol (PEG), polietileno-co-acetato de vinila, polivinilpirrolidona (PVP), PLGA, ou poliálcool vinílico (PVA), os quais são frequentemente utilizados para esta finalidade^{23, 24, 25}. Moléculas especiais, tais como ácido 2,3-dimercaptosuccínico bifuncional (DMSA)²⁶, dopamina^{27, 28} e silanos²⁹ também foram estudados para a funcionalização das nanopartículas. Exemplos a serem citados mostram que a dopamina recobre firmemente a superfície da nanopartículas de Fe₃O₄²⁷. Silanos foram empregados para a troca de ligantes hidrofóbicos na estrutura da ferritas magnéticas²⁹. O grupo terminal dos silanos (incluindo isociano, acrilato, tiol, amino e grupos carboxílicos) oferece extensão química na modificação de nanoestruturas. Além de PEG, quitosana³⁰, alginato³¹ e dextrana^{32, 33}, podem ser utilizados para estabilizar nanoestruturas e oferecendo estabilidade em longo prazo, além de permitir a biocompatibilidade das nanopartículas.

Desta forma, a escolha do material a ser utilizado no recobrimento das partículas deve ser feita conforme a aplicação a qual se destina o produto final. Neste contexto, a literatura apresenta inúmeras estratégias de recobrimento com materiais inorgânicos, poliméricos, surfactantes e biológicos. Os surfactantes, como já dito, são normalmente empregados juntamente com macromoléculas e/ou polímeros para melhorar a dispersão das partículas e possibilitar a inclusão de grupos funcionais terminais^{1,34}. Nesse grupo merecem destaque a dodecilamina³⁵, oleato de sódio^{35,36} e carboximetilcelulose de sódio^{1, 29}. Na Tabela 3 são apresentados os polímeros e as macromoléculas mais utilizados no recobrimento de nanopartículas magnéticas e suas respectivas características/funções.

Tabela 3 - Exemplos de substâncias biocompatíveis utilizadas no recobrimento de nanopartículas magnéticas. Adaptado de ¹.

Espécie/Referência	Vantagens
Polietilenoglicol (PEG)	Biocompatibilidade, tempo de circulação no sangue, acesso ao interior da célula
Dextrana	Melhora o tempo de circulação no sangue e estabiliza a suspensão coloidal
Polivinilpirrolidona (PVP)	Melhora o tempo de circulação no sangue e estabiliza a suspensão coloidal
Polivinil álcool (PVA)	Previne a coagulação de NANOPARTÍCULA e aumenta o caráter monodisperso
Poli-peptídeos	Bom para células biológicas, por exemplo, ligantes-alvo de células
Poli(D,L-lactídeo)	Biocompatível, baixa citotoxicidade
Poli(N-isopropilacrilamida)	Atua no transporte de drogas termo-sensíveis e separação de células
Quitosana	Polímero linear catiônico amplamente utilizado em sistemas de liberação de genes não-virais, biocompatível, hidrofílico.

Adicionalmente, como já mencionado, pode ser realizado um novo recobrimento sobre o núcleo magnético previamente recoberto, com moléculas biológicas tais como: anticorpos, proteínas, diversos agentes terapêuticos, DNA/RNA mediadores, agentes facilitadores de

permeação, fármacos, etc³⁷ conferindo novas características e propriedades ainda mais específicas como biosseletividade e/ou funcionalidade às nanopartículas. Essas funcionalizações adicionais permitem que as nanopartículas passem a reconhecer especificamente a membrana de determinadas células ou grupos ativos de certas proteínas. As novas moléculas presentes no recobrimento são denominadas de ligantes funcionais³⁸, cuja eficiência dos processos para os quais as mesmas são utilizadas parece depender intimamente da natureza e de um rigoroso controle da quantidade dessas biomoléculas presentes na superfície das nanopartículas magnéticas. O controle necessário vem sendo investigado através da incorporação das moléculas em nanoestruturas classificadas como camada-sobre-camada (*layer-by-layer*)^{38, 29}. A presença dessas moléculas com funções específicas leva a uma classe ainda mais abrangente de nanopartículas multifuncionais, conforme mostrado na Figura 8.

Figura 8 - Esquema mostrando uma nanopartícula magnética com diversos ligantes funcionais possibilitando multifuncionalidade numa única nanopartícula. Adaptado de ⁴⁰

A abundância de grupos amino livres na estrutura linear da quitosana promove uma reticulação iônica com íons multivalentes, permitindo que as ligações químicas com moléculas diferentes que podem atuar como vetores. Por exemplo, o ácido fólico pode ser conjugado com a quitosana para atingir as propriedades de segmentação. A conjugação de folato para quitosana pode melhorar a transfecção de genes ou a promover a eficiência da internalização devido à absorção de folato promovida pelos receptores das células tumorais. Folatos, embora presentes em quantidades anormalmente elevadas em células cancerígenas, são raramente encontrados em superfícies de células normais. Além disso, os conjugados de folato derivado covalentemente através do seu

grupo γ -carboxila, podem reter a propriedade de elevada afinidade de ligação ao ligante do folato, e a cinética de absorção celular por receptores de folato de compostos de folato conjugados se assemelham à de folato livre. O ácido fólico é considerado um ligante alvo para alguns tipos de células cancerosas, devido aos elevados níveis de receptores folatos contidos nestas, especialmente em câncer de ovário. Em contraste, a quantidade de receptores folato é comparativamente baixa em tecidos normais, um fato que faz uma abordagem seletiva de células positivas para receptores folato, o que permite a prevenção de efeitos colaterais em tecidos saudáveis.^{41, 21}

Como o ácido fólico é estável, não imunogênico e possui baixo valor comercial, além de ter uma curta cadeia e um pequeno tamanho comparado com alguns anticorpos, ele é escolhido para sistemas multifuncionais, tendo células cancerígenas como alvo⁴². A Figura 9 mostra um diagrama do processo de endocitose mediada pelo receptor folato das nanopartículas nas células alvo. Fármacos, macromoléculas ou nanopartículas contendo o ácido fólico conjugados via grupo γ -carboxílico ligam-se ao receptor de folato das células cancerígenas com afinidade igual à do ácido fólico livre. Após o processo de endocitose e do tráfego vesicular, grande parte do material (fármacos, macromoléculas ou nanopartículas) é liberado no citoplasma da célula. O receptor de folato sem ligação, em seguida, pode reciclar e voltar para a superfície da célula⁴³. As moléculas do ácido fólico podem ser conjugadas na superfície das nanopartículas via adsorção física⁴⁴, ligação iônica⁴⁵ e ligação covalente^{46, 47}. Ligações covalentes de moléculas ou fármacos no sistema das nanopartículas são normalmente favorecidas devido à diferença na força de ligação. A ligação covalente entre a superfície da nanopartícula e o ácido fólico é preferida e pode ser realizada via ligação peptídica⁴⁸. Funcionalizando a superfície das nanopartículas através de uma ligação covalente, a liberação do ácido fólico em condições intravenosas não ocorrerá antes de atingir o alvo específico. A clivagem da ligação amida ocorre sob as condições no compartimento lisossômico, ou seja, baixo pH e na presença de lisoenzimas, um ambiente típico no interior das células cancerígenas.⁴⁹

Figura 9 - Representação por diagrama do processo de endocitose mediada pelo receptor folato. Adaptado de ⁴³

Com grande potencialidade para aplicações biomédicas, as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, em especial a magnetita (Fe_3O_4) e a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) têm sido extensamente estudadas devido à baixa toxicidade ⁴⁰ quando comparada as nanopartículas magnéticas de composição somente metálica. Vários trabalhos mostram a utilização dos óxidos magnéticos funcionalizados e indicam uma área bastante abrangente de investigação. Poucos trabalhos de aplicação, por outro lado, inferem que a utilização dos óxidos torna-se muito limitada devido a relativamente baixa magnetização da nanopartícula a qual é da ordem de $300\text{-}400\text{ emu/cm}^3$. Esses valores diminuem ainda mais, já que ligantes orgânicos ou matrizes inorgânicas, como sílica, utilizados para recobrir e estabilizar as nanopartículas tem influência direta sobre a magnetização de saturação, uma vez tais compostos são diamagnéticos ou não magnéticos. Adicionalmente, também podem modificar a anisotropia magnética de superfície e todos esses fatores tendem a diminuir o momento magnético resultante. ^{36, 50} Entretanto, as nanopartículas magnéticas na forma de óxidos ainda constituem um sistema modelo para estudos de engenharia de superfície visando melhorar as propriedades de recobrimento, biocompatibilidade e biosseletividade. Em detrimento de baixos valores de magnetização, esta escolha está intimamente ligada a fatores como: (i) baixo custo de produção frente à nanopartículas metálicas, (ii) maior estabilidade química frente à oxidação, (iii) menor toxicidade e (iv) facilidade dos processos de síntese. Todos os processos desenvolvidos para

as nanopartículas na forma de óxido, no entanto, podem ser futuramente aplicados em nanopartículas magnéticas com valores de magnetização otimizados empregando técnicas de substituição de ligantes de superfície diretamente ou através do controle de oxidação da superfície de nanopartículas metálicas conferindo propriedades dos óxidos na camada de átomos mais externa da mesma. Assim, atualmente, um dos maiores desafios para o desenvolvimento e a aplicação de nanopartículas magnéticas em áreas biomédicas reside no desenvolvimento de rotas eficazes na modificação e funcionalização de superfície.

2 Objetivos

Desenvolver e adequar processos de síntese e recobrimento de nanopartículas magnéticas, utilizando-se diferentes macromoléculas, tais como: carboximetildextrana, metilpolietilenoglicol (MPEG) e quitosana, além de compostos inorgânicos como sílica, a fim de obter melhores condições de biocompatibilidade e multifuncionalidade.

Desenvolver novas metodologias que tornem a superfície das nanopartículas magnéticas hidrofílicas, a fim de posteriormente realizar-se os recobrimentos desejados.

Modificar e caracterizar a superfície de nanopartículas de magnetita sintetizadas pelo método poliol modificado, avaliando os aspectos magnético, químico, estrutural e funcional frente aos efeitos das macromoléculas na superfície; e após o seu recobrimento, avaliando-se assim nos aspectos magnético, químico, estrutural e funcional frente aos efeitos das macromoléculas em sua superfície.

Promover a funcionalização adicional das nanopartículas com 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTMS) após estarem recobertas, de modo a se obter sistemas multifuncionais que permitam a ligação de ligantes-alvo como ácido fólico via formação de ligações peptídicas. Avaliar a eficiência do recobrimento realizado nesta etapa nas funcionalizações e aplicações biomédicas na tentativa de obter melhor controle quanto à biosseletividade desejada para aplicações em detecção e tratamento de células cancerígenas e realce de imagens por ressonância magnética nuclear.

3 Procedimento experimental

Foram realizadas sínteses de nanopartículas de magnetita e seus subsequentes recobrimentos. Assim, a nomenclatura dada para cada amostra foi realizada da seguinte forma:

 M01A

 Número da síntese de magnetita

 etapa de recobrimento

3.1 Síntese das nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) por decomposição térmica

Todas as sínteses de Fe_3O_4 foram realizadas em um sistema conforme mostrado na Figura 10.

Figura 10 - Representação do esquema de aparato experimental utilizado na síntese de nanopartículas magnéticas.

O procedimento foi realizado sob atmosfera de gás inerte (N_2) (1), em sistema de refluxo composto por: balão de três bocas (2) e condensador de *Grahan* (3). Para o aquecimento, foi utilizada uma manta de aquecimento (4) ligada a um controlador de temperatura (5), sendo esta

controlada através de um termopar (6) imerso no meio reacional. A homogeneização foi controlada utilizando uma barra magnética e um agitador magnético.

3.1.1 Síntese de magnetita 12 nm (M01)

A síntese para produzir nanopartículas de magnetita com tamanho aproximado de 12 nm foi realizada tendo como referência a publicação de Jin-Woo Cheon *et al.*⁵¹, e está esquematizada no fluxograma mostrado na Figura 11. Em um sistema como o descrito na Figura 10, foi adicionado 6,0mmol de nitrato de ferro(III) ($\text{Fe}_2(\text{NO}_3)_3$), 10,0 mL de octiléter, 1,10 mmol de ácido oleico e 2,00 μmol de oleilamina. O sistema foi mantido em refluxo sob agitação magnética e primeiramente foi aquecido conforme o esquema de rampa de aquecimento descrito na Figura 12, garantindo assim total homogeneização e decomposição do precursor de síntese. As nanopartículas foram então lavadas com hexano e etanol e centrifugadas por várias vezes até obter-se sobrenadante incolor. Posteriormente, as nanopartículas obtidas foram armazenadas em hexano.

Figura 11 – Procedimento experimental utilizado para síntese de magnetita com tamanho aproximado de 12nm.

Figura 12 – Esquema de rampa de aquecimento utilizado para o experimento de síntese de magnetita de 12nm (M01)

3.1.2 Síntese de magnetita utilizando-se oleilamina como agente redutor e solvente (M02)

Esta síntese foi feita com base nos estudos de Zhichuan Xu *et al.*⁵² e seu procedimento experimental está representado no fluxograma mostrado na Figura 11. Em um balão de 3 bocas foram adicionados 1,50 mmol de acetilacetionato de ferro(III) e 15,0 mL de oleilamina. Esta mistura foi mantida em sistema de refluxo, sob agitação magnética, em aparato como mostrado na Figura 10. O ciclo de temperatura utilizado para a síntese é esquematizado na Figura 14. Após ser resfriada a temperatura ambiente, a mistura foi lavada com hexano e etanol, centrifugada por três e então as nanopartículas foram armazenadas dispersas em hexano.

Figura 13 – Procedimento experimental para síntese de nanopartículas de magnetita utilizando-se a oleilamina como agente redutor e como solvente.

Figura 14 – Esquema de rampa de aquecimento utilizado para o experimento de síntese de magnetita utilizando-se oleilamina como redutor e solvente (M02)

3.1.3 Síntese de magnetita utilizando-se do método do poliol modificado (M03)

A síntese de magnetita de acordo com o método do poliol modificado foi baseada nos procedimentos já realizados pelo grupo de pesquisa e é esquematizada no fluxograma da Figura 15. Neste caso, a síntese foi realizada com diminuição da quantidade de surfactante no meio reacional para que pudesse se observar seu efeito na morfologia e no tamanho das nanopartículas resultantes. Em um balão de 3 bocas foram adicionados: 0,720g de hexadecanodiol, 0,1786g de acetilacetato de ferro (III), 1,050mL de ácido oleico, 1,410mL de oleilamina e 20,20mL de benziléter. Logo, havia o dobro da quantidade de oleilamina e benziléter no meio. A solução foi mantida em sistema de refluxo e sob agitação magnética. O ciclo de temperatura utilizado é mostrado na Figura 16. Após resfriada a temperatura ambiente, a mistura foi lavada com hexano e etanol e centrifugada e armazenada dispersa em hexano.

Figura 15 – Fluxograma da síntese do poliol modificado para produção de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 .

Figura 16 – Esquema de rampa de aquecimento utilizado para a síntese de nanopartículas via síntese do poliol modificado(M03).

3.1.4 Síntese de magnetita utilizando-se do método do poliol modificado (M04)

Esta síntese também foi realizada segundo o método do poliol modificado, com procedimento esquematizado segundo a Figura 13. Foi feita com 1,00 mmol de acetilacetato de ferro(III), 5,00 mmol de 1,2-hexadecanodiol, 3,00 mmol de ácido oleico, 3,00 mmol de oleilamina e 20,20mL de benziléter. A rampa de aquecimento utilizada é mostrada na Figura 16. Após resfriamento até temperatura ambiente, a suspensão de nanopartículas foi lavada e centrifugada com etanol, e posteriormente estocada em hexano.

As nanopartículas de magnetita utilizadas no decorrer do projeto foram sintetizadas conforme esta metodologia.

3.2 Hidrofilização da superfície da magnetita através da troca de ligantes

3.2.1 Hidrofilização da superfície da magnetita por método de ultrassom

3.2.1.1 Em meio básico

O procedimento para obter nanopartículas de magnetita com superfície de natureza hidrofílica foi feito com alíquota de 16mg de nanopartículas dispersas em hexano, 32 mg de ácido aminocapróico e 6,5 mL de solução de NaOH com pH final de aproximadamente 13. Inicialmente, em um béquer, o ácido aminocapróico foi solubilizado na solução de NaOH sob constante agitação e à solução resultante foram adicionada as nanopartículas dispersas em hexano. O sistema foi mantido em ultrassom por aproximadamente 90 minutos. A suspensão obtida foi então lavada com etanol e centrifugada em 10000 rpm por 10 minutos. Este procedimento foi repetido por mais uma

vez utilizando-se etanol, e depois por duas vezes utilizando-se água. Após redispersas, as nanopartículas foram armazenadas em água.

3.2.1.2 Em meio ácido

O procedimento para se obter superfície hidrofílica em meio ácido foi baseado no procedimento descrito anteriormente utilizando-se meio básico. Foram utilizados 10 mg de nanopartículas, que foram posteriormente adicionadas a uma solução de 20mg de ácido aminocaprílico em 6,5 mL de ácido clorídrico em 0,1 mol.L⁻¹. A mistura foi mantida em ultrassom por aproximadamente 3 horas, lavada e centrifugada com água, e posteriormente redispersa e estocada em água. Adicionalmente, foi realizada uma outra metodologia, semelhante aquela descrita acima, porém no meio reacional foram adicionados 5,0 mg de cloreto de sódio. A mistura foi mantida em ultrassom por aproximadamente 3 horas, lavada e centrifugada com água, e posteriormente redispersa e estocada em água.

3.2.2 Hidrofilização da superfície da magnetita via agitação mecânica

Este procedimento para superfície hidrofílica foi realizado substituindo o solvente, que nos procedimentos descritos em 3.2.1. foi água, por dimetilsulfóxido (DMSO). Para este procedimento, foi utilizada uma alíquota de 15,0 mg de nanopartículas, 30,0 mg de ácido aminocaprílico, 10,0 mL de DMSO e 10mL de solução de NaOH 0,5mol.L⁻¹. A mistura foi mantida em um frasco fechado, com agitação rotativa constante por 72 horas.

Outro teste foi realizado utilizando-se o meio de clorofórmio. Adicionou-se em um erlenmeyer uma alíquota de aproximadamente 5mg de nanopartículas, juntamente com 20,0 mg de ácido aminocaprílico, 2,0 mL de ácido aminocaprílico, 2,0 mL de NaOH 0,5mol.L⁻¹, 2,0 mL de clorofórmio e 2mL de isopropanol. O sistema foi mantido em agitação magnética por 72 minutos.

3.3 Recobrimentos das nanopartículas de magnetita

3.3.1 Recobrimento com aminopropiltrimetoxisilano (APTMS)

3.3.1.1 Recobrimento com APTMS (M03A)

O recobrimento com APTMS é um procedimento realizado de acordo com o trabalho de Mikhaylova *et al.*². Em um aparato como o esquematizado na Figura 17, uma alíquota de 5,0 mL com concentração de nanopartículas de 10,0 mg.mL⁻¹ foi dispersa em mistura metanol/tolueno

(1:1v/v) e posteriormente aquecida a 95°C, em atmosfera de N₂, até a evaporação de 50% do volume inicial. Em seguida, ajustou-se o volume adicionando-se metanol, e este passo foi repetido por três vezes. Posteriormente, a mistura foi aquecida e mantida sob agitação magnética a 100°C por 12 horas, porém nesta etapa o sistema foi mantido tampado devido a constante atmosfera de N₂. Após este período, foi adicionada solução de 500µL de APTMS em tolueno e manteve-se sob agitação por 10 horas a 100°C. As partículas foram lavadas e centrifugadas com etanol e água e armazenadas em água.

Figura 17 - Aparato experimental utilizado no recobrimento das nanopartículas com APTMS.

3.3.1.2 Recobrimento com APTMS via troca de ligantes (M06A)

Uma alíquota de 50mg de nanopartículas foi dispersa em 10,0 mL de mistura metanol/tolueno (1:1 v/v) e foi então aquecida a 95°C, até evaporação de 50% do volume inicial. Em seguida, ajustou-se o volume adicionando-se metanol, e este passo foi repetido por três vezes. A solução resultante foi então transferida para um erlenmeyer e redispersa em 25,0 mL de hexano. Adicionou-se, então, 50µL de ácido acético e homogeneizou-se a solução. Posteriormente, adicionou-se lentamente 2,0 mL de APTMS, sob constante agitação, que foi mantida a temperatura ambiente por 12 horas. A suspensão resultante foi então lavada com etanol e água em funil de decantação e posteriormente centrifugada e armazenada em água.

3.3.2 Recobrimento com metilpolietilenoglicol (MPEG)

3.3.2.1 Recobrimento com MPEG (M03B)

Este recobrimento com MPEG é uma sequência do procedimento descrito no item 3.3.1.1. Após as 10 horas de agitação a 100°C, as nanopartículas foram levadas para banho de ultrassom por 2 minutos juntamente com uma solução de MPEG (em meio alcoólico) e tolueno com proporção

1:1 (v/v). Ao todo, esta solução possuía 2,5% (m/v) de MPEG em álcool etílico. O sistema foi mantido sob agitação magnética por 13 horas. Posteriormente, a suspensão foi lavada e centrifugada com alíquotas de etanol e água, e armazenada em água.

3.3.2.2 Recobrimento com MPEG após troca de ligantes (M06B)

Após o procedimento descrito no item 3.3.1.2, foi realizado o recobrimento com MPEG sobre a superfície já recoberta com APTMS. Para isso, partiu-se de uma alíquota de 50,0 mg de nanopartículas recobertas e uma solução 3,0% (m/v) de MPEG em etanol a 85°C por cerca de 30 minutos e levadas a banho de ultrassom por 2 minutos, juntamente com a solução de MPEG em álcool etílico e tolueno com proporção 1:1 (v/v). A mistura foi agitada por 14 horas a temperatura ambiente e posteriormente lavada e centrifugada com etanol e água.

3.3.3 Recobrimento com sílica

O recobrimento com sílica foi feito através de um método muito difundido na literatura, que é o método de microemulsão, e com base nos trabalhos já realizados no grupo de pesquisa. Em um erlenmeyer contendo 85,0 mL de ciclohexano, foram adicionados 4mL de Igepal CO-520, agitando-se por 5 minutos a fim de homogeneizar-se a mistura. Adicionou-se então uma alíquota de concentração 10,0 mg/mL de nanopartículas dispersas em ciclohexano ao sistema, juntamente com 0,6 mL de NH₄OH. A reação então foi mantida por 3 minutos e após, adicionou-se de forma lenta e homogênea 0,7 mL de tetraetilortosilicato (TEOS, precursor da camada de sílica). A mistura reacional foi mantida sob constante agitação por 72 horas. Posteriormente, lavou-se e centrifugou-se com etanol e as nanopartículas foram dispersas e armazenadas em isopropanol.

3.3.4 Recobrimento com quitosana

3.3.4.1 Recobrimento com quitosana utilizando magnetita recoberta com APTMS

Este procedimento foi adaptado do trabalho de Jingmiao Qu *et al.*⁵³. Em um erlenmeyer, foram adicionados 75mg de nanopartículas recobertas com APTMS e dispersas em água, de acordo com o item 3.3.1.2 deste trabalho, 200µL de ácido acético, 5,0 mL de água e 25,0 mg de quitosana. A mistura foi então colocada em ultrassom por 2 minutos, e posteriormente agitada por 20 min, para que pudesse então ser aquecida a 40°C para a adição de 100 µL de glutaraldeído 25%. O sistema foi mantido sob agitação magnética por 3 horas, a 40°C. Após resfriado a temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada e lavada com etanol e água, e armazenada em água.

3.3.4.2 Recobrimento com quitosana utilizando magnetita com ácido aminocapróico

Foi realizado um experimento em que a ligação da quitosana na superfície foi feita sob a magnetita recoberta com o ácido aminocapróico (procedimento descrito em 3.2.1.1). Desta forma, 75,0 mg de nanopartículas foram adicionadas a uma solução contendo 6,1 mL de NaOH $0,1\text{mol.L}^{-1}$ e 150,0 mg de ácido aminocapróico. A suspensão foi mantida em ultrassom por 90 minutos, posteriormente lavada com água e centrifugada. Estas nanopartículas recobertas com ácido aminocapróico, suspensas em água, foram então transferidas para um erlenmeyer, onde foram adicionados 25,0 mg de quitosana, 200 μL de ácido acético glacial, e o volume foi ajustado a 5,0 mL de água. Esta mistura foi mantida em ultrassom por 2 minutos, posteriormente sob agitação por 20 minutos, e aquecida a 40°C . Após o aquecimento, adicionou-se 100 μL de glutaraldeído 25%. Assim, o sistema foi mantido sob agitação a 40°C por 180 minutos. As partículas foram então lavadas com etanol por duas vezes, e com água também por duas vezes, redispersas e estocadas em água.

3.3.5 Recobrimento com carboximetildextrana

O recobrimento das nanopartículas de magnetita foi realizado com base na publicação de Bautista *et al.*⁵⁴. Inicialmente, uma massa de 50mg de nanopartículas já com a sua superfície hidrofílica (conforme procedimento 3.2. descrito anteriormente) foi dispersa em 5,0 mL de solução alcalina de NaOH de pH= 13,7 em um erlenmeyer e mantidos em ultrassom por 5 minutos. Separadamente, uma solução de 1% (m/v) de carboximetildextrana em NaOH. Logo após, a dispersão de nanopartículas foi lentamente adicionada a solução de carboximetildextrana, e a suspensão obtida foi transferida para uma célula de sonicação, onde foi mantida por 12 horas, com temperatura constante de 30°C devidamente mantida por um banho de fluxo constante de água. A programação da célula de fluxo foi: pulso de 10s, pausa de 50s, com amplitude máxima (100%). Foram realizadas lavagens com água, e posteriores centrifugações. A fim de se comparar a eficácia das lavagens, foi realizada a diálise em uma amostra.

3.4 Funcionalização das nanopartículas de magnetita com ácido fólico

3.4.1 Quantificação da concentração dos grupos amina livres na superfície das nanopartículas sintetizadas

Para determinar a densidade dos grupos amina na superfície das nanopartículas preparadas, utilizou-se o método proposto por Moon *et al.*⁵⁵, que consiste na reação entre um aldeído e grupos

amina na superfície das nanopartículas, formando ligações tipo iminas. Iminas são instáveis em meio aquoso e são facilmente hidrolisadas para formar novamente o aldeído e a amina. Assim, a determinação por espectroscopia UV ($\lambda_{\text{max}} = 267 \text{ nm}$) do aldeído após a hidrólise das iminas permite a determinação indireta da concentração de aminas na superfície das nanopartículas. Nas Figuras 18 e 19 é esquematizado o mecanismo da formação de imina.

Figura 18 - Esquema do mecanismo da reação entre benzaldeído e amina para a formação de imina na superfície de NP funcionalizadas com alcoxissilanos.⁵⁶

Figura 19 - Esquema mecanístico da reação de hidrólise da ligação imina ⁵⁶

A determinação do grupo amina livre procedeu-se da seguinte forma: pesou-se aproximadamente 2 mg das amostras recobertas com APTMS em um frasco tipo “ependorf”. Em seguida, adicionou-se 1,0mL da solução de acoplamento (SOLUÇÃO 1: 5×10^{-3} mol L⁻¹ de 4-nitrobenzaldeo em solução de etanol absoluto e ácido acético (0,8% v/v)).

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

Para a quantificação da concentração do teor de aminas na superfície das NPs, a curva padrão de absorção UV de 4-nitrobenzaldeo em solução de água, etanol absoluto e ácido acético (0,8% v/v) foi utilizada (Figura 20). O comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) do 4-nitrobenzaldeo foi determinado tendo-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 a massa das amostras e o volume da

solução utilizado nas medidas de absorvância, foi possível determinar indiretamente a concentração de amina em função da massa da amostra.

Figura 20 - Curva de calibração com diferentes concentrações de nitrobenzaldeído para determinação da concentração de amina livre.

3.4.2 Recobrimento das nanopartículas com ácido fólico

3.4.2.1 Procedimento 1

Foram utilizados 50 mg de nanopartículas já recobertas com APTMS, segundo o procedimento 3.3.1.2, dispersas em 10,0 mL de água. O pH foi então ajustado a 4,5 com solução de HNO_3 com concentração $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Separadamente foram preparados 10,0 mL de uma solução aquosa contendo quantidades iguais (100 mg) de ácido fólico, N-hidroxissuccinamida (NHS) e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Esta solução foi adicionada à dispersão de nanopartículas e o sistema foi mantido sob agitação magnética por 24 horas. As nanopartículas recobertas foram lavadas da seguinte forma: foi realizada uma lavagem com etanol por centrifugação, então o sobrenadante foi retirado e as nanopartículas redispersas com uma quantidade mínima de água; adicionou-se etanol em excesso e lavou-se por centrifugação; o processo foi repetido por 4 vezes.

3.4.2.2 Procedimento 2

Para a funcionalização da superfície das nanopartículas com ácido fólico utilizou-se o procedimento das carbodiimidas. Os reagentes utilizados foram: solução aquosa de 1% (m/v) de ácido fólico, 4% (m/v) de EDC, 1% (m/v) de NHS.

A reação de formação da ligação amida foi realizada da seguinte forma: 5,0 mL da solução de AF foram adicionados a 4 mL da solução de EDC. Após 5 minutos, 4,0 mL da solução de NHS foram adicionadas no meio reacional. Após 5 minutos, uma dispersão de nanopartículas recobertas com APTMS (procedimento 3.3.1.2), foi adicionada ao sistema e o pH foi ajustado, com solução de 1 mol L⁻¹ de NaOH, até 8,0. Deixou-se o sistema sob agitação em banho de gelo por 24 horas. As dispersões foram lavadas com água e submetidas a banho de ultrassom para redispersão. Então, centrifugou-se a 10000 rpm por 10 minutos. Repetiu-se o procedimento até que observou-se o sobrenadante sem coloração. Da dispersão final foi retirada uma alíquota para as análises pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, o restante foi estocado em água.

3.5 Caracterização dos sistemas nanoestruturados

Para análise de tamanho, distribuição, morfologia e homogeneidade das amostras obtidas, foram realizadas microscopias eletrônicas de transmissão (MET). Para esta análise, foi utilizado um microscópio eletrônico Philips CM120 operando a 120kV. Em todas as análises, a preparação das amostras foi: uma pequena porção de nanopartículas foi redispersa em seus respectivos solventes de armazenamento (água, hexano, isopropanol), e foi mantida em ultrassom por cerca de 40 minutos. A amostra foi então gotejada sobre um suporte de cobre previamente recoberto por um fino filme de carbono depositado por *sputtering*. O solvente deste suporte foi evaporado lentamente, a pressão e temperatura ambientes. Para as dispersões em água, as amostras foram secas sob vácuo. O diâmetro médio (d) e o desvio-padrão (SD) das nanopartículas obtidas foram determinados estatisticamente pela contagem de aproximadamente 120 partículas de cada uma das amostras a fim de obter o grau de polidispersividade ($\sigma = SD/d$).

As fases cristalográficas presentes nas amostras de magnetita sem recobrimentos foram identificadas por difratometria de raios X (DRX) utilizando-se um difratômetro de anodo rotatório de cobre marca Rigaku, modelo Rint2000 operando com radiação K $_{\alpha}$ do cobre ($\lambda=1,5418$ Å). As medidas foram realizadas pelo método do pó após a secagem das amostras.

Os espectros no infravermelho, FTIR, foram realizados para analisar as ligações dos recobrimentos sobre a superfície das nanopartículas de magnetita. Deste modo, utilizou-se um

espectrômetro de infravermelho com transformada de *Fourier* IRPrestige-21 da Shimadzu. As amostras foram preparadas na forma de pastilhas com cerca de 100mg de brometo de potássio, KBr, e uma pequena quantidade das nanopartículas previamente secas. Os espectros foram obtidos no intervalo entre 200 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} com uma resolução de 2 cm^{-1} e 32 varreduras.

As curvas de histerese magnética foram obtidas através da técnica de magnetometria de amostra vibrante (VSM) utilizando um magnetômetro de amostra vibrante convencional, em cooperação com o 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 foi 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 foram todas realizadas à temperatura ambiente.

As medidas de mobilidade eletroforética em função do pH foram realizadas em um equipamento ZETASIZER NANO ZS da Malvern Instruments utilizando solução aquosa $10^{-3}\text{ mol.L}^{-1}$ de KNO_3 como meio de dispersão. As medidas foram realizadas variando-se o pH da solução de 2 a 11, utilizando o titulador automático que constitui um acessório do equipamento e soluções de HCl e NaOH com diferentes concentrações para varrer o intervalo de pH pré-determinado. A presença do eletrólito nesta concentração teve como objetivo ajustar a força iônica do meio de modo a garantir que a mobilidade das partículas ocorresse por migração e o transporte de carga na solução ficasse a cargo do eletrólito de suporte.

4 Resultados e discussão

Esta seção do presente trabalho foi dividida de acordo com os procedimentos realizados: (1) sínteses de nanopartículas de magnetita por decomposição térmica, seguindo novas metodologias; (2) hidrofilição da superfície destas nanopartículas obtidas para posteriores recobrimentos; e por fim, (3) os processos de recobrimento com diferentes macromoléculas e componente inorgânico para torná-las biocompatíveis (4) Funcionalização das nanopartículas com ácido fólico. Nos quatro tópicos serão apresentadas as análises feitas para cada um dos produtos obtidos, bem como algumas comparações entre estes. Foram feitas análises de difração de raios X, microscopia eletrônica de transmissão, mobilidade eletroforética em função do pH, espectroscopia no infravermelho e magnetometria de amostra vibrante, sempre de acordo com a necessidade e com a propriedade de interesse a ser estudada em cada amostra. Todas as discussões acerca dos experimentos são feitas tendo como base a avaliação da qualidade das nanopartículas e de seus recobrimentos.

4.1 Síntese das nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) por decomposição térmica

Primeiramente, foi testada a metodologia publicada por Jin-Woo Cheon *et al.*⁵¹, cujo objetivo era a síntese de nanopartículas de aproximadamente 12 nm tendo como precursor de síntese o nitrato de ferro(III) em meio de octiléter. Porém, de acordo com os resultados obtidos (Figura 21), foram obtidas nanopartículas sem controle morfológico, com larga distribuição de tamanho e muito aglomeradas, o que demonstra que as condições de síntese utilizadas não proporcionaram um controle de formação das nanopartículas de magnetita.

Figura 21 - (a) e (b) MET da amostra de magnetita M01. (c) Histograma da distribuição de tamanho.

Pelo histograma da distribuição de tamanho das nanopartículas da amostra M01 (Figura 21 c), nota-se que o objetivo inicial de nanopartículas de 12 nm não foi alcançado, visto que, segundo a curva log normal traçada através dos dados do histograma, obteve-se o dado de que o diâmetro médio das partículas foi de 6,9nm. Pelo resultado não satisfatório devido ao fato do não controle de forma e tamanho, não foi dada continuidade neste processo de síntese.

Ainda no intuito de realizar uma síntese simples e que possuísse rigoroso controle de forma e de morfologia das nanopartículas formadas, foi reproduzido o procedimento experimental publicado no trabalho de Zhichuan Xu *et al.*⁵², que visa produzir nanopartículas de magnetita com 7nm de diâmetro. Nesta síntese, o ponto a ser ressaltado é que o autor frisa a utilização da oleilamina não só como agente redutor, mas também como solvente na síntese, que além deste componente, utiliza-se apenas do precursor de íons ferro (acetilacetato de ferro(III)). Porém, ainda no caminho de síntese, no próprio sistema de refluxo, foi observado que as nanopartículas formadas não estavam completamente dispersas no meio reacional e que apresentavam coloração intensamente brilhante, o que é incomum para este tipo de material. Posteriormente, observou-se que as nanopartículas eram bruscamente atraídas por um ímã, ressaltando inclusive suas linhas de campo. Para caracterizar o produto formado, foi feita uma análise de difração de raios X (DRX) da

amostra (Figura 22), que não mostrou a formação de magnetita, mas sim de fases cristalinas de ferro metálico. Tal fato ocorreu devido à reação de redução do Fe^{3+} a ferro metálico (Fe^0), mostrando que o meio reacional somente com oleilamina é extremamente redutor e que a síntese de nanopartículas de magnetita necessita de um elemento na síntese que as proteja, bem como auxilie na sua rápida nucleação e seu lento crescimento.

Figura 22 – DRX da amostra de magnetita M02.

Após terem sido testados dois diferentes métodos para a síntese de magnetita, ambos sem êxito no objetivo desejado, partiu-se então para a utilização do método já difundido no grupo de pesquisa, o poliol. Nos últimos anos, diversas rotas sintéticas para a obtenção de nanopartículas com tamanho, morfologia, composição e propriedades controlados vêm sendo propostos na literatura. Dentre elas, rotas químicas envolvendo o processo poliol são as que vêm obtendo melhores resultados. O processo poliol foi inicialmente proposto em 1989 por Fiévet *et al.*¹⁰, mas foi amplamente difundido por Sun *et al.*^{11, 12, 57, 58}, como já mencionado na introdução deste trabalho. No procedimento proposto por Fiévet, sais metálicos eram reduzidos em altas temperaturas, utilizando-se etilenoglicol como solvente e agente redutor, como mostrado na equação (4)

De acordo com a reação descrita, a oxidação do diol resulta na redução do metal, liberando como subproduto outro agente redutor muito forte, o hidrogênio molecular, que caso permaneça dissolvido na solução, pode ou auxiliar na redução ou simplesmente ser eliminado devido à presença de um gás de arraste no sistema. O processo poliol utilizado por Sun traz como principal modificação do processo proposto por Fiévet, a substituição do etilenoglicol por um diol de cadeia mais longa, o 1,2-hexadecanodiol. Esta substituição parece favorecer a reação de óxido-redução, tornando-a cineticamente mais rápida, uma vez que os dois grupos hidroxila terminais do 1,2-hexadecanodiol encontram-se mais suscetíveis à desidratação devido à própria distribuição eletrônica da molécula. Essa cinética acelerada do processo leva à rápida e homogênea etapa de nucleação, resultando em partículas com menores dimensões do que as obtidas pelo processo poliol original. Deve-se lembrar de que tal explicação está embasada no modelo de nucleação e crescimento proposto por LaMer, como observado na Figura 6.

Os trabalhos de Sun *et al.* utilizam como precursor de ferro no método poliol o ferro pentacarbonil, um composto com alta volatilidade. Desta forma, parte dele é arrastada pelo fluxo de gás inerte, o que não o faz participar da reação, dificultando assim o controle da composição do produto final. Além do mais, compostos carbonílicos são conhecidos pela sua elevada toxicidade. Diante disso, seguindo a modificação proposta por Varanda *et al.*⁵⁰, neste trabalho optou-se pela substituição do ferro pentacarbonil pelo acetilacetato de ferro(III), que elimina esta dificuldade, pois tem volatilidade praticamente desprezível. Além do maior controle composicional, outros motivos que levaram à escolha do acetilacetato são: (a) sua considerável solubilidade em solventes orgânicos em altas temperaturas, (b) cadeia orgânica relativamente longa relacionada à temperatura de decomposição do sal (182°C), a qual leva a produção de dióxido e monóxido de carbono durante sua decomposição, podendo o segundo auxiliar na redução de íons metálicos, (c) menor custo comparado a outros sais, (d) baixa toxicidade.

O método poliol modificado pode resultar em nanopartículas de diferentes composições e tamanhos, de acordo com a variação do precursor de íon metálico que é utilizado e a proporção dos reagentes. O objetivo principal desta síntese neste trabalho era obter nanopartículas de Fe_3O_4 com diâmetro de 6nm, porém em um procedimento foi variada a proporção de reagentes para se observar qual seria a modificação no produto final. Então, foram mantidas as proporções do precursor acetilacetato de ferro(III), do hexadecanodiol e do ácido oleico, porém a quantidade de surfactante no meio, a oleilamina, foi utilizada ao dobro do necessário. Os resultados desta síntese são mostrados na Figura 23, em que se pode observar que o diâmetro das nanopartículas é bem inferior ao desejado, demonstrando que a quantidade de oleilamina tem papel fundamental na

determinação do tamanho, ou seja, na fase de crescimento das nanopartículas, porém a morfologia é bem controlada e todas as nanopartículas tem forma uniforme. Porém não se pode concluir nada sobre o real diâmetro desta amostra, pois devido a má qualidade da imagem, não foi possível realizar uma contagem fiel a isto.

Figura 23 – (a) e (b)MET da amostra de magnetita M03.

Foi realizada também a síntese conforme o procedimento tradicional do método poliol, para sintetizar nanopartículas com 6nm, seguindo as proporções dos reagentes. Assim, na amostra M04, foram obtidas nanopartículas com diâmetro médio de 5,2 nm e relativamente um baixo grau de polidispersividade, caracterizando uma amostra de boa qualidade, com controle morfológico e de tamanho, como observado na Figura 24(a) e (b).

Figura 24 – (a) e (b) MET da amostra de magnetita M04. (c) Histograma da distribuição de tamanho

Devido à qualidade desta amostra M04, foi feita uma investigação mais detalhada acerca da composição das nanopartículas formadas, a fim de que se comprovasse que o produto formado tratava-se realmente de Fe_3O_4 . Para isto, foi realizada uma difratometria de raios X (DRX) (Figura 35), e comparou-se o resultado com o padrão (JCPDS) de sinais das fases cristalinas deste material e também de outro possível produto da síntese, a α -hematita. Pode-se comprovar que o produto formado é realmente magnetita, e que não houve deslocamento dos picos do difratograma com relação ao padrão, evidenciando que a estrutura cristalina (Figura 1) não sofreu alterações, como substituições de átomos em sítios da célula unitária.

Figura 25 – DRX da amostra em azul e abaixo, o padrão para a magnetita.

Ainda seguindo as análises para investigações acerca da magnetita sintetizada, foi realizada a espectroscopia no infravermelho por transformada de *Fourier* (FTIR). Como é possível observar na Figura 26, o espectro apresenta banda de absorção em 586 cm^{-1} , que pode ser atribuída a características de ligações Fe-O em sítios octaédricos e tetraédricos da estrutura cúbica de espinélio inverso da magnetita⁵⁹. A presença de ácido oleico e oleilamina sobre a superfície das nanopartículas é principalmente comprovada pelas bandas centradas em 2922 cm^{-1} e 2855 cm^{-1} , características, respectivamente, dos estiramentos assimétrico e simétrico de grupos ($-\text{CH}_2-$) presentes nas cadeias orgânicas alifáticas⁶⁰, e a presença do ácido oleico também pode ser justificada pela presença da banda em 1623 cm^{-1} , devido ao estiramento da ligação C=O.

Figura 26 - Espectro de FTIR da magnetita (amostra M04).

Devido às boas características, o método de síntese do poliol modificado foi o escolhido para sintetizar as demais amostras de magnetita necessárias para o decorrer do projeto, visto que muitas sínteses foram feitas para suprir a necessidade das grandes quantidades necessárias para os testes de recobrimento e para análises.

4.2 Hidrofilização da superfície das nanopartículas de magnetita através da troca de ligantes

Em uma síntese de magnetita por decomposição térmica, tipicamente, envolve-se a decomposição de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ em um alto ponto de ebulição, com presença de solventes e tensoativos, tais como os estabilizadores ácido oleico e oleilamina. Assim, a magnetita resultante é dispersa apenas em meios orgânicos, o que a torna inadequada para aplicações biomédicas ⁶¹, uma vez que o meio fisiológico é composto basicamente por água e soluções aquosas, todas de natureza polar.

Desta forma, foi elaborado um procedimento para que o ácido oleico e a oleilamina presentes na superfície da nanopartículas (Figura 27a) fosse parte de um procedimento de troca de ligantes, a fim de que na superfície ficassem aderidos grupamentos que dariam natureza polar para o sistema, no caso, o ácido 6-amino-hexanoico (ácido aminocapróico) foi testado.

Inicialmente, o procedimento foi realizado em meio básico (pH em torno de 12) para que houvesse protonação da superfície da partícula e o mecanismo de troca fosse permitido. O ultrassom auxiliou para que as partículas estivessem em constante movimento, garantindo boa

homogeneização no mecanismo e facilitando a cinética da reação. Posteriormente, o procedimento foi realizado em meio ácido (pH em torno de 4,0), a fim de observar-se se esta alteração também resultaria em nanopartículas dispersas em água, visto que este meio carregaria negativamente a superfície da nanopartícula, fazendo com que, teoricamente, a outra extremidade da molécula de ácido aminocaprílico se ligaria nela. Logo, a carga em superfície dependerá do pH de carga zero ou do ponto isoelétrico, por exemplo para uma partícula nua em pH 4 a carga resultante é positiva.

Foi realizado também um teste em meio ácido que contou com a adição de uma pequena quantidade de NaCl para que este reagisse com o ácido oleico do meio, formando oleato de sódio, o que possivelmente melhoraria na lavagem das partículas e na eliminação deste.

Figura 27 – (a) Esquematização da forma com que a superfície da magnetita fica protegida pelo ácido oleico. (b) Estrutura do ácido aminocaprílico, que efetua mecanismo de troca com o ácido oleico da superfície

Vale ressaltar que a escolha do ácido aminocaprílico deu-se não somente pela sua estrutura favorável, mas também pelas suas propriedades terapêuticas, pois atua como anti-hemorrágico, sendo absorvido rapidamente após administração oral não se ligando a proteínas plasmáticas, sendo eliminado facilmente por via renal e a maior parte sem metabolizar. Ou seja, sabe-se que sua toxicidade é baixa e que seu uso não é prejudicial ao meio biológico. Estudos futuros confirmarão se seu uso juntamente com a magnetita não apresenta caráter tóxico.⁶² O primeiro resultado observado foi a dispersividade da magnetita nas soluções aquosas tanto de NaOH quanto na de HCl que estavam contidas nos experimentos. Após sucessivas lavagens com água, a suspensão coloidal foi armazenada. Os resultados de microscopia de transmissão (TEM) das nanopartículas correspondentes ao meio básico são mostrados na Figura 28. Pode-se observar as unidades menores, no caso a magnetita e algumas maiores que são provenientes da lavagem insuficiente para retirada dos cristais de ácido aminocaprílico que não se acoplaram à superfície da magnetita. Apesar destes, pode-se notar que a modificação da superfície não alterou a morfologia das nanopartículas de magnetita e segundo o histograma e a curva log normal traçada sobre a sua área, o diâmetro médio

destas ficou em torno de 5,3nm, um tamanho adequado ao que se deseja e em concordância com a magnetita com ácido oleico em sua superfície (diâmetro médio de 5,2 nm).

A fim de se observar as ligações presentes na superfície da nanopartículas, realizou-se a análise de espectroscopia no infravermelho (FTIR), que está representada na figura 29.

Figura 28 – (a) e (b) MET da amostra de magnetita com superfície recoberta por ácido aminocapróico M06D. (c) Histograma da distribuição de tamanho

No espectro da Figura 29, foi realizado não só a análise por FTIR da magnetita recoberta, como também foi feita a análise do ácido aminocapróico, a fim de se comparar as bandas existentes e coincidentes entre os dois espectros. Como visto no espectro da Figura 26, no espectro da magnetita (em vermelho, Figura 29) observa-se a banda característica de absorção em 591 e 465 cm^{-1} , atribuídas às ligações Fe-O em sítios octaédricos e tetraédricos da estrutura cúbica de espinélio inverso.

A banda intensa observada em 3428 cm^{-1} pode ser atribuída à absorção da deformação axial da ligação O-H do ácido carboxílico, ou em alguma parcela pode ser atribuída a presença de pouca quantidade de água presente na amostra ou na pastilha de KBr. A formação de ligação de hidrogênio interna reduz a frequência da absorção de deformação axial da ligação C=O, que

geralmente ocorre em 1760 cm^{-1} , e que neste caso está em torno de 1633 cm^{-1} . Duas bandas, provenientes da deformação axial de C-O e da deformação angular de O-H aparecem em 1387 e 1270 cm^{-1} e também em 1460 cm^{-1} .⁶³

O ácido aminocapróico apresenta além da função carboxila, uma função amina que também pode ser identificada no espectro da Figura 29. A banda correspondente à deformação angular simétrica no plano de N-H é observada em 1562 cm^{-1} , com intensidade mediana. Esta deformação está um pouco deslocada da sua condição normal devido ao fato da amina estar associada. A banda em 1100 cm^{-1} pode ser associada a ligações C-N não conjugadas.⁶³

Figura 29 – Espectro FTIR do ácido aminocapróico e da amostra após recobrimento e suas respectivas bandas coincidentes.

O resultado da microscopia da amostra contida no meio ácido, porém com ausência de NaCl, está representado na Figura 30. O procedimento de hidrofilição de superfície em meio ácido resultou em nanopartículas bem dispersas em água que após todas as lavagens, possuiu um pH de aproximadamente 7.

Figura 30 - (a) e (b) MET da amostra de magnetita recoberta com ácido aminocapróico em meio ácido M10A1.

Neste procedimento foram formados aglomerados uniformes das nanopartículas, que podem ser estudados em futuros trabalhos, visto que suas propriedades são diferentes das observadas nas nanopartículas separadamente. Por este motivo não foi realizada a contagem para a obtenção do histograma de distribuição de tamanho desta amostra.

Quanto ao procedimento realizado em meio ácido com a presença de NaCl, o procedimento também resultou em nanopartículas dispersas em água, com pH final de aproximadamente 6. Durante a lavagem destas com água, pôde-se observar a formação de espuma, o que pode ser uma evidência da presença de ácido oleico no meio, formando oleato de sódio, um tensoativo. Desta forma, o procedimento de lavagem foi repetido por inúmeras vezes, até que não fosse mais notada a presença desta espuma, evidenciando uma possível eliminação do ácido oleico. As nanopartículas são mostradas nas micrografias da Figura 31

Figura 31 - (a) e (b) MET da amostra de magnetita recoberta com ácido aminocapróico, em meio ácido e presença de NaCl, M10A2. (c) Histograma da distribuição de tamanho.

Já na Figura 32, são observados os espectros dos testes realizados em meio ácido. Como discutido na amostra anterior, existem duas bandas provenientes da deformação axial de C-O e da deformação angular de O-H, localizadas em 1257cm^{-1} e em 1406cm^{-1} . As bandas em 2925 e 2856cm^{-1} podem ser atribuídas aos estiramentos simétrico e assimétrico dos grupos $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$ em estruturas ácidas, provavelmente providas de alguma contaminação de ácido oleico presente no sistema.

Como já mencionado, existe a possibilidade de sinal da função amina nestas amostras, mesmo que o esperado em meio ácido fosse a disponibilidade somente de grupamentos carboxilatos, pode-se notar que em 1554cm^{-1} , mesmo que em uma intensidade fraca comparada a obtida em meio básico, existe o sinal da deformação angular simétrica no plano de N-H. A banda em 1100cm^{-1} pode ser associada a ligações C-N não conjugadas.⁶³

Figura 32 - Espectro FTIR do recobrimento utilizando ácido aminocapróico em meio ácido e suas respectivas bandas coincidentes.

Foram feitas medidas de mobilidade eletroforética (Figura 33) com o intuito de constatar o efeito da mudança do pH na carga de superfície da nanopartículas de magnetita hidrofilizada. Pode-se observar que abaixo do pH do ponto isoelétrico (pH_{pie} 2,8), a magnetita apresenta superfície carregada positivamente. Acima do pH_{pie} a superfície apresentou-se carregada negativamente. Esse comportamento pode ser interpretado com a associação do grupo NH_2 com a superfície da magnetita, pois o grupo funcional amino possui carga positiva até o seu pH do ponto isoelétrico, o qual encontra-se na faixa entre 10-11. Assim, pelas análises FTIR e mobilidade eletroforética, pode-se inferir que o ácido aminocapróico interagiu com a superfície da magnetita via o grupo funcional carboxílico.

Figura 33 - Curva de potencial zeta em função do pH da amostra de magnetita com superfície hidrofílica M06D.

Foram realizadas medidas de magnetização de amostra vibrante (VSM) para constatar se as amostras com modificação na superfície sofreram alguma alteração no seu comportamento magnético em função do campo aplicado. O resultado é mostrado nas curvas da Figura 34, em que se pode observar que as amostras de magnetita e magnetitas hidrofílicas possuem o valor máximo de saturação equivalentes (M_s), em torno de 45 emu/g, e que as amostras apresentam o laço de histerese ligeiramente mais aberto, sugerindo maior acoplamento interpartículas, o qual é esperado uma vez que a molécula do ácido aminocapróico possui uma cadeia carbônica menor com seis átomos de carbono quando comparada a de ácido oleico ou oleilamina com dezoito átomos de carbono em ambos os casos. De acordo com os valores de M_s , pode-se concluir que a amostra do procedimento do meio básico obteve melhor qualidade, porém obteve maior abertura no laço de histerese. Observando a ampliação da região central das curvas apresentadas na Figura 34, é possível notar uma histerese muito baixa para as amostras, o que indica um comportamento bastante próximo do superparamagnético para as duas, visto que não é observada uma magnetização remanente M_R nas amostras.

Figura 34 – Curvas de magnetização em função do campo magnético aplicado obtidas a temperatura ambiente para as amostras de magnetita com caráter hidrofóbico e hidrofílico. Em destaque, ampliação da região central das curvas.

Na tentativa de testes realizados por agitação mecânica, onde adicionou-se DMSO e clorofórmio no meio reacional, não foram obtidos resultados satisfatórios. No caso do sistema utilizando DMSO, as partículas ficaram todas na interface polar/apolar na hora da lavagem, evidenciando que não houve a troca de ligantes. Na utilização do clorofórmio, o sistema foi agitado por 72 minutos, porém com 10 minutos já houve floculação das partículas, e devido a esta característica, o sistema também foi descartado. Lembrando que foram utilizadas quantidades de NaOH/clorofórmio/isopropanol previamente estudadas para que se formasse uma sistema miscível, sem separação de fase.

4.3 Recobrimentos da superfície das nanopartículas de magnetita

4.3.1 Recobrimento com aminopropiltrimetoxissilano (APTMS)

O recobrimento com aminopropiltrimetoxissilano (APTMS) é bem disseminado na literatura, porém os resultados obtidos não são satisfatórios, pois apresentam nanopartículas sem controle de

forma, tamanho e com problemas relacionados à formação de aglomerados. Assim, foram testadas adaptações e/ou outras metodologias a fim de que estes problemas fossem solucionados. A Figura 35 (c) mostra um esquema de uma possível estrutura da molécula de APTMS sobre a superfície da nanopartícula.

No procedimento de recobrimento com APTMS segundo Mikhaylova *et al.*², a etapa inicial de lavagem das nanopartículas com porções de metanol e tolueno está relacionada com a retirada de resquícios de água do sistema e também qualquer tipo de subproduto volátil. Posteriormente, as nanopartículas foram dispersas em tolueno e acidificou-se o meio a fim de facilitar a protonação da superfície destas para a ligação com o APTMS. Após as 14 horas de agitação a 100°C, o sistema foi lavado com etanol e água, mostrando então a primeira evidência de que a troca de ligantes na superfície se realizou, já que as nanopartículas estavam totalmente dispersas em meio aquoso. O resultado das nanopartículas recobertas com APTMS pode ser visto na Figura 35.

Figura 35 – (a) e (b) MET da amostra de magnetita com superfície recoberta com APTMS M03A.
(c) Processo de ligações covalentes do APTMS na superfície da nanopartículas.
Adaptado de ⁶⁵

Na Figura 35 pode-se observar que o sistema ainda possui alguns aglomerados, mostrando que o objetivo de se obter partículas pequenas e monodispersas com APTMS como recobrimento não foi totalmente alcançado com a nova metodologia testada. Devido à má qualidade deste recobrimento obtido, não foi realizada a contagem destas nanopartículas.

Para melhorar a qualidade do recobrimento (que envolve parâmetros como a aglomeração de partículas após o recobrimento, controle de forma, etc) foi feita uma adaptação no procedimento de recobrimento, sendo que a etapa de lavagem com porções de tolueno e metanol foi mantida, a fim de que os resquícios de água e outros produtos voláteis fossem eliminados. Porém neste caso o recobrimento foi feito via troca de ligantes e não sob o efeito de temperatura. Assim, o ácido oleico e a oleilamina presentes na superfície foram trocados por moléculas de APTMS, tornando a nanopartícula útil para aplicações biomédicas. O resultado deste procedimento pode ser observado nas micrografias da Figura 36, onde nota-se nanopartículas dispersas, sem aglomerados, com tamanho e morfologia controlados, com diâmetro médio de 4,98nm.

Figura 36 – (a) e (b)MET da amostra de magnetita recoberta com APTMS M06A. (c) Histograma da distribuição de tamanho

Para analisar as ligações presentes em sua superfície, foi realizada a análise por FTIR, que pode ser vista na Figura 37. A presença de uma banda em 1646 cm^{-1} é característica das amins adsorvidas sobre a superfície das nanopartículas⁴⁵ e pode estar sobreposta à banda referente ao estiramento simétrico de grupos carboxilatos ($-\text{COO}^-$) ligados à superfície das partículas⁶⁰. Comparando os espectros somente da magnetita (Figura 26) e da magnetita recoberta (Figura 37) é possível notar diferenças, o que indica a ocorrência da modificação sobre a superfície das nanopartículas. A presença de moléculas de APTMS sobre a superfície é comprovada pelo surgimento de forte banda de absorção na região entre 1000 e 1100 cm^{-1} , a qual pode ser atribuída à condensação de grupos siloxanos (Si-O-Si) sobre a superfície das nanopartículas^{66,67}. É possível também observar a presença de algumas bandas centradas em 3419 cm^{-1} , 1646 cm^{-1} e 1567 cm^{-1} , as quais são características, respectivamente, de estiramentos vibracionais em ligações N-H, deformações angulares em grupos $-\text{NH}_2$ e estiramentos vibracionais em ligações C-N, o que comprova a presença de grupos amina livres sob a superfície das nanopartículas⁶⁷. As bandas intensas atribuídas a Si-O ocorrem entre 830 - 1100 cm^{-1} .⁶³

Figura 37 - Espectro de infravermelho da amostra de magnetita recoberta com APTMS.

4.3.2 Recobrimento com metilpolietilenoglicol (MPEG)

O metil polietilenoglicol (MPEG) é uma molécula com extremidades contendo grupamentos metil e hidroxila. Desta forma, para este recobrimento ocorrer, primeiramente faz-se o recobrimento com APTMS, que disponibiliza um grupo amino terminal para a ligação, como esquematizado abaixo:

Figura 38 - Esquema mostrando como o MPEG liga-se para recobrir a superfície da nanopartícula de Fe_3O_4 . Adaptado de ²⁰.

Uma metodologia foi desenvolvida para que nanopartículas ficassem monodispersas, não agregadas e também houvesse controle de forma destas. Primeiramente, foi feito o procedimento de adição de APTMS sobre a superfície da magnetita, de acordo com o procedimento já citado no item 3.3.2.1, resultando em nanopartículas com pouca agregação e controle razoável de forma (Figura 35). O MPEG foi então adicionado em meio de etanol e tolueno para garantir total dispersão no meio, e então o sistema foi mantido em agitação por 13 horas para que o grupamento amina do APTMS reagisse com a hidroxila do MPEG, garantindo homogeneidade e o máximo de ligações possíveis. O resultado foram nanopartículas recobertas, porém houve a formação de aglomerados (Figura 39). De acordo com os dados de contagem e ajuste de uma curva log normal sob o histograma, obteve-se que a média dos tamanhos destas nanopartículas recobertas é de 4,30 nm e seu desvio padrão de 1,23. Isto resulta então em um índice de polidispersividade igual a 29%, o que não caracteriza um sistema monodisperso.

Figura 39 - (a) e (b) MET da amostra de magnetita recoberta com MPEG, M03B. (c) Histograma da distribuição de tamanho.

A fim de obter resultados com melhores qualidades, visando a aplicabilidades destas nanopartículas em sistemas biológicos, que exigem um sistema monodisperso, estável e sem riscos para formações de aglomerados, foi realizada outra metodologia para o recobrimento com MPEG. Uma nova metodologia foi realizada utilizando o APTMS, com a qual obteve-se resultados satisfatórios após a troca de ligantes. Desta forma, o procedimento para recobrimento do MPEG foi repetido para testar se o problema de formação de aglomerados e a falta de controle de forma se deviam à primeira ou a segunda etapa de recobrimento. Foram obtidas nanopartículas que estão mostradas na Figura 40, cujo diâmetro médio foi de 5,81nm, visto que a magnetita que foi recoberta neste caso foi a de diâmetro médio de 5,22nm. O desvio padrão amostral foi de 0,88, resultando um grau de polidispersividade de 15%, o que não caracteriza um sistema monodisperso.

Figura 40 - (a) e (b) MET da amostra de magnetita recoberta com MPEG, M06B. (c) Histograma da distribuição de tamanho.

A análise por FTIR (Figura 41) confirmou as ligações na superfície da nanopartículas, pelo aparecimento de banda em 1029 cm^{-1} , característica de vibração da ligação -C-O-C- . O aparecimento de bandas em 3397 e 1557 cm^{-1} , características da vibração da ligação -C(=O)-N-H , demonstra a interação entre os grupamentos, formando uma possível interação dos grupamentos amina do APTMS e carboxila do MPEG.⁶⁶

Figura 41 - Espectro no infravermelho da magnetita recoberta com MPEG.

4.3.3 Recobrimento com sílica

O processo de recobrimento com sílica foi realizado pelo processo de microemulsão por micela reversa. Optou-se realizar um método diferente dos que já estava sendo utilizados para que um conceito diferente fosse estudado durante o trabalho, e também se sabia que o processo via microemulsão resulta em nanopartículas recobertas de forma satisfatória, baseado em trabalhos em desenvolvimento no grupo de pesquisa. Pelas microscopias da Figura 42, pode-se notar a distinção entre o contraste da camada de recobrimento e do núcleo magnético, evidenciando assim a eficiência do recobrimento. Além disso, outro aspecto que difere o recobrimento via microemulsão e os outros utilizados até agora, é que o tamanho final da nanopartícula é muito maior, como pode-se notar pelo histograma da Figura 42c. De acordo com a curva log normal traçada sob o histograma, o sistema possuiu diâmetro médio de 25,9nm, com desvio padrão de 7,2, não caracterizando um sistema monodisperso.

Figura 42 - (a) e (b) MET da amostra de magnetita recoberta com sílica, M05A. (c) Histograma da distribuição de tamanho

Segundo o espectro no infravermelho, pode-se identificar as bandas características das ligações do recobrimento obtido (Figura 43). O núcleo magnético pode se identificado pelas bandas em 467 cm^{-1} e 790 cm^{-1} , que como já citado corresponde aos átomos de ferro nos sítios octaédricos e tetraédricos da estrutura da magnetita, bem como a deformação das ligações Fe-O. A presença da camada de sílica é confirmada pelo estiramento assimétrico Si-O-Si na banda de intensidade forte na região de 1107 cm^{-1} , além das vibrações de grupos hidroxilas presentes na superfície da sílica na região de 1629 cm^{-1} .^{52, 66, 68, 69, 70}

Figura 43 - Espectro no infravermelho da magnetita recoberta com sílica, M05A.

4.3.4 Recobrimento com quitosana

A quitosana é um biopolímero parcialmente acetilado, com muitos recursos úteis, tais como a hidrofilicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Além disso, os grupamentos amino da quitosana também podem ser utilizados para uma funcionalização adicional com componentes específicos (como outros grupos funcionais, etc) ⁵³. Por estes motivos, a quitosana foi escolhida para realizar-se esta modificação da superfície da magnetita.

A Figura 44 representa um esquema sobre como se dá o recobrimento da magnetita pelo glutaraldeído e pela quitosana. Porém, no caso deste trabalho houve uma adaptação neste procedimento, visto que este necessita de nanopartículas com natureza hidrofílica para que haja a reação da quitosana com a superfície, pois como já dito esta tem natureza hidrofílica e não se associa a meios hidrofóbicos. Para isto, foram utilizadas nanopartículas já recobertas com APTMS e com ácido aminocaprílico para a posterior funcionalização. A Figura 45 representa o resultado da nanopartícula recoberta com APTMS e posteriormente com quitosana.

Figura 44 – (a) Ilustração esquemática da formação de magnetita recoberta por quitosana. Adaptado de ⁵³. (b) Fórmula estrutural da quitosana.

Figura 45 - (a) e (b) MET da amostra de magnetita recoberta com quitosana, M08A. (c) Histograma da distribuição de tamanho

Pelo histograma, observa-se que foram obtidas nanopartículas com diâmetro médio de 6,1 nm, com desvio padrão amostral de 2,0. Pela micrografia, observa-se que o sistema resultante não apresentou características desejáveis, pois nota-se que ainda havia resquícios dos reagentes sob as nanopartículas, o que prejudica sua principal aplicabilidade no meio fisiológico, visto que isto poderia facilmente causar uma embolia capilar. Logo, este resultado não foi aparentemente satisfatório. Isto pode ser provavelmente justificado devido à ineficiência das etapas de lavagem, ou também pelo excesso de reagente acumulado na etapa de recobrimento com APTMS, e depois neste outro recobrimento.

Para melhorar este resultado, foi realizado outro teste, porém utilizando-se como nanopartícula com superfície hidrofóbica, a recoberta com ácido aminocaprílico, conforme descrito no item 3.2.1.1 devido à disponibilidade do grupamento NH_2 deste sistema, para que houvesse interação com a quitosana. O resultado é mostrado nas micrografias da Figura 46.

Figura 46 - (a) e (b) MET da amostra de magnetita recoberta com quitosana, M09A. (c) Histograma da distribuição de tamanho

Desta forma, pode-se concluir que este segundo procedimento foi eficaz e atingiu o objetivo desta adaptação de método, que foi o da obtenção de nanopartículas com menor quantidade de reagente não utilizado na síntese em sua superfície. O resultado foi uma distribuição de tamanho médio de 5,12nm com desvio padrão 1,1, resultando um sistema com 21,5% de polidispersividade. Mesmo sendo um número que não caracteriza um sistema monodisperso, pelos resultados visuais, pode-se observar que o resultado foi mais satisfatório, e vale ressaltar que existem fontes de erro na contagem das nanopartículas, o que acarreta uma fonte de erro também no cálculo do desvio padrão amostral.

A fim de se comprovar a presença de ligantes nas amostras, realizou-se a análise por FTIR, como mostrado na Figura 47.

Figura 47 – Espectro FTIR das amostras de magnetita recobertas com quitosana, M08A e M09A.

Novamente se observa as bandas características da ligação Fe-O nos sítios da estrutura cristalina da magnetita e suas respectivas deformações em 469 e 584 cm^{-1} . As bandas em 2925 e 2856 cm^{-1} podem ser atribuídas aos estiramentos simétrico e assimétrico dos grupos $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$ em estruturas ácidas, provavelmente provindas de algum resquício de ácido oleico presente no sistema; estas bandas estão em menor intensidade na amostra recoberta com o ácido aminocapróico,

o que pode evidenciar uma concentração menor de ácido oleico no sistema. As bandas características da quitosana a serem observadas são: a banda em 1643 cm^{-1} (na amostra com APTMS) e 1634 cm^{-1} (na amostra com ácido aminocapróico), atribuída ao dobramento da vibração na ligação N-H e a banda com na região de 1399 cm^{-1} , atribuída ao alongamento do grupo alcoólico primário (C-O) na quitosana.⁵³ As diferenças nos espectros pode ser justificada devido ao aparecimento dos sinais dos grupamentos silano provenientes do APTMS, visto nas bandas intensas em 1084 e 1214 cm^{-1} , que podem ser atribuídas a sinais das ligações Si-O⁶⁵, mostrando que esta amostra conteve nanopartículas que não foram recobertas pela quitosana.

4.3.5 Recobrimento com carboximetildextrana

Optou-se pela funcionalização com a carboximetildextrana para que se obtivesse, assim como em todos os outros recobrimentos testados até então, estabilidade coloidal em fluidos biológicos e a melhora do transporte e da retenção em áreas específicas do corpo humano. A carboximetildextrana possui grupamentos carboxílicos (-COOH) em suas estruturas repetitivamente, e estes grupos reagem por condensação com grupamentos amino terminais (-NH₂) previamente ligados na superfície da nanopartículas⁷¹ Para isto, realizou-se o recobrimento com a carboximetildextrana tendo como base o núcleo de magnetita hidrofílica, com o ácido aminocapróico em sua superfície. Posteriormente, o procedimento foi repetido, porém foi acrescentada à etapa de lavagem, uma diálise em membrana de celulose por 24 horas.

Os resultados são mostrados nas figuras 48 e 49. Segundo a Figura 48, Pelo o que pode-se observar, foi obtido um sistema muito aglomerado, possivelmente com alta energia de superfície, o que não é interessante para a estabilidade coloidal. Pode-se observar também alguns cristais presentes sobre as nanopartículas, evidenciando que o procedimento de lavagem deve ser mais rígido e repetido por várias vezes. Foram obtidas nanopartículas com diâmetro médio de $7,37\text{ nm}$, com desvio padrão amostral de $2,98$.

Figura 48 - (a) e (b) MET da amostra de magnetita recoberta com carboximetildextrana, M06E. (c) Histograma da distribuição de tamanho

Já na Figura 49, a amostra após a diálise apresentou um grau de aglomeração muito maior, e devido a isto, sua contagem foi muito difícil, dificultando a confecção do histograma de distribuição de tamanho. Por este motivo, o ajuste da curva sob sua área, bem como os valores de desvio padrão, não são fiéis a amostra.

Para constatar se o recobrimento foi eficaz, foi feito o espectro no infravermelho (Figura 50). Observando-se o espectro, pode-se identificar modos vibracionais característicos das moléculas de carboximetildextrana, tais como as bandas 3415 , 2921 e 1401 cm^{-1} , as quais são distintas de ligações -OH , -CH_2 e -CH da estrutura da carboximetildextrana. Além disso, há uma banda em 1040 cm^{-1} característica de estiramentos -C-O-C- . Segundo a literatura, deveriam aparecer bandas nas regiões de 1588 e 1148 cm^{-1} atribuídas à formação de uma amina secundária e o estiramento antissimétrico da ligação -C-N-C- , respectivamente, o que evidenciaria um recobrimento satisfatório⁷¹, porém no espectro da Figura 50, tem-se apenas a banda em 1617 cm^{-1} e um ombro de intensidade fraca em 1157 cm^{-1} , evidenciando a formação de poucas ligações desta natureza, logo, o recobrimento não foi totalmente satisfatório.

Figura 49 - (a) e (b) MET da amostra de magnetita recoberta com carboximetildextrana, M12B. (c) Histograma da distribuição de tamanho

Figura 50 – Espectro FTIR da magnetita recoberta com carboximetildextrana, M12B.

4.4 Curvas de magnetização de todas as amostras recobertas

Foram realizadas medidas de magnetização de amostra vibrante (VSM) para que pudesse ser comprovado que as macromoléculas ligadas à superfície do núcleo magnético não alterariam seu comportamento magnético em função do campo aplicado. Os resultados podem ser observados no gráfico da Figura 51, onde a grande maioria das amostras obteve o valor máximo de saturação (M_s) em torno de 45 emu/g, o valor de magnetização obtido para a magnetita sem recobrimentos. Teoricamente, a magnetita possui maior magnetização, porém é necessário ressaltar que as nanopartículas obtidas possuem ácido oleico e oleilamina em sua superfície, o que diminui o valor da magnetização, já que houve a troca destes com as macromoléculas trabalhadas, este valor mantém a mesma média. Apenas a amostra recoberta por sílica que diferiu desta média, apresentando um valor de M_s em torno de 4 emu/g, o que torna a amostra desinteressante para o trabalho. Em média, a abertura do laço de histerese de todas as amostras foi praticamente do mesmo tamanho, demonstrando o acoplamento interpartículas, devido a utilização de macromoléculas relativamente grandes. Logo, pode-se dizer que todas as amostras continuaram possuindo um comportamento muito próximo ao superparamagnético, mesmo após o recobrimento, pois não foi observada uma magnetização remanente em nenhuma das curvas.

Figura 51- Curvas de VSM realizadas com todas as amostras.

4.5 Funcionalização das nanopartículas de magnetita com ácido fólico

Foram determinadas as concentrações dos grupamentos amina de duas amostras: M10D, em que o processo de recobrimento do APTMS durou 24 horas, e M11A, em que o processo durou 12 horas. De acordo com os cálculos das curvas de absorbância, sabendo-se a quantidade inicial de partículas (2,0 mg), foi possível determinar as concentrações desejadas, que são mostradas na

Tabela 4.

Tabela 4 - Concentrações de aminas livres calculadas para cada amostra.

Amostra	Tempo de reação	Concentração de amina
M10D	24 horas	1,10mmol/g
M11A	12 horas	0,549 mmol/g

Assim, conclui-se que pelo maior tempo de reação, a amostra M10D possui maior quantidade de grupamentos amina disponíveis para futuras funcionalizações. Vale ressaltar que existe uma fonte de erro, que é a perda de massa de nanopartículas durante o procedimento devido às várias centrifugações realizadas.

As aplicações de imagem por ressonância magnética (IRM) e liberação controlada de fármacos podem ser associadas com os sistemas de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com biomoléculas, possibilitando o diagnóstico e a terapia de um tumor. Nanopartículas com propriedades superparamagnéticas servem como um agente de melhoramento de contraste na técnica de IRM, enquanto moléculas presentes em sua superfície podem ser usadas como carregadores para células alvo. Para tanto, é necessário conjugar o sistema da nanopartícula com moléculas biológicas ou químicas de baixa massa molar que tenham elevada afinidade com as células alvo e elevada eficiência na internalização celular das nanopartículas⁵⁰. O ácido fólico é reconhecido como um efetivo agente alvo para tumor. Os receptores folato estão expressos nas membranas celulares de muitas células cancerígenas, tais como, de ovário, de endométrio, de mama, de colo-retal, de pulmão, carcinomas de células renais e carcinomas neuroendócrinos^{72, 73}. A Figura 53d mostra a estrutura molecular do ácido fólico.

A etapa de funcionalização da amostra foi realizada através da ligação entre o grupo carboxilato do ácido fólico com as aminas livres disponíveis na superfície das nanopartículas

recobertas com o APTMS. A reação de ligação entre estes dois grupos funcionais ocorre dando origem a uma amida por meio de uma ligação do tipo peptídica. Utilizou-se o cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilamoniopropil)carbodiimida (EDC), para a reação do grupo carboxílico do ácido fólico. 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 pode ser visto na Figura 52.

Figura 52- Representação do mecanismo de reação entre os grupos amina livre sobre a superfície das nanopartículas e o grupo carboxilato do ácido fólico. Adaptado de ⁷⁴

O resultado das amostras recobertas são mostrados na Figura 53, onde observa-se que as nanopartículas formaram um sistema disperso, sem a formação de muitos aglomerados, o que foi satisfatório.

Figura 53 - (a) e (b) MET da amostra de magnetita funcionalizada com ácido fólico, M11A1. (c) Histograma da distribuição de tamanho. (d) estrutura do ácido fólico

Realizou-se então a caracterização do material por FTIR para que se observasse a formação da ligação amida, o que comprovaria a reação dos grupamentos amina na superfície da nanopartícula com APTMS. A comparação de tais espectros é encontrada na Figura 54.

Figura 54 - FTIR comparativo das amostras de nanopartículas recobertas com APTMS e funcionalizadas com ácido fólico.

Pela literatura ⁶³, sabe-se que aminas tem uma ou mais bandas entre 1650cm⁻¹ e 1515cm⁻¹, devidas à deformação angular de R-N-H. Estas bandas envolvem o acoplamento da deformação de N-H com outras vibrações. Pelo espectro da amostra com ácido fólico, nota-se que as bandas da faixa de identidade das amidas são presentes, o que pode ser uma evidência da formação da ligação amida. Outra evidência é a mudança do espectro da nanopartícula recoberta somente com APTMS, que mostra bandas características de alcanos ramificados (região de 1500cm⁻¹), além das características de estiramentos das ligações de Si-O e Si-C, como observadas no espectro da Figura 37.

Vale-se ressaltar que dois procedimentos foram realizados, pois no Procedimento 1 não foi observado um resultado satisfatório na análise no FTIR, que não apresentou bandas características da formação de amida. Talvez pelo fato de ter sido utilizada a amostra com menor quantidade de amina disponível para ligações, ou pela ineficiência do método.

5 Conclusões

As nanopartículas de magnetita com bom controle morfológico, de tamanho e de composição foram obtidas pelo método de decomposição térmica, via poliol modificado, enquanto outros métodos de síntese não apresentaram resultados satisfatórios, principalmente devido à falta de controle de forma.

Foi realizada a troca de ligantes sobre a superfície da magnetita para que esta obtivesse comportamento hidrofílico. Isto foi possível devido à troca do ácido oleico pelo ácido aminocapróico, que possui grupamentos amino em sua extremidade e permite que as nanopartículas fiquem dispersas em meios aquosos e polares. Tal comportamento é muito interessante visto que a aplicabilidade destas nanopartículas sintetizadas é em sistemas biológicos, já que o meio fisiológico tem esta característica e as nanopartículas precisam ser biocompatíveis.

Ainda sobre a hidrofilição da superfície, com foco nisto foram realizados recobrimentos, e dentre eles, o mais bem sucedido foi o recobrimento com aminopropiltrimetoxisilano (APTMS), com o qual foram obtidos resultados muito satisfatórios, visto que na literatura o problema com a alta energia de superfície destas nanopartículas e sua consequente aglomeração, é muito comum. No trabalho, conseguiu-se um sistema com controle de forma e sem aglomerados através da adaptação de metodologias. Embora alguns sistemas pareçam apresentar aglomerados nas imagens de microscopia, deve-se levar em conta o processo de remoção do solvente para a realização das imagens. Esse processo pode levar a uma aproximação das nanopartículas, o que não necessariamente significaria que o sistema está aglomerado. Medidas de mobilidade eletroforética devem ser realizadas para verificar esse comportamento em meio líquido. Adicionalmente, os processos de limpeza devem ser melhorados de forma a evitar a presença de resíduos de reagentes e melhorar a dispersão das nanopartículas. As adaptações feitas aos procedimentos propostos foram satisfatórias somente no caso da quitosana, já que o processo de diálise no caso da carboximetildextrana não foi um processo eficaz como se esperava.

Os resultados de forma geral demonstram que o objetivo de obter nanopartículas biocompatíveis foi alcançado, e as ligações dos recobrimentos foram todas confirmadas via espectroscopia infravermelho. Além disso, vale ressaltar que principalmente as características magnéticas dos núcleos estão sendo mantidas, reforçando a aplicabilidade destas nanopartículas.

No caso das nanopartículas funcionalizadas, obteve-se sucesso tanto no procedimento que determina a quantidade de grupamentos amina na superfície, quanto na funcionalização com o ácido fólico. O método ainda precisa ser melhorado no sentido do controle do número de moléculas de

ácido fólico que são ligadas nas moléculas de APTMS, porém para um estudo prévio, os resultados obtidos foram satisfatórios.

6 Referências

- 1 LU, A. H.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, funcionalization, and application. **Angewandte Chemie**, v. 46, n. 8, p. 1222-1244, 2007.
- 2 MIKHAYLOVA, M. KIM, D. K.; BOBRY SHEVA, N.; OSMOLOWSKY, M.; SEMENOV, V.; TSAKALAKOS, T.; MUHAMMED, M. Superparamagnetism of magnetite nanoparticles: dependence on surface modification. **Langmuir**, v. 20, n. 6, p. 2472-2477, 2004.
- 3 UNIVERSITY OF MINESOTA. **Classes of magnetic materials**. Minesota, 1991. Disponível em: <http://www.irm.umn.edu/hg2m/hg2m_b/hg2m_b.html>. Acesso em: 02 jun. 2012.
- 4 KNOBEL, M.; GOYA, G. F. Ferramentas magnéticas na escala do átomo. **Scientific American Brasil**, v. 31, n. 5, p. 58-66, 2004.
- 5 FIGUEROLA, A.; DI CORATO, R.; MANNA, L.; PELLEGRINO, T. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. **Pharmacological Research**, v. 62, n. 2, p. 126-144, 2010.
- 6 SUN, S. H.; ZENG, H. Size controlled synthesis of magnetite nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 28, p. 8204-8207, 2002
- 7 CHEN, Z. P.; ZHANG, Y.; XU, K.; XU, R. Z.; LIU, J. W.; GU, N. Stability of hydrophilic magnetic nanoparticles under biologically relevant conditions. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 12, p. 6560-6265, 2008.
- 8 CULLITY, B. D.; GRAHAM, C. D. **Introduction to magnetic materials**. Hoboken: John Wiley, 2009. 544p.
- 9 CALLISTER, W. D. **Materials science and engineering: an introduction**. New York: John Wiley, 2010. 992p.
- 10 FIEVET, F.; AL, E. Homogenous and heterogeneous nucleations in the polyol process for the preparation of micron and sub-micron size metal particles. **Solid State Ionics**, v. 32, n. 3, p. 198-206, 1989.
- 11 SUN, S. H. Recent advances in chemical synthesis, self-assembly, and applications of FePt nanoparticles. **Advanced Materials**, v. 18, n. 4, p. 393-403, 2006.
- 12 SUN, S. H.; MURRAY, C. B.; WELLER, D.; FOLKS, L.; MOSER, A. Monodisperse FePt nanoparticles and ferromagnetic FePt nanocrystal superlattices. **Science**, v. 287, n. 5460, p. 189-192, 2000
- 13 SUN, S.; ZENG, H.; ROBINSON, D. B.; RAOUX, S.; RICE, P. M.; WANG, S. X.; LI, G. Monodisperse MFe_2O_4 (M= Fe, Co, Mn) nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 1, p. 273-279, 2004.
- 14 YU, W.W.; FALKNER, J.C.; YAVUZ, C.T.; COLVIN, V.L. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. **Chemical Communications**, n. 20, p. 2306-2307, 2004.

- 15 WANG, C.; SUN, S. Chemical synthesis of monodisperse magnetic nanoparticles. In: KRONMÜLLER, H.; PARKIN, S. **Handbook of magnetism and advanced magnetic materials**. New York: John Wiley, 2007. v.3, p.1-12.
- 16 TARTAJ, P.; MORALES, M. D.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; GONZALES-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. 182-198, 2003.
- 17 LAMER, V. K.; DINEGAR, R. H. Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 72, n. 11, p. 4847-4854, 1950.
- 18 HAO, R.; XING, R.; XU, Z.; HOU, Y.; GAO, S.; SUN, S. Synthesis, functionalization, and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles. **Advanced Materials**, v. 22, n. 25, p. 2729-2742, 2010.
- 19 VEISEH, O.; GUNN, J. W.; ZHANG, M. Q. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 3, p. 284-304, 2010.
- 20 CHORNY, M.; POLYAK, B.; ALFERIEV, I. S.; WALSH, K.; FRIEDMAN, G.; LEVY, R. J. Magnetically driven plasmid DNA delivery with biodegradable polymeric nanoparticles. **Faseb Journal**, v. 21, n. 10, p. 2510-2519, 2007.
- 21 RATA-AGUILAR, A.; SÁNCHEZ-MORENO, P.; JÓDAR-REYES, A. B.; MARTÍN-RODRIGUEZ, A.; BOULAIZ, H.; MARCHAL-CORRALES, J. A.; PEULA-GARCÍA, J. M.; ORTEGA-VINUESA, J. L. Colloidal stability and "in vitro" antitumor targeting ability of lipid nanocapsules coated by folate-chitosan conjugates. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 27, n. 4, p. 308-404, 2012.
- 22 WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, n. 11, p. 397-415, 2008.
- 23 KELLAR, K. E. E. A. NC100150 injection, a preparation of optimized iron oxide nanoparticles for positive-contrast MR angiography. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 11, n. 5, p. 488-494, 2000.
- 24 ZHAO, X.; HARRIS, J. M. Novel degradable poly(ethylene glycol) hydrogels for controlled release of protein. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 11, p. 1450-1458, 1998.
- 25 JEONG, N. I.; NAH, J. W.; NA, K.; KIM, I. S.; CHO, C. S.; KIM, S. H. Self-assembling nanospheres of hydrophobized. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 8, p. 917-927, 1999.
- 26 CHEN, Z. P.; ZHANG, Y.; ZHANG, S.; XIA, J. G.; LIU, J. W.; XU, K.; GU, N. Preparation and characterization of water-soluble monodisperse magnetic iron oxide nanoparticles via surface double-exchange with DMSA. **Colloids and Surfaces**, v. 316, n. 1-3, p. 210-216, 2008.
- 27 XU, C.; XU, K.; GU, H.; ZHENG, R.; LIU, H.; ZHANG, X.; GUO, Z.; XU, B. Dopamine as a

robust anchor to immobilize functional molecules on the iron oxide shell of magnetic nanoparticles. **Journal of the American Chemistry Society**, v. 126, n. 32, p. 9938-9939, 2004.

28 XIE, J.; XU, C.; KOHLER, N.; HOU, Y.; SUN, S. Controlled PEGylation of monodisperse Fe_3O_4 nanoparticles for reduced non-specific uptake by macrophage cells. **Advanced Materials**, v. 19, n. 20, p. 3163-3166, 2007.

29 DE PALMA, R.; PEETERS, S.; VAN BAELE, M. J.; VAN DEN RUL, H.; BONROY, K.; LAUREYN, W.; MULLENS, J.; BORGHES, G.; MAES, G. Silane ligand Exchange to make hydrophobic superparamagnetic nanoparticles water-dispersible. **Chemistry of Materials**, v. 19, n. 7, p. 1821-1831, 2007.

30 ZHU, A. P.; YUAN, L. H.; DAI, S. Preparation of well-disperse superparamagnetic iron oxide nanoparticles in an aqueous solution with biocompatible N-succinyl-O-carboxymethylchitosan. **Journal of Physical Chemistry**, v. 112, n. 14, p. 5432-5438, 2008.

31 XU, X. Q.; SHEN, H.; XU, J. R.; XIE, M. Q.; LI, X. J. The colloidal stability and core-shell structure of magnetite nanoparticles coated with alginate. **Applied Surface Science**, v. 253, n. 4, p. 2158-2164, 2006.

32 VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; MORALES, M. P.; SERNA, C. J. Continuous production of gamma- Fe_2O_3 ultrafine powders by laser pyrolysis. **Materials Letters**, v. 35, n. 3-4, p. 227-231, 1998.

33 KANG, S. A.; RISBUD, S.; RABOLT, J. F.; STROEVE, P. Synthesis and characterization of nanometer-size Fe_3O_4 and $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ particles. **Chemistry Materials**, v. 8, p. 2209-2211, 1996.

34 YU, D.; SUN, X.; ZOU, J.; WANG, Z.; WANG, F.; TANG, K. Oriented assembly of Fe_3O_4 nanoparticles into monodisperse hollow single-crystal microspheres. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 43, p. 21667-21871, 2006.

35 SHAVAL, A.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, B.; SPASOVA, M.; FARLE, M.; LIZ-MARZÁN, L. M. Synthesis and characterization of iron/iron oxide core/shell nanocubes. **Advanced Functional Materials**, v. 17, n. 18, p. 3780-3876, 2007.

36 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.

37 CORR, S. A.; RAKOVICH, Y. P.; GUN'KO, Y. K. Multifunctional magnetic-fluorescent nanocomposites for biomedical applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, n. 3, p. 87-104, 2008.

38 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.

39 TAKAFUJI, M.; IDE, S.; IHARA, H.; XU, Z. Preparation of poly(1-vinylimidazole)-grafted magnetic nanoparticles and their application for removal of metal ions. **Chemistry of Materials**, v. 16, n. 10, p. 1977-1983, 2004.

- 40 HYEON, T. Chemical synthesis of magnetic nanoparticles. **Chemical Communications**, n. 8, p. 927-934, 2003.
- 41 BENFER, M.; REUL, R.; BETZ, T.; KISSEL, T. Folic acid-decorated nanocomposites prepared by a simple solvent displacement method. **Macromolecular Bioscience**, v. 12, n. 4, p. 438-445, 2012.
- 42 STELLA, B.; ARPICCO, S.; PERACCHIA, M. T.; DESMAELE, D.; HOEBEKE, J.; RENOIR, M.; D'ANGELO, J.; CATTEL, L.; COUVREUR, P. Design of folic acid conjugated nanoparticles for drug targeting. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 11, p. 1452-1464, 2000.
- 43 WANG, S.; LOW, P. S. Folate-mediated targeting of antineoplastic drugs, imaging agents, and nucleic acids to cancer cells. **Journal of Controlled Release**, v. 53, n. 1-3, p. 39-48, 1998.
- 44 RESZKA, R.; BECK, P.; FICHTNER, I.; HENTSCHEL, M.; RICHTER, J.; KREUTER, J. Body distribution of free, liposomal and nanoparticle-associated mitoxantrone in B16-melanoma-bearing mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, n. 1, p. 232-237, 1997.
- 45 ALEXIOU, C.; ARNOLD, W.; KLEIN, R. J.; PARAK, F. G.; HULIN, P.; BERGEMANN, C.; ERHARDT, W.; WAGENPFEIL, S.; LUBBE, A. S. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. **Cancer Research**, v. 60, n. 23, p. 6641-6648, 2000.
- 46 TORCHILIN, V. P.; LEVCHENKO, T. S.; LUKYANOV, A. N.; KHAW, B. A.; KLIBANOV, A. L.; RAMMOHAN, R.; SAMOKHIN, G. P.; WHITEMAN, K. R.. p-nitrophenylcarbonyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 1511, n. 2, p. 397-411, 2001.
- 47 ZHANG, Y.; KOHLER, N.; ZHANG, M. Q. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake. **Biomaterials**, v. 23, n. 7, p. 1553-1561, 2002.
- 48 MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, n. 46, p. 10827-10852, 2005.
- 49 KOHLER, N.; SUN, C.; WANG, J.; ZHANG, M. Q. Methotrexate-modified superparamagnetic nanoparticles and their intracellular uptake into human cancer cells. **Langmuir**, v. 21, n. 19, p. 8858-8864, 2005.
- 50 VARANDA, L. C.; IMAIZUMI, M.; SANTOS, F. J.; JAFELICCI JÚNIOR, M. Iron oxide versus Fe₅₅Pt₄₅/Fe₃O₄: improved magnetic properties of core/shell nanoparticles for biomedical applications. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 44, n. 11, p. 4448-4451, 2008.
- 51 CHEON, J. W.; SEO, J. W.; LEE, J. H. **Preparation method of magnetic and metal oxides nanoparticles**. US 2008/0003159 A1, 06 jul. 2008.
- 52 XU, Z.; SHEN, C.; HOU, Y.; GAO, H.; SUN, S. Oleylamine as both reducing agent and stabilizer in a facile synthesis of magnetite nanoparticles. **Chemistry of Materials**, v. 21, n. 9, p. 1778-1780, 2009.

- 53 QU, J.; LIU, G.; WANG, Y.; HONG, R. Preparation of Fe_3O_4 -chitosan nanoparticles used for hypertemia. **Advanced Powder Technology**, v. 21, n. 4, p. 461-467, 2010.
- 54 BAUTISTA, C. M. ; BOMATI-MIGUEL, O.; MORALES, M. D. P.; SERNA, C. J.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S. Surface characterisation of dextran-coated iron oxide nanoparticles prepared by laser pyrolysis and coprecipitation. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, n. 1, p. 20-27, 2005.
- 55 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
- 56 MARQUES, R. F. C. **Nanopartículas de óxidos magnéticos**: Engenharia de superfície visando aplicações em biomedicina. Araraquara: Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, 2006-2007. (Relatório FAPESP nº 05/56761-3).
- 57 SUN, S. H.; FULLERTON, E. E.; WELLER, D.; MURRAY, C. B. Compositionally controlled FePt nanoparticle materials. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 37, n. 4, p. 1239-1243, 2001.
- 58 SUN, S.; ANDERS, S.; THOMSON, T.; BAGLIN, J. E. E.; TONEY, M. F.; HAMANN, H. F.; MURRAY, C. B.; TERRIS, B. D. Controlled synthesis and assembly of FePt nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 23, p. 5419-5425, 2003.
- 59 XU, C. J.; YUAN, Z. L.; KOHLER, N.; KIM, J. M.; CHUNG, M. A.; SUN, S. H. FePt nanoparticles as an Fe reservoir for controlled Fe release and tumor inhibition. **Journal of American Chemical Society**, v. 131, n. 42, p. 15346-15351, 2009.
- 60 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.
- 61 MAITY, D. E. A. Studies of magnetite nanoparticles synthesized by thermal decomposition of iron (III) acetylacetonate in tri(ethyleneglycol). **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, p. 3093-3098, 2009.
- 62 MISODOR. Centro de estudo e treinamento online para provas de medicina, 2008. Disponível em: <<http://www.misodor.com/FARMACON/ACIDO%20AMINOCAPROICO.html>>. Acesso em: 20 maio 2012.
- 63 SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7 ed. New York: John Wiley, 2004. 501p.
- 64 ÜNAK, P. Imaging and therapy with radionuclide labeled magnetic nanoparticles. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 31-37, 2008.
- 65 ROCA, A. G.; MORALES, M. P.; O'GRADY, K.; SERNA, C. J. Structural and magnetic properties of uniform magnetite nanoparticles prepared by high temperature decomposition of organic precursors. **Nanotechnology**, v. 17, n. 11, p. 2783-2788, 2006.

- 66 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.
- 67 CREIXELL, M.; HERRERA, A. P.; LATORRE-ESTEVE, 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.
- 68 BAGARIA, H. G.; ADA, E. T.; SHAMSUZZOHA, M.; NIKLES, D. E.; JOHNSON, D. T. Understanding mercapto ligand exchange on the surface of FePt nanoparticles. **Langmuir**, v. 22, n. 18, p. 7732-7737, 2006.
- 69 SCHKLA, N.; LIU, C.; JONES, P. M.; WELLER, D. FTIR study of surfactant bonding to FePt nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 266, n. 1-2, p. 178-184, 2003.
- 70 ASLAM, M.; FU, L.; LI, S.; DRAVID, V. P. Silica encapsulation and magnetic properties of FePt nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 290, p. 444-449, 2005.
- 71 HERRERA, A. P.; BARRERA, C.; RINALDI, C. Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with aminopropylsilane and carboxymethyldextran. **Journal of Material Chemistry**, v. 18, n. 31, p. 3650-3654, 2008.
- 72 SUDIMACK, J.; LEE, R. J. Targeted drug delivery via the folate receptor. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 41, n. 2, p. 147-162, 2000.
- 73 GABIZON, A.; HOROWITZ, A. T.; GOREN, D.; TZEMACH, D.; MANDELBAUM-SHAVIT, F.; QAZEN, M. M.; ZALIPSKY, S. Targeting folate receptor with folate linked to extremities of poly(ethylene glycol)-grafted liposomes: in vitro studies. **Bioconjugate Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 289-298, 1999.
- 74 BINI, R. A. **Síntese e funcionalização de superfície de óxidos de ferro superparamagnético**. 2011. 122f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.