

RAFAEL ADMAR BINI

SÍNTESE E FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIE DE
ÓXIDOS DE FERRO SUPERPARAMAGNÉTICOS

Tese apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de
Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Jafelicci Jr.

Araraquara

2011

RAFAEL ADMAR BINI

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Araraquara, 19 de agosto de 2011.

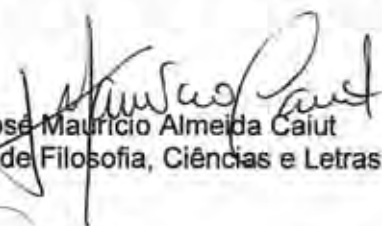
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Miguel Jafelicci Junior (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. José Geraldo Nery
Instituto de Biociências – UNESP, São José do Rio Preto



Prof. Dr. José Maurício Almeida Caiut
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto



Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques
Instituto de Ciência e Tecnologia – UNIFAL, Alfenas



Profª Drª Célia Machado Ronconi
Instituto de Química - UFF, Rio de Janeiro

Dados Curriculares

Nome Rafael Admar Bini
Citações (nome) Bini, R.A.
Filiação Armelindo Admar Bini e Maria Elena Dosciatti Bini
Nascimento 03/11/1982 - Pato Branco/PR - Brasil
Carteira de Identidade 80521634 SSP - PR - 10/04/1997

Endereço residencial AV. DJALMA DUTRA, 1449 (FUNDOS)
CARMO – ARARAQUARA 14800400, SP - Brasil

Endereço eletrônico e-mail para contato: rafaelbini@iq.unesp.br
e-mail alternativo: r_bini11@yahoo.com.br

Formação Acadêmica/Titulação

- 2008 - 2011** Doutorado em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
Título: Síntese, Modificação e Funcionalização de Óxidos Magnéticos para aplicações em biomedicina
Orientador: Miguel Jafelicci Jr.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2005 - 2007** Mestrado em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil
Título: Recobrimento de titânio comercialmente puro modificado superficialmente por feixe de Laser Nd:YAG com cerâmicas de fosfato de cálcio empregando-se o método sol-gel, Ano de obtenção: 2007
Orientador: Antonio Carlos Guastaldi
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2001 - 2004** Graduação em Licenciatura em Química.
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Cascavel, Brasil
Título: Funções Inorgânicas - ácidos e bases: uma contextualização para o ensino
Orientador: Dr Élvio Antônio de Campos
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Projetos

2008 - 2011 Síntese e funcionalização de nanopartículas de óxidos de ferro para aplicações em biomedicina

Descrição: O plano de pesquisa tem como objetivo geral desenvolver metodologia para a obtenção de nanopartículas magnéticas funcionalizadas, compostas por um núcleo magnético de ferritas e recobertas por um polímero bifuncional, visando suas aplicações biomédicas. A síntese consiste na funcionalização direta da superfície das NP com alcoxisilanos com grupos amina não hidrolisáveis durante o processo de coprecipitação. Em seguida, a modificação de superfície nanopartícula-alcoxisilano é feita com ácido fólico, resultando na formação de amida utilizando carbodiimida e um álcool como agente de acoplamento. A caracterização das amostras será realizada por difratometria de raios X, microscopia eletrônica de transmissão, espectroscopia Mössbauer, magnetometria de amostra vibrante e por SQUID, espectrometria UV-VIS, espectrometria infravermelho/Raman, tamanho de partícula e área superficial específica. O tema justifica-se pelo recente desenvolvimento de dispersões de nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de ferro (SPIO sigla em inglês) e agrega novas possibilidades de aplicações destes nanomateriais devido à interação dos seus momentos magnéticos, que podem ser guiados por um campo magnético externo em regiões específicas do corpo humano, reunindo aplicações na biomedicina tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Essas aplicações são possíveis por meio das modificações químicas em sua superfície (funcionalizada). Assim, nanopartículas magnéticas funcionalizadas são constituídas basicamente de um núcleo metálico ou óxido magnético envolvido por uma camada polimérica com sítios que podem ancorar seletivamente drogas ou compostos orgânicos. Dentre esses materiais poliméricos, as classes dos alcoxisilanos são as mais pesquisadas devido à biofuncionalidade, pois um dos grupos hidrolisáveis pode ser substituído por um grupo não hidrolisável

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Doutorado (1);

Integrantes: Rafael Admar Bini (Responsável); Miguel Jafelicci Jr.

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

2005 - 2007 Recobrimentos bioativos de fosfatos de cálcio sobre Ti cp modificado por laser empregado em implantes

Descrição: Pesquisas na área dos biomateriais têm direcionado estudos para o desenvolvimento de um material sintético ou artificial, que tenha propriedades físico-químicas, biológicas e mecânicas semelhantes ao do tecido ósseo. Atualmente, os metais se destacam para implantes sujeitos a carga, mas por não apresentarem interação desejada entre o tecido e o implante, compostos bioativos estão sendo depositados sobre a superfície metálica. Dentre esses, o grupo das apatitas, em especial a hidroxiapatita, ganham destaque por possuírem elementos similares ao tecido ósseo. Assim, tem-se um biocompósito metal-cerâmico, agregando boas propriedades mecânicas e bioativas. Para tanto, o processo sol-gel é uma das técnicas mais flexíveis e promissoras. Este trabalho teve como objetivo modificar a superfície do Ti c.p. por feixe de Laser Nd:YAG e depositar compostos bioativos pelo método sol-gel. Ainda, verificar as fases de apatitas presentes antes e após modificação por Laser, visando suas aplicações clínicas.

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Rafael Admar Bini (Responsável); ;

Financiador(es): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES

Número de produções C,T & A: 2/

2003 - 2004

Obtenção de Materiais Vitro-Cerâmicos constituídos por óxido de cálcio e fósforo: biomateriais

Descrição: Este trabalho tem como objetivo obter biocerâmicas baseadas em sistemas Na₂O-P₂O₅-CaO-SiO₂, de concentrações variadas, os quais deverão ser sintetizadas utilizando-se o método de fusão clássica. Determinar a proporção cálcio/fósforo através de análises químicas, onde a caracterização destes materiais serão realizadas através das medidas de Difração de Raio-X (DRX), espectroscopia no Infravermelho, Análise Térmica Diferencial (DTA) e Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM).

Situação: Concluído: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0);

Integrantes: Rafael Admar Bini; Silvia Denofre de Campos (Responsável); Élvio Antônio de Campos

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Número de produções C,T & A: 3/

Áreas de atuação

1. Química de Materiais
2. Química de Interfaces
3. Físico-Química de Superfície
4. Biomateriais

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. FILHO, E. A., BINI, R. A., FRAGA, ALEXANDRE F., GUASTALDI, A. C. Bioactive coating on titanium implants modified by Nd:YVO₄ laser. **Applied Surface Science.** , v.257, p.4575 - 4580, 2010.

2. BINI, R.A., SANTOS, M.L., FILHO, E.A., MARQUES, R.F.C., GUASTALDI, A.C. Apatite coatings onto titanium surfaces submitted to laser ablation with different energy densities. **Surface & Coatings Technology.** , v.204, p.399 - 403, 2009.

3. FILHO, E. A., BINI, R. A., GUASTALDI, A. C., MARQUES, R. F. C. Influência do espaçamento do feixe de laser Nd:YAG na obtenção de óxidos e nitretos na superfície do titânio em pressão atmosférica. **Matéria (UFRJ).** , v.14, p.787 - 794, 2009.

4. CAMPOS, SILVIA DENOFRE DE, CAMPOS, É. A., SILVEIRA, CRISTIAN BERTO DA, BINI, R. A. Biomateriais à base de Na₂O-CaO-SiO₂-P₂O₅ preparados com serragem e com glucose de milho: influencia na porosidade e na cristalinidade. **Cerâmica** , v.51, p.274 - 279, 2005.

Trabalhos publicados em Congressos

- 1) BINI, R. A., MARQUES, R. F. C., JAFELICCI JR., M., PERREIRA, D.R., PEZZA, L. FERNANDES, F.C.B. Nanopartículas magnéticas modificadas com diferentes alcoxissilanos e funcionalizadas com ácido fólico. *Apresentação Oral, In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.*
- 2) LIMA, J .R. O., BINI, R. A., GHANI, Y. A. CROCIARI, A. FLUMIGNAN, D. L., VARANDA, L. C., OLIVEIRA, J. E. Estudo da otimização das condições reacionais de catálise heterogênea usando SrZrO₃ para a produção de biodiesel. *In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2011, Florianópolis.*
- 3) BINI, R. A., MARQUES, R. F. C., JAFELICCI JR., M., PERREIRA, D.R., COSTA, T.P., CHAKER, J.A. A influência de diferentes alcoxissilanos nas modificações de superfície de nanopartículas magnéticas *In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindoia.*
- 4) BINI, R. A., JAFELICCI JR., M., MARQUES, R. F. C., SANTOS, F, J., PERREIRA, D.R. Magnetite nanoparticles tailored with folic acid through modulated surface with poly(ethylene glycol) diacid. *In: IX SBPMat e IX Brazilian MRS Meeting, 2010, Ouro Preto.*
- 5) BINI, R. A., JAFELICCI JR., M., MARQUES, R. F. C., CHAKER, J.A., COSTA, T.P. Magnetite nanoparticles tailored with folic acid through modulated surface with poly(ethylene glycol) diacid. *In: 11th International conference on advanced Materials, 2009, Rio de Janeiro.*
- 6) BINI, R. A., SANTOS, M. L., FLORENTINO, A. C., SAEKI, M. J., GUASTALDI, A. C. Aplicação do processo sol-gel na obtenção de recobrimentos de HA sobre Ti-6Al-4V e Ti-6Al-7Nb *In: IV Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2006, Caxambu - Mg.*
- 7) OLIVEIRA, N. T. C., BINI, R. A., GUASTALDI, A. C. Obtenção e caracterização de ligas Ti-Mo para aplicações em biomateriais *In: IV Congresso latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2006, Caxambu.*
- 8) BINI, R. A., ZUCCHI, O. J. A Química e a Educação *In: XII Encontro Nacional de Ensino em Química, 2004, Goiânia - Go.*
- 9) BINI, R. A., CAMPOS, Silvia Denofre de, CAMPOS, Élvio Antonio de, SILVEIRA, Cristian Berto da Obtenção de Biovidros pelo Método de Fusão Clássico *In: XXVI Congresso Latinoamericano de Química e XXVII Reunião Anual da SBQ, 2004, Salvador - BA.*

- 10) BINI, R. A., SILVEIRA, Cristian Berto da, CAMPOS, Silvia Denofre de, CAMPOS, Élvio Antonio de, OLLIVEIRA, Deise Maria Pereira de. Obtenção de Biovidros pelo Método de Fusão Clássico *In: XII Encontro de Química da Região Sul, 2004, Guarapuava.*
- 11) BINI, R. A., CAMPOS, Silvia Denofre de, CAMPOS, Élvio Antonio de, SILVEIRA, Cristian Berto da Porosity Influence In Biomaterials Crystallinity *In: BRAZILIAN MRS MEETING 2004, 2004, Foz do Iguaçu - Paraná.*
- 12) BINI, R. A., CAMPOS, Silvia Denofre de, CAMPOS, É. A., SILVEIRA, Cristian Berto da Síntese de Materiais Bioativos baseados no sistema $\text{Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-SiO}_2$. *In: XII ENEQ, III ECOQ, XIII ECODEQ, 2004, Goiânia - GO.*
- 13) BINI, R. A., CAMPOS, Silvia Denofre de, SILVEIRA, Cristian Berto da, CAMPOS, Élvio Antonio de. Síntese de Materiais Bioativos baseados no sistema $\text{Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-SiO}_2$ *In: XII Encontro Anual de Iniciação Científica, 2004.*

“Ao transferir bens materiais, o doador perde a sua posse. Há, porém, alguns atributos intrínsecos que não podem ser transferidos de um indivíduo para o outro (...). O conhecimento, por outro lado, é algo tão importante que os deuses decidiram que o doador pode retê-lo mesmo que o tenha transmitido.”

Atribuído a Pitágoras de Samos, cerca de 2.500 anos atrás.

Agradecimentos

Aos meus Pais pelas palavras de força e de motivação, e pelo esforço desmedido para que eu pudesse realizar meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Miguel Jafelicci Jr. pela amizade, compreensão, sugestões, convívio e principalmente pelos ensinamentos não relacionados à química, mas à vida acadêmica e cotidiana.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques pela amizade, sugestões e incentivo à minha pesquisa na fascinante área de nanotecnologia.

Ao Professor Juliano Chacker, da Universidade de Brasília, pela análises das propriedades magnéticas dos materiais estudados.

Aos amigos do Laboratório de Colóides e Materiais, Francisco (Chicão), Wesley, Maria Aparecida, Eloisa, Daniel, Douglas e Caio, pela ajuda, conversas, cafezinho e, sobretudo, pela amizade.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Físico-Química pelo auxílio, sugestões e amizade, em especial ao Sebastião, à Maria Helena, ao Ricardo e à Neide. A todo o corpo docente, discente e funcionários do Instituto de Química de Araraquara, em especial aos dos departamentos de Físico-Química e Química Geral e Inorgânica.

Aos funcionários da Biblioteca e da Seção de Pós-Graduação pela dedicação e serviços prestados.

A minha namorada Juliana pela paciência e compreensão em “muitos momentos”.

Aos amigos do almoço e a todos aqueles que participaram ativa e intensamente do período em que estive no Instituto, os quais, para não cometer injustiças, não citarei nomes, mas tenham a certeza de que vocês sabem quem e como foram importantes.

Aos amigos das reuniões ao cair da tarde e dos churrascos, onde tínhamos o prazer de enaltecer as mais profundas discussões científicas.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta Tese e tornaram a minha passagem pelo Instituto muito agradável e proveitosa.

À CNPq pela bolsa concedida.

Lista de Abreviaturas e Siglas

A0 – amostra sintetizada sem ultrassom

A21 – amostra sintetizada com 21% de amplitude acústica

A25 – amostra sintetizada com 25% de amplitude acústica

A30 – amostra sintetizada com 21% de amplitude acústica

APTS – 3-aminopropil-trietóxisilano

APDS – 3-aminopropil-etil-dietóxisilano

APES – 3-aminopropil-dietil-etóxisilano

AF – ácido fólico

H_c – campo coercivo ou coercividade

M_r – magnetização remanente

M_s – magnetização de saturação

NP – nanopartícula

NPM – nanopartícula multifuncional

SPIO – superparamagnetic iron oxide

SPM – superparamagnético

rSPM – raio superparamagnético

US – ultrassom

ξ – potencial zeta

κ – parâmetro Debye-Huckel

k_u – constante de anisotropia magnética

Lista de Ilustrações

FIGURA 1. ESQUEMA DA POSSÍVEL INTERAÇÃO DE DUAS NANOPARTÍCULAS EM SISTEMAS BIOLÓGICOS ⁶ .	22
FIGURA 2. ESTRUTURA CRISTALINA DE UMA CÉLULA UNITÁRIA, CÚBICA DE FACE CENTRADA, DO TIPO ESPINÉLIO ¹⁴ .	25
FIGURA 3. RELAÇÕES ENTRE PRESSÃO, ENERGIA E TEMPO MOSTRADAS PARA SONOQUÍMICA E TAMBÉM PARA OUTROS CAMPOS DA QUÍMICA E DA FÍSICA ^{44,45} .	28
FIGURA 4. REGIÃO DE FREQUÊNCIA DO SOM ⁴³ .	29
FIGURA 5. CRIAÇÃO, CRESCIMENTO E COLAPSO DE UMA BOLHA FORMADA EM UM LÍQUIDO ⁵⁰ .	32
FIGURA 6. UM TÍPICO APARATO SONOQUÍMICO COM DIRETA IMERSÃO Sonda ULTRASSÔNICA. ULTRASSOM PODE SER FACILMENTE INTRODUZIDO DENTRO DE UMA REAÇÃO QUÍMICA COM BOM CONTROLE DE ATMOSFERA E TEMPERATURA ⁵⁰ .	32
FIGURA 7. 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 .	37
FIGURA 8. VARIAÇÃO DA COERCIVIDADE (H_c) DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS COM TAMANHO ⁵ .	38
FIGURA 9. ILUSTRAÇÃO DO PROCESSO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA MOSTRANDO O PRINCÍPIO E O PAPEL DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS COMO UM AGENTE DE CONTRASTE: ACIMA: (A) REDE DE SPINS MAGNÉTICOS (M) DA PRECESSÃO DOS PRÓTONS DA ÁGUA EM TORNO DA DIREÇÃO DO CAMPO MAGNÉTICO EXTERNO APLICADO (B_0), (B) MEDIANTE APLICAÇÃO DE UM PULSO DE RF, M COMEÇA PRECESSÃO PERPENDICULARMENTE AO B_0 ; (C) M RELAXA DE VOLTA PARA SEUS ESTADOS DE EQUILÍBRIO ORIGINAL ATRAVÉS MODOS LONGITUDINAL (T_1) E (D) TRANSVERSAL (T_2); (E) NA PRESENÇA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS, OS SPINS DOS PRÓTONS DA ÁGUA COMEÇAR A PRECESSÃO DE FORMA NÃO HOMOGÊNEA SOB O EFEITO ADICIONAL DO CAMPO LOCAL DIPOLAR (B_1). CONSEQUENTEMENTE, RELAXAR MAIS RÁPIDO INDUZE UM SINAL FORTE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA, QUE PRODUZ EFEITOS DE CONTRASTE ESCURO ⁵ .	40
FIGURA 10. FENÔMENOS DE REVERSÃO DA MAGNETIZAÇÃO PARA GERAÇÃO DE CALOR SOB O EFEITO DE UM CAMPO MAGNÉTICO ALTERNADO (B_0, f). À ESQUERDA, MECANISMO DE PERDA HISTERESE DE GERAÇÃO DE CALOR POR NANOPARTÍCULAS DE FERRO- E FERRIMAGNÉTICO. MECANISMO DE RELAXAÇÃO DE NÉLL (AO CENTRO) E DE BROWN (À DIREITA) PARA GERAÇÃO DE CALOR POR NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS ⁵ .	43
FIGURA 11. ESQUEMA DAS REAÇÕES DE HIDRÓLISE E CONDENSAÇÃO DE ALCOXISSILANOS NA FUNCIONALIZAÇÃO DE SUPERFÍCIES DE NANOPARTÍCULAS ⁷² .	47
FIGURA 12. ILUSTRAÇÃO DA NANOPARTÍCULA MULTIFUNCIONAL (NPM) TERAPÊUTICA E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO AO NÍVEL CELULAR. (A) UM NPM MODIFICADA COM MOLÉCULAS ALVO E AGENTES DE IMAGEM, COMO TAMBÉM POTENCIAL CARGAS TERAPÊUTICAS (GENE, RADIO, QUÍMIO). (B) QUATRO POSSÍVEIS MODOS DE AÇÃO PARA VÁRIOS AGENTES TERAPÊUTICOS: (A) NPM LIGANDO-SE A RECEPTORES DA SUPERFÍCIE CELULAR FACILITANDO-SE A SUA INTERNALIZAÇÃO, (B) LIBERAÇÃO CONTROLADA INTERCELULAR DE QUIMIOTERÁPICOS, (C) LIBERAÇÃO DO GENE TERAPÊUTICO PÓS INTERAÇÃO ENDOSSOMAL E POSTERIOR ALVO DO NÚCLEO E (D) DECAIMENTO INTRACELULAR DE MATERIAIS RADIOATIVOS ⁶⁵ .	49
FIGURA 13. REPRESENTAÇÃO DA INTERFACE ENTRE A NANOPARTÍCULA E UMA BICAMADA LIPÍDICA ⁶	51
FIGURA 14. EFEITOS DA COROA DE PROTEÍNA EM TORNO DE UMA NANOPARTÍCULA. A COROA REPRESENTA UMA INTERFACE PRIMÁRIA NANO-BIO, QUE DETERMINA O DESTINO DA NANOPARTÍCULA E PODE CAUSAR EFEITOS DELETÉRIOS SOBRE AS PROTEÍNAS	

INTERATIVAS. AS CARACTERÍSTICAS DO MATERIAL PRÉ-EXISTENTE OU INICIAL CONTRIBUEM PARA A FORMAÇÃO DA COROA EM UM AMBIENTE BIOLÓGICO. CARACTERÍSTICA DA COROA DE PROTEÍNA, TAIS COMO, TAXAS DE DESAGREGAÇÃO, INTERAÇÕES COMPETITIVAS ENTRE MOLÉCULAS POR IMPEDIMENTO ESTÉRICO E POLÍMEROS ADSORVIDOS, E O PERFIL DE PROTEÍNAS DO FLUIDO CORPORAL LEVAM A MUDANÇAS DINÂMICAS NA COROA. A COROA PODE MUDAR QUANDO AS PARTÍCULAS SE MOVEM DE UM COMPARTIMENTO BIOLÓGICO PARA OUTRO ⁶ .	52
FIGURA 15. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE NANOPARTÍCULAS QUE DETERMINAM SUAS BIOCAMPATIBILIDADES <i>IN VIVO</i> ^{6,7} .	55
FIGURA 16. CURVA PADRÃO DA SOLUÇÃO DE 4-NITROBENZALDEÍDO EM 267 NM UTILIZADA PARA DETERMINAR A CONCENTRAÇÃO DO GRUPO AMINA NA SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS.	61
FIGURA 17. ESQUEMA GERAL PARA REPRESENTAR O PROCESSO DE FORMAÇÃO DE MAGNETITA UTILIZADA NESTE TRABALHO.	66
FIGURA 18. DIFRATOGRAMAS DAS AMOSTRAS SINTETIZADAS VIA COPRECIPITAÇÃO/ULTRASSOM; (A) SEM ULTRASSOM – A0, (B) A21, (C) A25 E (D) A30.	67
FIGURA 19. FORMAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM ÁGUA, EM PRESSÃO E ATMOSFERA AMBIENTE SONICADA A 25 KHZ.	71
FIGURA 20. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DOS ÓXIDOS FERRO SEM US – AMOSTRA A0 (A) E (B), E SOB A INFLUÊNCIA DO US – AMOSTRA A21 (C) E (D), AMOSTRA A25 (E) E (F), AMOSTRA A30 (G) E (H).	73
FIGURA 21. ALCOXISSILANOS UTILIZADOS NESTE TRABALHO; (A) 3-AMINOPROPIL-TRIEÓXISILANO (APTS), (B) 3-AMINOPROPIL-ETIL-DIETÓXISILANO (APDS) E (C) 3-AMINOPROPIL-DIETIL-ETÓXISILANO (APES)	74
FIGURA 22. DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DAS AMOSTRAS MODIFICADAS; (A) AMOSTRA A30 (NP SEM FUNCIONALIZAÇÃO); (B) AMOSTRA A30-APTS (NP FUNCIONALIZADA COM APTS); (C) AMOSTRA A30-APES (MAGNETITA FUNCIONALIZADA COM APES); (D) AMOSTRA A30-APDS (MAGNETITA FUNCIONALIZADA COM APDS).	75
FIGURA 23. DIFRATOGRAMAS DE RAIOS X DAS AMOSTRAS MODIFICADAS; (A) AMOSTRA A30-(TS/DS), (B) AMOSTRA A30-(TS/DS/ES), (C) AMOSTRA A30-(DS/ES); (D) AMOSTRA A30-(TS/ES).	75
FIGURA 24. ESPECTRO DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS A30 (A), A30-APES (B), A30-APDS (C), A30-APTS (D).	77
FIGURA 25. ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS: (A) A30-APTS, A30-APDS, A30-APES E (B) A30-TS/DS, A30-TS/DS/ES, A30-DS/ES, A30-TS/ES.	77
FIGURA 26. ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS: (A) A30-APTS, A30-APDS, A30-APES E (B) A30-TS/DS, A30-TS/DS/ES, A30-DS/ES, A30-TS/ES.	78
FIGURA 27. MODELO DE POSSÍVEIS CONFORMAÇÕES DE ADSORÇÃO DOS ALCOXISSILANOS SOBRE A SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS; (A) 3-AMINOPROPIL-TRIEÓXISILANO (APTS), (B) 3-AMINOPROPIL-ETIL-DIETÓXISILANO (APDS) E (C) 3-AMINOPROPIL-DIETIL-ETÓXISILANO (APES).	79
FIGURA 28. ESQUEMA MECANÍSTICO DA REAÇÃO ENTRE BENZALDEÍDO E AMINA PARA A FORMAÇÃO DE IMINA NA SUPERFÍCIE DE NP FUNCIONALIZADAS COM ALCOXISSILANOS ⁷² .	80
FIGURA 29. ESQUEMA MECANÍSTICO DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE DA LIGAÇÃO IMINA ⁷² .	80
FIGURA 30. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DA MODIFICAÇÃO DE SUPERFÍCIE COM OS ALCOXISSILANOS, (A,B) A30-APTS, (C,D) A30-APDS E (E,F) A30-APES. AS BARRAS NAS MICROGRAFIAS REPRESENTAM 500 NM (ESQUERDA) E 100 NM (DIREITA).	83
FIGURA 31. MEDIDAS DE MAGNETIZAÇÃO ZFC-FC, (A) A30, (B) A30-APES, (C) A30-APDS E (D) A30-APTS.	85

FIGURA 32. CURVAS DE MAGNETIZAÇÃO VS CAMPO MAGNÉTICO: (A) A30, (B) A30-APES, (C) A30-APDS E (D) A30-APTS. INSERIDA AO LADO DIREITO DE CADA IMAGEM TEM-SE A MESMA MEDIDA DE MAGNETIZAÇÃO, CONTUDO NUMA ESCALA DE BAIXO CAMPO MAGNÉTICO.	86
FIGURA 33. CURVA DO POTENCIAL ZETA (ζ) EM FUNÇÃO DO PH PARA AS AMOSTRAS SEM E COM MODIFICAÇÃO COM OS ALCOXISSILANOS. FORÇA IÔNICA AJUSTADA EM 1×10^{-3} MOLL ⁻¹ DE NaCl	87
FIGURA 34. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS POSSÍVEIS CONFORMAÇÕES DA CONDENSAÇÃO DE ALKOXISSILANOS SOBRE A SUPERFÍCIE DAS NPs ¹⁰⁹ .	89
FIGURA 35. DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DAS AMOSTRAS MEDIDAS POR DLS VS. TEMPO, (A) A30, (B) A30-APES, (C) A30-APDS E (D) A30-APTS.	91
FIGURA 37. ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO FÓLICO. SOFTWARE ACD/3D VIEWE – CHEMSKETCH.	93
FIGURA 38. REPRESENTAÇÃO POR DIAGRAMA DO PROCESSO DE ENDOCITOSE MEDIADA PELO RECEPTOR FOLATO ¹¹⁶ .	95
FIGURA 39. ESQUEMA MECANÍSTICO REPRESENTANDO A FORMAÇÃO DA LIGAÇÃO AMIDA ENTRE A MOLÉCULA DE ÁCIDO FÓLICO E AMINA DA SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS (A) ¹²¹ . CARBOIDIIMIDA SOLÚVEL EM MEIO AQUOSO, EDC, E SEU SUB-PRODUTO DA UREIA (B).	96
FIGURA 40. ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DAS AMOSTRAS DE ÁCIDO FÓLICO E A30/APTS/AF.	97
FIGURA 41. ESPECTROS NO INFRAVERMELHO REFERENTES ÀS AMOSTRAS A30/APTS/AF (A), A30/APDS/AF (B), E A30/APES/AF (C).	98
FIGURA 42. DECONVOLUÇÃO GAUSSIANA DA REGIÃO ENTRE 1730–1660 CM ⁻¹ . O PICO 1 REFERE-SE AO ESTIRAMENTO C=O DA LIGAÇÃO AMIDA, ENQUANTO OS PICO 2 E 3 REFEREM-SE AO ESTIRAMENTO C=O DA LIGAÇÃO DO ÁCIDO CARBOXÍLICO.	99
FIGURA 43. ESQUEMA MECANÍSTICO PARA REAÇÃO ENTRE O P-DAC E O NP/ALCOXISSILANO/AF.	101
FIGURA 44. ESPECTROS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VIS (A) E A CURVA ANALÍTICA DO AF/P-DAC (B)	102
FIGURA 45. GRÁFICO DO POTENCIAL ZETA EM FUNÇÃO DO PH PARA AS AMOSTRAS DE SPIO, SPIO/APTS E SPIO/APTS/AF. FORÇA IÔNICA DE 1×10^{-3} MOL L ⁻¹ DE NaCl.	103
FIGURA 46. GRÁFICOS DO POTENCIAL ZETA EM FUNÇÃO DO PH PARA A AMOSTRA FUNCIONALIZADAS COM AF; (A) A30/APTS/AF, (B) A30/APDS/AF E (C) A30/APES/AF. FORÇA IÔNICA DE 1×10^{-3} MOL L ⁻¹ DE NaCl.	104
FIGURA 47. COMPORTAMENTO DO DIÂMETRO HIDRODINÂMICO DAS DISPERSÕES EM DIFERENTES SOLUÇÕES SALINAS, (A) SPIO/APTS/AF, (B) SPIO/APDS/AF E (C) SPIO/APES/AF.	106

Lista de Tabelas

TABELA I. ÓXIDOS, HIDRÓXIDOS E OXI-HIDRÓXIDOS DE FERRO ¹⁰	24
TABELA II. COMPARAÇÃO DE DIFERENTES CARACTERÍSTICAS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE FERRO FABRICADAS ATRAVÉS DE DIFERENTES MÉTODOS ³⁵ .	26
TABELA III. AMOSTRAS SUBMETIDAS À ENERGIA ULTRASSÔNICA POR UM PERÍODO DE 60 MIN.	57
TABELA IV. PLANEJAMENTO FATORIAL DA FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.	59
TABELA V. REAÇÕES EM SOLUÇÃO AQUOSA DO FERRO (II) E (III) ¹⁰	67
TABELA VI. TAMANHO MÉDIO DAS NANOPARTÍCULAS	69
TABELA VII. DENSIDADE DE AMINA NA SUPERFÍCIE DAS NPS DAS DIFERENTES AMOSTRAS.	81
TABELA VIII. VALORES DO PH DO PIE TEÓRICOS DOS GRUPOS SILANOL, AMINA E ÓXIDOS DE FERRO MAGNÉTICO; E OS EXPERIMENTAIS DAS AMOSTRAS.	89
TABELA IX. FREQUÊNCIAS DE ABSORÇÃO CARACTERÍSTICAS NA REGIÃO NO INFRAVERMELHO DAS AMIDAS ¹²² .	99
TABELA X. RESULTADOS DA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO NA SUPERFÍCIE DE SPIO.	102

Resumo

A funcionalização de dispersões de nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de ferro (SPIO – sigla em inglês) com moléculas bioativas, possibilita novas aplicações destes nanomateriais uma vez que a interação dos seus momentos magnéticos pode ser guiada por um campo magnético externo, o qual é dependente do revestimento da superfície das nanopartículas. Essas dispersões com propriedades superparamagnéticas podem ser utilizadas como agentes de contraste em imagem por ressonância magnética para diagnosticar tumores e doenças cardiovasculares, hipertermia na terapia do câncer e separação magnética de células e biomoléculas. Neste trabalho, nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de ferro com tamanho entre 30 e 12 nm foram obtidas via método de coprecipitação assistida por ultrassom. Medidas de magnetização versus campo magnético mostraram comportamento superparamagnético para os óxidos de ferro sintetizados via método de sonoprecipitação química. A superfície dos SPIO sintetizados foi modificada com os reagentes 3-aminopropil-trietóxisilano (APTS), 3-aminopropil-etil-dietóxisilano (APDS) e 3-aminopropil-dietil-etóxisilano (APES). As modificações da superfície com os alcoxissilanos foram realizadas após a formação do SPIO, a qual proporcionou a modificação *in situ* das nanopartículas em um único passo. A funcionalização dos SPIO com ácido fólico (AF) foi realizada via método das carboidiimidias. As amostras foram caracterizadas pelas técnicas de difração de raios X, microscopia eletrônica de transmissão, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, espectroscopia no UV-Vis, mobilidade microeletroforética e espalhamento de luz dinâmico. As análises das amostras SPIO/ALCOXISSILANO/AF sintetizadas mostraram que as propriedades são dependentes da estrutura química do alcoxissilano utilizado. As diferentes moléculas dos alcoxissilanos resultaram em diferentes densidades de amina na superfície, que também influenciaram o teor de ácido fólico na superfície das nanopartículas. A presença de um grupo etila na molécula de APDS e de dois grupos etila na molécula de APES causou diferentes comportamentos em relação à estabilidade cinética coloidal do sistema em solução de eletrólito. Medidas de mobilidade microeletroforética e espalhamento de luz revelaram-se para as amostras, contendo os grupos etilas menores potenciais de superfície quando comparada com a amostra modificada com APTS. Porém, apresentaram o comportamento mais estável com menor formação de agregados. A presença do grupo etila no modificador de superfície proporcionou uma estabilização eletroestérica nas suspensões, sugerindo que as nanopartículas modificadas com APES são adequadas para utilização em sistemas biológicos, devido à maior estabilidade cinética coloidal da dispersão.

Abstract

The functionalization of superparamagnetic iron oxide (SPIO - acronym in English) nanoparticles with bioactive molecules enables new possible applications of these nanomaterials due to the fact that the interaction of their magnetic moments can be guided by an external magnetic field, which is dependent on the surface coating of nanoparticles. These dispersions with superparamagnetic properties can be used as contrast agent in magnetic resonance imaging to diagnose tumors, cardiovascular diseases for hyperthermia in cancer therapy and for magnetic separation of cells and biomolecules. In this study, superparamagnetic iron oxide nanoparticles with a size between 30 and 12 nm were obtained via the coprecipitation method assisted by ultrasound. Magnetization versus magnetic field measurements showed superparamagnetic behavior for the synthesized iron oxide by chemical sonoprecipitation method. The SPIO synthesized surface was modified with 3-aminopropyl-triethoxysilane (APTS), 3-aminopropyl-ethyl-diethoxysilane (APDS) and 3-aminopropyl-diethyl-ethoxysilane (APES). The surface modifications with alkoxy silanes were conducted after the SPIO formation, which provided an *in situ* modification of nanoparticles in a single step. SPIO functionalization with folic acid (FA) was performed via the carbodiimides method. The samples were characterized by techniques of X-ray diffraction, transmission electron microscopy, infrared and UV-Vis spectroscopy, microelectrophoretic mobility and dynamic light scattering. Sample analysis (SPIO/ALKOXY SILANE/FA) showed that the properties were dependent on the chemical structure of alkoxy silane used. The different molecules of alkoxy silanes resulted in different amine densities on the surface, which also influenced the content of folic acid on the nanoparticles surface. The presence of an ethyl group in the APDS molecule and two ethyl groups in the APES molecule caused different behaviors in relation to colloidal kinetic stability of the system in electrolyte solution. Microelectrophoretic mobility and light scattering measures revealed for the samples containing ethyl groups lower potential surface compared to samples modified with APTS. However, APES and APDS showed a more stable behavior and with minor formation of aggregates. The presence of ethyl group, in the surface modifier, provided an electrosteric stabilization in suspensions, suggesting that nanoparticles modified with APES are suitable for use in biological systems due to their greater colloidal kinetic stability of dispersion.

Sumário

I. INTRODUÇÃO	17
I.1. REVISÃO DA LITERATURA	23
I.2. INTRODUÇÃO AOS ÓXIDOS DE FERRO	23
<i>I.2.a Métodos de síntese de nanopartículas de óxidos de ferro</i>	26
<i>I.2.b. Ultrassom – Sonoquímica</i>	27
<i>I.2.c. Sonoquímica na produção de óxidos de ferro</i>	33
I.3. GENERALIDADES DAS PROPRIEDADES MAGNÉTICAS	35
<i>I.3.a. Nanopartículas magnéticas para técnica de imagem por ressonância magnética (IRM)</i>	39
<i>I.3.b. Nanopartículas magnéticas para tratamento de hipertermia</i>	41
I.4. ENGENHARIA DE SUPERFÍCIE DE NANOPARTÍCULAS PARA PROPÓSITOS MÉDICOS	44
<i>I.4.a. Preparação da superfície dos SPIO com os reagentes alcoxissilanos</i>	45
<i>I.4.b. Alvos específicos de nanopartículas de óxido de ferro</i>	47
<i>I.4.c. Interface Nano-bio</i>	49
I.5. INICIO DOS ESTUDOS DESTE TRABALHO	55
II. OBJETIVOS	56
III. PARTE EXPERIMENTAL	57
III.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	57
III.2. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS	57
III.3. MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS COM ALCOXISSILANOS	58
III.4. QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO GRUPO AMINA LIVRES NA SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS SINTETIZADAS	59
III.5. FUNCIONALIZAÇÃO DA SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS COM ÁCIDO FÓLICO	61
III.6. QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO NA SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS SINTETIZADAS	62
III.7. DIFRAÇÃO DE RAIOS X	62
III.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.	62
III.9. ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER	63
III.10 MOBILIDADE ELETROFORÉTICA	63
III.11. MEDIDAS DE ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO	64
III.12. PROPRIEDADES MAGNÉTICAS	65
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
IV.1.SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO MAGNÉTICO	66
IV.1.A. DIFRATOMETRIA DE RAIOS X	66
IV.1.B FORMAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	70
IV.1.C. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.	71

III.2. MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS ÓXIDOS DE FERRO MAGNÉTICOS	74
IV.2.A. DIFRAÇÃO DE RAIOS X	74
IV.2.B. ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	76
IV.2.C. DENSIDADE DE AMINA DAS NANOPARTÍCULAS SINTETIZADAS	80
IV.2.D. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	82
IV.2.E. PROPRIEDADES MAGNÉTICAS – MAGNETIZAÇÃO VS. TEMPERATURA	83
IV.2.F. PROPRIEDADES MAGNÉTICAS – MAGNETIZAÇÃO VS. CAMPO MAGNÉTICO	85
IV.2.G. ESTUDO DAS PROPRIEDADES COLOIDAIIS DOS ÓXIDOS MAGNÉTICOS SINTETIZADOS	87
<i>IV.2.g.i Mobilidade microeletroforética</i>	<i>87</i>
<i>IV.2.g.ii Medidas de espalhamento de luz dinâmico</i>	<i>89</i>
IV.3. FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS COM ÁCIDO FÓLICO	93
IV.3.A. FORMAÇÃO DE AMIDA USANDO CARBODIIMIDA COMO AGENTE DE ACOPLAMENTO	95
IV.3.B. ESPECTROMETRIA NO INFRAVERMELHO	96
IV.3.C. QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO NA SUPERFÍCIE DAS NANOPARTÍCULAS	100
IV.3.D. MEDIDAS DE MOBILIDADE ELETROFORÉTICA E RAIOS HIDRODINÂMICO	102
V. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	107
V.1. CONCLUSÕES	107
V.2 PERSPECTIVAS	108
REFERÊNCIAS	109

I. INTRODUÇÃO

O estudo de sistemas cujos tamanhos das partículas encontram-se na faixa dos nanômetros ganhou importância no final do século XX, o que proporcionou o aparecimento e a consolidação de toda uma área de conhecimento, hoje reconhecida como “Nanociência e Nanotecnologia”. A palavra Nano, que significa ‘anão’, em grego, é o prefixo usado na notação científica para expressar a fração de um bilionésimo. Um nanômetro (nm) equivale a 10^{-9} m. Considerando essa escala de tamanho, um vírus, por exemplo, invisível a olho nu, apresenta-se como uma entidade com cerca de 200 nm^{1,2}.

A Nanotecnologia envolve a modelagem e o controle da matéria em dimensões nanométricas e a Nanociência pode ser considerada a ciência que estuda as novas propriedades que advêm da dimensão da matéria. As propriedades dos materiais (ópticas, elétricas, magnéticas, de transporte, catalíticas, etc) são fortemente dependentes do tamanho das partículas que constituem o material. Quando as partículas do material estão abaixo de um tamanho crítico, as propriedades se tornam diferenciadas¹.

Devido a essas novas propriedades, as nanopartículas magnéticas são a maior classe de materiais com potencial para revolucionar os atuais diagnósticos clínicos e as técnicas terapêuticas³. Materiais magnéticos em escala nanométrica, que apresentam magnetização apenas na presença de um campo magnético externo, mas que não permaneçam magnetizados quando ocorre a remoção do campo magnético, são denominados superparamagnéticos. Esta é uma propriedade exclusiva de nanopartículas magnéticas, as quais melhoram a relaxação do próton em tecidos específicos, servindo 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. Contudo, essas aplicações na biomedicina só serão possíveis devido às modificações químicas na superfície das nanopartículas com moléculas,

íons específicos, nucleotídeos, oligonucleotídeos, peptídeos, vitaminas, antibióticos, etc., os quais possibilitam inúmeras aplicações, além de conferir biocompatibilidade aos fluidos magnéticos^{4,5}.

O uso de nanopartículas magnéticas em sistemas biológicos possibilita o encontro de dois mundos diferentes, o inorgânico (sintético) e o orgânico. A interface entre os nanomateriais e biomoléculas é chamada de interface “nano-bio” e compreende as interações físico-químicas dinâmicas, as trocas cinéticas e termodinâmicas entre a superfície do material e a superfície de componentes biológicos⁶, tais como proteínas, membranas, fosfolipídios, organelas, DNA, RNA, etc.

A interface nano-bio é composta por três componentes: (i) pela superfície das nanopartículas, cujas características são determinadas por sua composição físico-química, (ii) pela interface sólido-líquido e (iii) pela zona de interface sólido-líquido em contato com substratos biológicos⁶. Em um dado meio de dispersão, as características das nanopartículas, que determinam as propriedades de superfície, decorrem da composição química do material, da funcionalização da superfície, da forma, da cristalinidade, da heterogeneidade e da razão hidrofobicidade/hidrofilicidade⁷. Outras propriedades, tais como, carga de superfície eficaz (potencial zeta), agregação de partículas e o estado de estabilidade são determinadas pelas características do meio de dispersão^{6,8}.

A introdução de nanopartículas em um meio de dispersão biológico pode gerar a desestabilização do sistema resultante, uma vez que o meio fisiológico tem diferentes características em relação ao meio de preparação dos nanomateriais, como, por exemplo, a força iônica. As interações entre as nanopartículas e as células parecem incluir alguns dos mesmos princípios existentes entre partículas coloidais, mas elas requerem uma consideração especial devido à sua complexidade na superfície^{8,9}. A Figura 1 mostra um modelo das forças

que atuam em sistemas coloidais e outras interações importantes que ocorrem quando as partículas estão suspensas em meios biológicos⁶.

O uso de nanopartículas magnéticas para aplicações na biomedicina requerer uma alta qualidade dos nanomateriais. As propriedades, tais como, de magnetização, de tamanho, de estabilidade coloidal e de funcionalização da superfície (quantidade de agentes específicos), são parâmetros que devem ser mantidos sob controle⁵. Portanto, a caracterização da interface sólido-líquido é um desafio fundamental para compreender interações na interface nano-bio⁶. A compreensão das propriedades na interface sólido-líquido entre sistemas biológicos e nanomateriais possibilita a introdução de novos recursos, que poderão ser usados para controlar a exposição e a biodisponibilidade de moléculas farmacologicamente ativas para aplicações biomédicas.

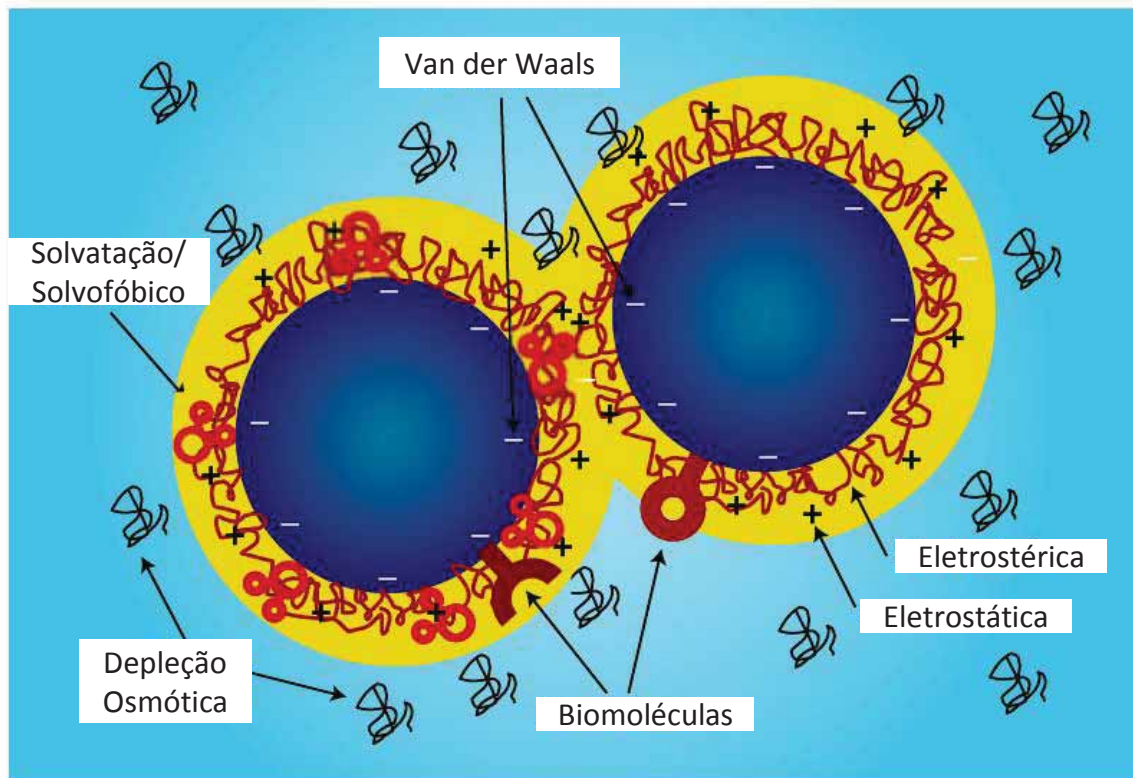


Figura 1. Esquema da possível interação de duas nanopartículas em sistemas biológicos⁶.

I.1. Revisão da Literatura

Esta revisão foi organizada da seguinte forma: após uma introdução sobre os tipos de óxidos de ferro, foram apresentados alguns dos métodos de síntese de nanopartículas, incluindo o utilizado neste trabalho. As propriedades magnéticas foram discutidas, com objetivo de destacar os parâmetros físicos das nanopartículas magnéticas que poderiam ser manipulados, a fim ter um melhor desempenho nas aplicações de imagem por ressonância magnética e de hipertermia magnética. Em seguida, aspectos relevantes relacionados com a engenharia da superfície de nanopartículas foram considerados - etapa importante para as possíveis utilizações das nanopartículas magnéticas em biomedicina, destacando-se os desafios e as limitações que têm sido enfrentadas até a presente data.

I.2. Introdução aos óxidos de Ferro

Óxidos de ferro são compostos comuns que são espalhados na natureza e prontamente sintetizados em laboratório. Eles estão presentes em quase todos os diferentes compartimentos do sistema terrestre: atmosfera, biosfera, hidrosfera e litosfera, estando em múltipla inter-relação com esses compartimentos. Inicialmente, a formação de óxidos de Fe(III) predominantemente envolve desgaste aeróbico de rochas magmáticas em ambos ambientes territoriais e marinhos. Tais processos envolvem o transporte mecânico pela erosão água/vento da pedosfera para a hidrosfera e atmosfera, ou, mais importante, há a dissolução redutiva seguida pela migração de Fe(II) e reprecipitação oxidativa em um novo compartimento. A formação de minério de ferro e a precipitação de óxidos de ferro em biota são exemplos importantes da redistribuição¹⁰.

Existem 16 tipos de compostos a base de ferro (Tabela I), os quais são divididos em óxidos, hidróxidos ou oxi-hidróxidos. Os óxidos de ferro são compostos de Fe juntamente com O e/ou OH. Na maioria dos compostos, o ferro está no estado trivalente,

sendo que apenas três compostos – FeO, Fe(OH)₂ e Fe₃O₄ – contêm Fe(II). Óxidos de ferro consistem em empacotamento fechado de ânions (usualmente nos empacotamentos hexagonal (hcp) ou cúbico (ccp)), na qual os interstícios são em parte preenchidos com Fe divalente ou trivalente predominantemente na coordenação octaédrica (VI), mas em alguns casos na coordenação tetraédrica (IV). Os vários óxidos diferem no modo como as unidades estruturais básicas são arranjadas no espaço (Fe(O,OH)₆ e FeO₄)^{10,11}. Além disso, óxidos de ferro têm importantes aplicações, tais como, na gravação magnética, na transformação de energia solar, eletrônica, na catálise, etc^{12,13}.

Tabela I. Óxidos, hidróxidos e oxi-hidróxidos de Ferro¹⁰

Oxi-hidróxidos e hidróxidos	Óxidos
Goetita α -FeOOH	Hematita α -Fe ₂ O ₃
Lepidocrocita γ -FeOOH	Magnetita Fe ₃ O ₄
Akaganeita β -FeOOH	Maghemita γ -Fe ₂ O ₃
Schwertmannita Fe ₁₆ O ₁₆ (OH) _y (SO ₄) _z .nH ₂ O	β -Fe ₂ O ₃
δ -FeOOH	ϵ -Fe ₂ O ₃
Ferroyhita δ' -FeOOH	Wustita FeO
Alta pressão FeOOH	
Ferrihidrita Fe ₅ HO ₈ .4H ₂ O	
Bernalita Fe(OH) ₃	
Fe(OH) ₂	
Green Rust Fe _x III Fe _y II(OH) _{3x+2y-z} (A ⁻) _z ; A ⁻ = Cl ⁻ ; SO ₄ ²⁻	

Dentre esses óxidos, a magnetita, além de ser um dos minérios mais empregados para a obtenção de ferro, destaca-se para aplicações biomédicas. A magnetita é um óxido de ferro misto (FeO.Fe₂O₃) apresentando estrutura de espinélio inversa. A Figura 2 mostra uma estrutura cristalina de uma célula unitária, cúbica, de face centrada, do tipo espinélio. As Figuras 2a e 2b mostram o sítio A e B, os quais estão localizados no centro de

um tetraedro e de um octaedro, respectivamente. O ambiente cristalográfico dos sítios A e B são, portanto, distintamente diferentes. Para melhor visualização desta cela unitária, pode-se considerar que a cela está dividida em oito quadrantes, cada aresta $a/2$, como mostrado na Figura 2c. Os quatro quadrantes sombreados têm conteúdo idêntico, como também os quatro octantes em branco. O conteúdo dos dois quadrantes da parte inferior na Figura 2c estão mostrados na Figura 2d. Um sítio tetraédrico ocorre no centro do quadrante direito da Figura 2d e outros sítios tetraédricos estão em alguns, mas não em todos os cantos do quadrante. No quadrante da esquerda é possível visualizar o sítio octaédrico¹⁴. Quase todos os íons Fe^{2+} residem nos interstícios das posições octaédricas, e serão estes íons os responsáveis pela magnetização de saturação e pelo comportamento magnético do material¹⁰.

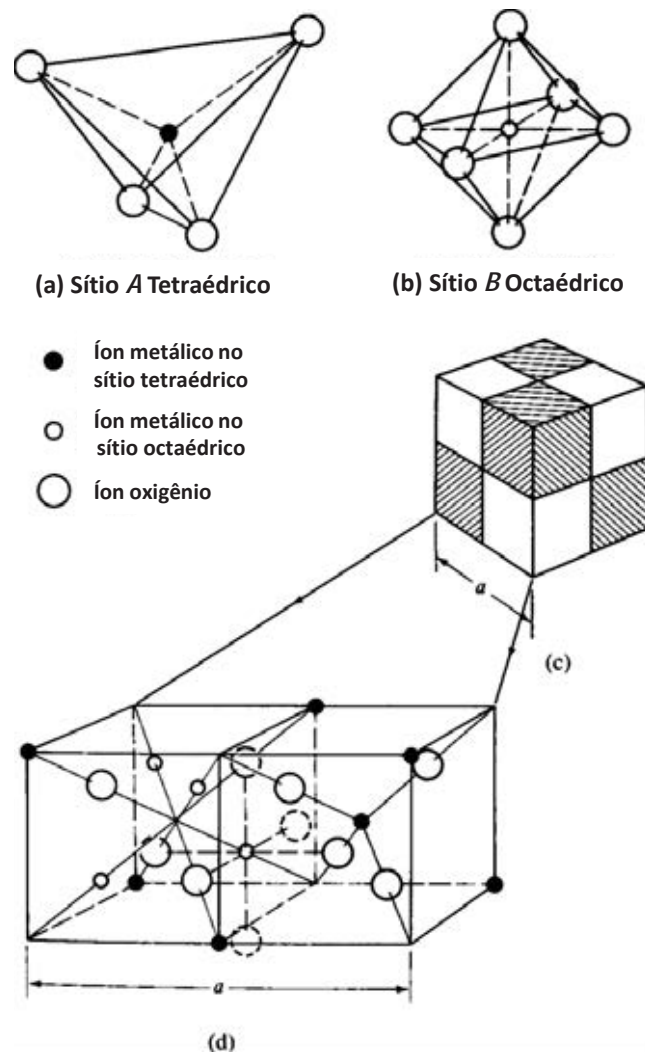


Figura 2. Estrutura cristalina de uma célula unitária, cúbica de face centrada, do tipo espinélio¹⁴.

I.2.a Métodos de síntese de nanopartículas de óxidos de ferro

Na preparação das nanopartículas magnéticas alguns parâmetros, tais como: o tamanho, a cristalinidade e a morfologia são fatores importantes no comportamento físico e químico das partículas. Nanopartículas de óxidos de ferro podem ser preparadas por diversos métodos: microemulsão água em óleo^{15,16}, microondas¹⁷, moagem mecânica^{18,19}, micela reversa^{20,21}, sonoquímico^{22,23}, combustão²⁴, hidrólise forçada^{25,26}, coprecipitação^{27,28}, hidrotérmico^{29,30}, complexiométrico^{31,32}, sol-gel^{33,34}, etc. Na Tabela II encontram-se exemplos mostrando as suas vantagens e desvantagens³⁵.

Tabela II. Comparação de diferentes características de nanopartículas de óxidos de ferro fabricadas através de diferentes métodos³⁵.

Características dos óxidos de ferro	Métodos de sínteses de nanopartículas de ferro				
	Aerosol/vapor (pirólise)	Sonoquímica ^{23,53}	Poliol	Sol-gel	Microemulsão
<i>Tamanho e distribuição de tamanho</i>	de 5-60 nm com larga distribuição	de 5-20 nm com larga distribuição	de 5-10 nm com estreita distribuição	de 20-200 nm com larga distribuição	de 4-15 nm com estreita distribuição
<i>Morfologia</i>	esférica	esféricas	esférica, cúbica e hexagonal	esférica com alta porosidade	esférica ou cúbica (sem agregação)
<i>Vantagens</i>	alta taxa de produção	elevada produção	estreita distribuição de tamanho	partículas de formas e comprimentos desejados podem ser sintetizadas, útil para fazer nanopartículas híbridas.	propriedades uniformes e também o tamanho das nanopartículas podem ser manipuladas
<i>Desvantagens</i>	grandes agregados são formados	elevadas intensidades ultrassônicas e reagente tóxico	solventes tóxicos são usados na síntese	os produtos usualmente contém componentes da matriz sol-gel em suas superfícies	os tensoativos são difícil de remover; pequena quantidade de óxido pode ser sintetizada

Dentre os métodos de preparação de NPs citado anteriormente, pode-se destacar o método de coprecipitação. Esse método apresenta inúmeras vantagens, tais como: homogeneidade química, temperaturas de reação e sinterização baixas, partículas pequenas, uniformes com fraca ou nenhuma aglomeração, equipamento para a produção de baixo custo, economia de tempo, fácil ampliação de escala^{27,34}. O método de coprecipitação consiste de dois processos: a nucleação (formação de centros cristalização) e o crescimento subsequente das partículas^{36,37}. As taxas relativas desses dois processos determinam o tamanho e a polidispersão das partículas obtidas. Colóides polidispersos são obtidos como resultado simultâneo da formação de novos núcleos e do crescimento das partículas formadas. Se a nucleação predomina, o resultado é um número grande de partículas pequenas, entretanto, se o crescimento predomina, o resultado será um número pequeno de partículas maiores³⁷.

I.2.b. Ultrassom – Sonoquímica

O uso do ultrassom sempre esteve presente em todas as áreas da Química. Quando moléculas em uma dada reação química recebem e interagem com estímulos ultrassônicos, sendo que estes estão na faixa entre 20 kHz a 10 MHz, esse processo é denominado sonoquímica³⁸. Na área de química de materiais a sonoquímica tem sido muito usada para preparar vários tipos de materiais amorfos nanoestruturados a partir de metais³⁹, óxidos⁴⁰, ferritas²³ e nitretos de ferro⁴¹. O uso da sonoquímica possibilita atingir valores de pressão e energia em um tempo muito curto, os quais não estão disponíveis a partir de qualquer outro método (Figura 3). Assim, o ultrassom pode ser utilizado como uma ferramenta em reações químicas para auxiliar os métodos de síntese.

O som é classificado como uma onda mecânica, sendo uma onda sonora longitudinal, isto é, é produzida por uma sequência de pulsos longitudinais. Essas ondas precisam de um meio material (sólido, líquido ou gás) para se propagar, fazendo, assim, com que elas não se

propaguem no vácuo⁴². As ondas sonoras podem se propagar com diversas frequências, porém o ouvido humano é sensibilizado somente quando elas chegam a ele com frequência entre 20 e 20.000 Hz, aproximadamente. Ondas longitudinais de frequências superiores a 20kHz caracterizam sons inaudíveis e denominam-se ultrassons; e aquelas de frequências inferiores a 16 Hz, também inaudíveis, são ditas infrassons. Na Figura 4, pode-se notar que duas distintas variações do ultrassom têm sido identificadas como de uso na química: o diagnóstico (para medidas físicas) e a potência (influenciar a reatividade química)⁴³.

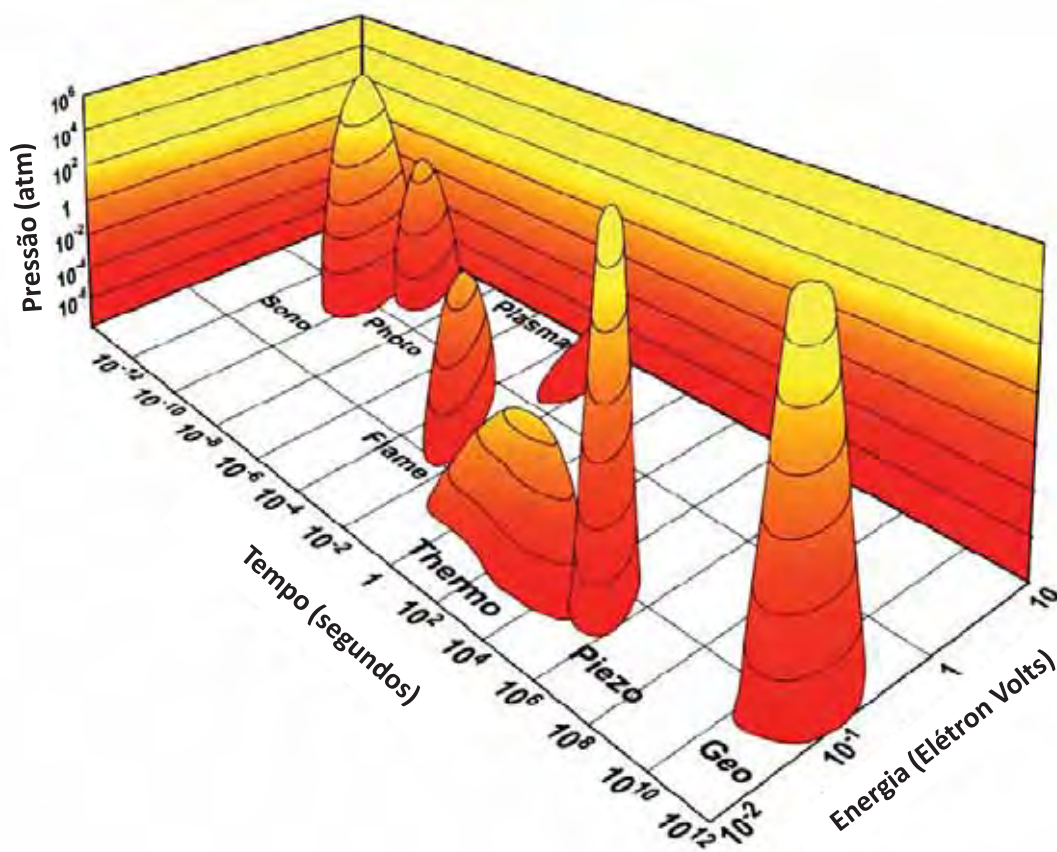


Figura 3. Relações entre pressão, energia e tempo mostradas para sonoquímica e também para outros campos da química e da física^{44,45}.

A descoberta do ultrassom ocorreu em 1880 pelos irmãos Curie, estudando o efeito piezelétrico⁴³. Em 1927, Alfredo Loomis foi o primeiro químico a reconhecer o efeito anômalo de ondas sonoras intensas propagando-se pelo líquido, sendo denominado de efeito

sonoquímico. Entretanto, foi a partir de 1980 que a sonoquímica teve grande avanço e muitos trabalhos foram publicados em diferentes sistemas.

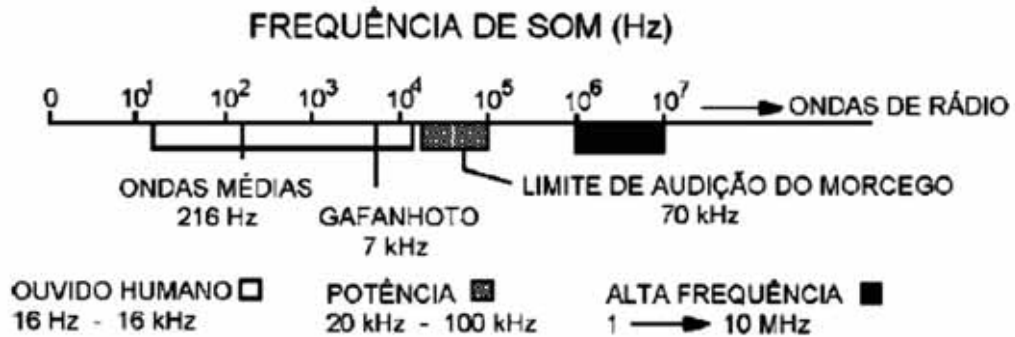


Figura 4. Região de frequência do som⁴³.

Para que haja propagação das ondas ultrassônicas é necessário que o meio de propagação tenha propriedades elásticas. Então, o movimento de um corpo vibrando é transmitido às moléculas adjacentes, as quais, antes de retornarem à posição de equilíbrio, transmitem esse movimento para as moléculas que estão ao redor. Esse movimento periódico cria ciclos de compressão e expansão, característico do fenômeno de cavitação. As ondas ultrassônicas geram pressão acústica (P_A) no meio de propagação, que é dada pela equação 1⁴³:

$$P_a = P_A \sin 2\pi f t \quad (\text{Eq.1})$$

sendo: P_a = pressão adicional à pressão hidrostática (P_h) ambiente;

P_A = pressão de amplitude máxima da onda;

f = frequência da onda (> 16 KHz);

t = tempo.

A intensidade (I) é dada pela equação 2⁴³:

$$I = \frac{P_A^2}{2\rho c} \quad (\text{Eq.2})$$

Sendo: ρ = densidade do meio;

c = velocidade do som no meio.

A propagação das ondas ultrassônicas é atenuada devido à vibração das moléculas do meio de propagação, como consequência ocorre a diminuição da energia dessas ondas. A atenuação é dada pela equação 3⁴³:

$$I = I_0 \exp(-2\alpha l) \quad (Eq.3)$$

sendo: I = intensidade atenuada;

I_0 = intensidade da fonte de radiação;

α = coeficiente de absorção;

l = distância da fonte de radiação.

Kirchoff deduziu uma expressão que relaciona o coeficiente de absorção (α) com a viscosidade e com a condutividade do meio, equação 4⁴³:

$$\alpha = \frac{2\pi^2 f^2}{\rho c^3} \left\{ \eta_b + \frac{4}{3} \eta_s + \frac{(\gamma - 1)K}{C_p} \right\} \quad (Eq.4)$$

sendo: η_s = força de cisalhamento;

η_b = viscosidade da cavidade;

K = condutividade térmica do meio;

c_p = calor específico à pressão constante;

γ = capacidade calorífica.

De acordo com a equação 2, aumentando a intensidade, I , aumentará a pressão acústica, P_A , e conseqüentemente o deslocamento das partículas. Obviamente, haverá um momento em que a distância do deslocamento é tão grande que causará a mudança de uma molécula do círculo interativo da vizinhança e um buraco será criado; em outras palavras, o líquido será rompido e uma bolha criada. Em ordem, a intensidade envolvida na criação de bolhas, leva-nos a assumir que⁴³:

- uma bolha pode ser criada quando as moléculas estão separadas por distância de van der Waals, 400 pm (4Å);
- a bolha assim criada é estável, não contrai nem expande. Neste caso, a pressão no líquido, P_L , pode ser comparada à pressão na bolha, $P_b = 2\sigma/R$, onde σ é a tensão superficial do líquido e R o raio da bolha.

Esse fenômeno chamado de cavitação acústica é o fenômeno físico responsável pelo processo sonoquímico. Um número de teorias tem sido desenvolvido para explicar como uma radiação sônica de 20 kHz pode quebrar ligações químicas. Todas elas concordam que o principal evento da sonoquímica é a criação, crescimento e colapso de uma bolha, que é formada em um líquido. A etapa que conduz o crescimento da bolha ocorre por meio da difusão de vapor soluto dentro do volume da bolha. O último estágio é o colapso da bolha, o qual ocorre quando o seu tamanho alcança seu valor máximo⁴⁶ (Figura 5).

A partir daqui iremos adotar o mecanismo de *hot spot*, uma das teorias que explicam porque, no colapso de uma bolha, ligações químicas são quebradas. Em líquidos irradiados com alta intensidade ultrassônica, a cavitação acústica conduz a colapso da bolha, produzindo um intenso aquecimento local, altas pressões e tempo de vida muito curto. Esses transientes, *hot spots* localizados, conduzem a reações químicas de alta energia^{38,44,45,47,48}. Esses *hot spots* têm temperaturas de aproximadamente 5000°C, pressões por volta de 100 atm, e a taxa de aquecimento e resfriamento acima de 1010 K/s. Assim, a cavitação serve como um meio de concentrar a energia difusa do som para ser utilizada na química de materiais. O colapso da cavidade próxima de uma superfície sólida estendida torna-se não-esférica, conduz jatos de alta velocidade do líquido para a superfície e cria ondas de choque que danificam a superfície. Além disso, durante a irradiação ultrassônica de módulos de líquido-pó, cavitação e ondas de choques criadas, pode-se acelerar partículas sólidas a altas velocidades. A colisão interpartículas resultantes são capazes de induzir notáveis trocas na morfologia da superfície,

na composição e reatividade^{38,45,47,49,50}. Um típico aparato sonoquímico que permite fácil controle da atmosfera e da temperatura ambiente em sínteses é mostrado na Figura 6.

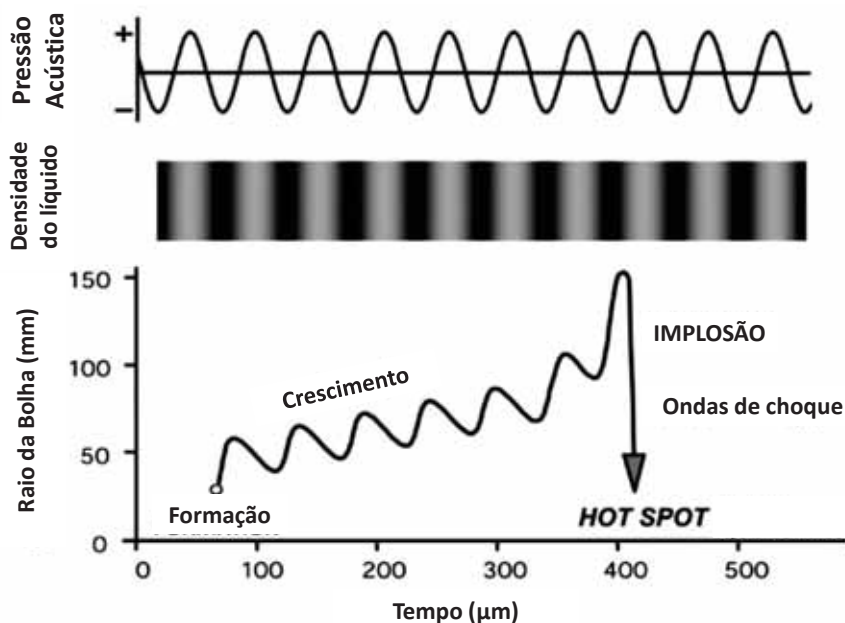


Figura 5. Criação, crescimento e colapso de uma bolha formada em um líquido⁵⁰.

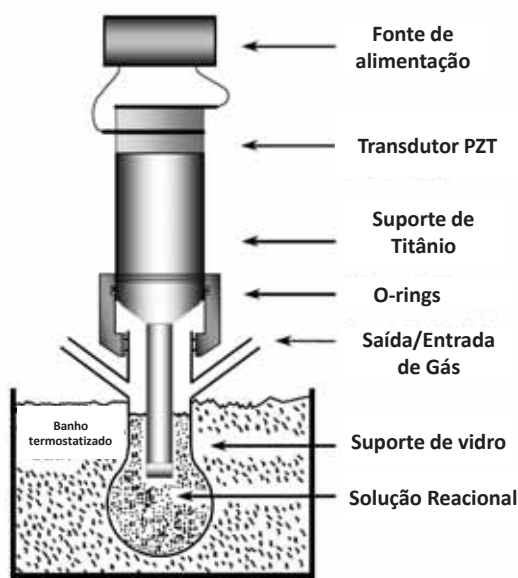


Figura 6. Um típico aparato sonoquímico com direta imersão sonda ultrassônica. Ultrassom pode ser facilmente introduzido dentro de uma reação química com bom controle de atmosfera e temperatura⁵⁰.

Há uma ampla gama de consequências físicas e químicas que a alta intensidade pode induzir.. Os efeitos químicos do ultrassom caem dentro de 3 áreas: sonoquímica homogênea de líquidos, sonoquímica heterogênea de sistemas líquido-líquido ou líquido sólido, e

sonocatálise (a qual se sobrepõe às duas primeiras). Aplicações do ultrassom para a química de materiais são encontradas em todas essas áreas. Reações químicas não são geralmente vistas com radiação ultrassônica em sistemas sólidos ou gás-sólido.

O ultrassom é usado na indústria para limpeza de materiais, solda de plásticos, processos químicos, preparação de emulsão e suspensão, desgaseificação de solventes e avaliação não-destrutiva em materiais (obtenção de informações sobre defeitos, fraturas, aglomerados, inclusão e anisotropia), em hospitais para estimulação do calo ósseo e análise de imagem. Como as ondas sonoras não são ionizantes e, portanto, inócuas aos seres vivos, o ultrassom tem sido usado com frequência para fins diagnósticos e terapêuticos^{43,51}.

I.2.c. Sonoquímica na produção de óxidos de ferro

A sonoquímica tem sido muito usada para preparar vários tipos de materiais nanoestruturados. Por exemplo, a produção de pó metálico-cerâmico³⁸ é de difícil realização, pois necessita de um rápido resfriamento a partir da fusão do metal, o que é necessário para prevenir a cristalização. Como a cavitação acústica induz extremo aquecimento em líquidos, mas também possui taxas muito rápidas de resfriamento, Suslick *et al*³⁸ descreveram a síntese de óxido de ferro amorfo induzido por alta intensidade ultrassônica. A reação se processa pela sonólise de pentacarbonil. Esses óxidos são altamente ativos na hidrogenação de monóxidos de carbono e na de hidrogenação de hidrocarbonetos saturados. Em sínteses realizadas com precursores voláteis, é necessário o uso de sondas de alta intensidade (entre 50 e 500 Wcm⁻²) para a produção de nanopartículas amorfas. Entretanto, baixas intensidades acústicas podem frequentemente ser usadas em sistemas heterogêneos, mas a força de tensão na interface líquido-sólido tem que ser reduzida⁵⁰.

Li, *et al*⁵² verificaram que a sonicação pode reduzir a aglomeração, a qual pode ser realizada por dois caminhos. Um é o controle da magnitude do número primário de nucleação,

sendo que o número de nucleação por unidade de volume pode determinar se ocorre a aglomeração. O segundo é o aumento da distribuição do núcleo e a melhora no ambiente de crescimento do cristal. Observações mostram a coexistência de um estado gás-líquido-sólido onde o grão do cristal está em boa suspensão e permanece discretamente disperso. Isso pode ser explicado pela produção de um estado local supercrítico gás-líquido através do desenvolvimento de altas pressões e temperaturas pela implosão das bolhas de cavitação.

Outra via para reduzir a aglomeração, juntamente com a sonicação, é a utilização de agentes tensoativos. Zhang *et al*⁵³ produziram nanopartículas de óxido de ferro com tamanho entre 5-20 nm via ultrassom (900 W) pela decomposição de pentacarbonil de ferro em cis-trans-decalina, utilizando como tensoativo o ácido oleico, sendo observado que, quanto maior a razão ácido oleico para $\text{Fe}(\text{CO})_5$ menor é o tamanho das partículas, resultando em monodispersões. Já Shafi, *et al*²³ decomuseram $\text{Fe}(\text{CO})_5$ na presença de diferentes tensoativos, utilizando cavitação acústica de intensidade de 100 Wcm^{-2} , sendo verificado após a sonicação a formação de nanopartículas superparamagnéticas, nas quais os tensoativos foram ligados à superfície via ligação iônica.

Essas partículas superparamagnéticas quando utilizadas, por exemplo, em IRM, como agentes de contraste, têm a vantagem de produzir um aumento na relaxação do próton em comparação com as partículas paramagnéticas. Conseqüentemente, menor quantidade de agentes SPIO é necessário introduzir no corpo humano em relação às partículas paramagnéticas⁵⁴.

Abu-Mulh-Qasem, *et al*⁵⁵ utilizaram a sonólise de uma solução aquosa de $\text{Fe}(\text{CO})_5$ na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS) resultando na formação de hidrosol estável de nanopartículas de óxido de ferro monodispersas, sem aglomeração. Nesse caso, o tensoativo é um hidrocarboneto de cadeia longa, com uma extremidade polar que é atraída para a superfície da partícula de magnetita.

Vários métodos têm sido reportados para a preparação de dispersões estáveis de óxidos de ferro em solventes orgânicos (organosol), incluindo hexano, decano, ou por uso de tensoativos de cadeias longas. Entretanto, para esses organossóis, as aplicações biológicas são muito restritas por causa de suas pequenas solubilidades in soluções aquosas. Compreender seus potenciais em aplicações biológicas é uma etapa importante para desenvolver um método simples e genérico para preparações de hidrossóis estáveis de óxidos de ferro⁵⁵.

Portanto, tratando-se da sonoquímica, a explicação para a criação de produtos amorfos é bem entendida, enquanto a razão para os produtos nanoestruturados não é clara. Em condições adequadas, as reações químicas conduzidas com produtos inorgânicos, produzem nanomateriais. Eles variam no tamanho, forma, estrutura e em sua fase sólida (amorfa ou cristalina)⁴⁶.

I.3. Generalidades das propriedades magnéticas

Os materiais magnéticos são caracterizados pela presença de dipolos magnéticos gerados pelo giro de alguns de seus elétrons. Cada um desses elétrons polarizados pode ser alinhado de forma paralela ou antiparalela em relação a esses vizinhos na rede cristalina e esse tipo de interação é o que dá origem ao efeito magnético macroscópico que podemos medir. Dependendo da resposta magnética observada, podemos classificar os materiais magnéticos como paramagnéticos, ferromagnéticos, ferrimagnéticos ou antiferromagnéticos. No entanto, tais comportamentos são fortemente dependentes de tamanho e, conseqüentemente, em uma determinada temperatura, o comportamento magnético de qualquer material pode ser alterado por meio do ajuste do seu tamanho^{56,57}.

Alternativamente, os dipolos magnéticos individuais em um cristal podem se alinhar paralelamente um com o outro, exibindo um aumento na resposta coletiva, mesmo na ausência de um campo magnético externo. Isto é o que é conhecido como ferromagnetismo. Neste caso, há três parâmetros principais para descrever a força de magnetização do material:

o campo coercitivo (H_C), a magnetização de saturação (M_S) e a magnetização remanente (M_R). H_C está estritamente relacionado com a constante de anisotropia magnética (K_u), que determina a energia a ser superada, a fim de inverter o sentido dos dipolos magnéticos do material. K_u pode ter diferentes contribuições, que surgem a partir da simetria da rede cristalina, da contribuição da superfície em relação ao núcleo e da forma das nanopartículas. O segundo parâmetro, a magnetização de saturação (M_S), é o valor máximo da magnetização que o material pode atingir sob o efeito de campos magnéticos. E a terceira, que é a magnetização remanente (M_R), indica a magnetização residual quando o campo aplicado tem valor igual a zero. Esses três parâmetros podem ser facilmente identificados no gráfico (curva) de histerese gerada em medidas de magnetização versus campo magnético, conforme mostrado na Figura 7. Metais em massa, tais como Fe, Co ou Ni, assim como algumas de suas ligas (FePt, FeCo), são materiais ferromagnéticos. Em contraste com a situação ferromagnética, vizinhos dipolos magnéticos podem se alinhar antiparalelo na rede, o que significa que eles vão cancelar o outro (repulsão de dipolos magnéticos). Este tipo de intercâmbio magnético pode levar a duas situações distintas: ao antiferromagnetismo, quando os dipolos magnéticos têm o mesmo valor e, portanto, o material apresenta uma magnetização líquida zero. E ao ferrimagnetismo, quando os dois spins acoplados mostram valores diferentes e, nesse caso, um dipolo magnético líquido diferente de zero, o qual deixa o material magnetizado mesmo na ausência de um campo magnético externo. Os óxidos de ferro, tais como magnetita e maghemita, pertencem à classe de materiais ferrimagnéticos⁵.

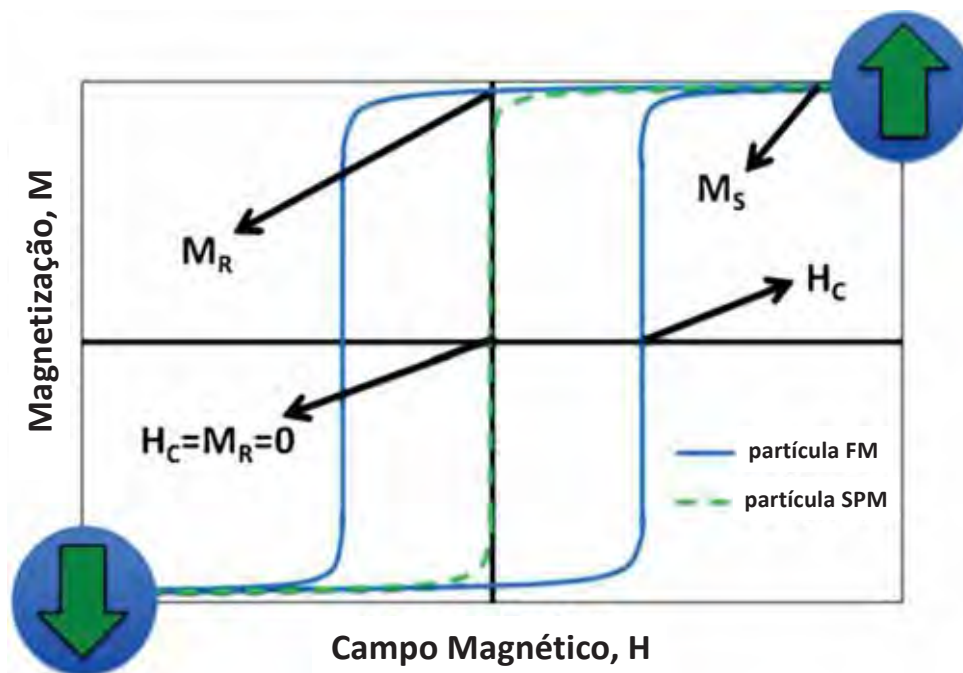


Figura 7. Curva teórica da magnetização versus campo magnético para nanopartículas superparamagnético (SPM) e ferromagnéticas (FM), onde o campo coercitivo (H_C), a magnetização de saturação (M_S) e da magnetização remanescente (M_R) são parâmetros indicados⁵.

A redução de tamanho de materiais magnéticos apresenta vantagens interessantes que os tornam mais adequados para as técnicas diagnósticas e terapêuticas em relação aos seus homólogos com tamanhos maiores. Parâmetros magnéticos como o coercividade das nanopartículas podem ser diminuídos com um tamanho menor. Uma redução do tamanho abaixo de um determinado valor do raio, o chamado raio superparamagnético (rSPM), proporciona diferentes comportamentos magnéticos. Um material em uma fase paramagnética é caracterizado por dipolos magnéticos orientados aleatoriamente (ou não atrelados). Quando o tamanho de partículas ferromagnéticas estão abaixo deste rSPM, elas se alinham apenas na presença de um campo magnético externo e ao longo de sua direção. Como resultado disso, este tipo de material não tem coercividade nem remanência, o que significa que quando o campo magnético externo é desligado, os dipolos magnéticos internos novamente tornam-se aleatórios. Nenhuma energia adicional é necessária para desmagnetizar o material e, portanto, o momento magnético inicial é recuperado de forma espontânea. Assim, conforme Figura 7,

quando momentos magnéticos são observados sob o efeito de um campo magnético, mas nenhum momento magnético remanescente está presente quando o campo magnético externo é removido, este comportamento é chamado de superparamagnético (SPM). Esta propriedade traduz-se em uma vantagem significativa, especialmente em experimentos *in vivo*. A ausência de coercividade - o momento magnético líquido zero das nanopartículas - após a avaliação do diagnóstico ou após o tratamento irá prevenir uma potencial agregação das partículas que poderiam facilmente causar a formação de embolias nos vasos sanguíneos. Superparamagnetismo é uma propriedade estritamente associada a materiais nanoestruturados magnéticos e surge quando a energia térmica é suficientemente elevada para superar a energia de estabilização magnética da partícula. A Figura 8 mostra como a coercividade das nanopartículas varia quando seu tamanho é reduzido, até que o estado superparamagnético seja atingido⁵.

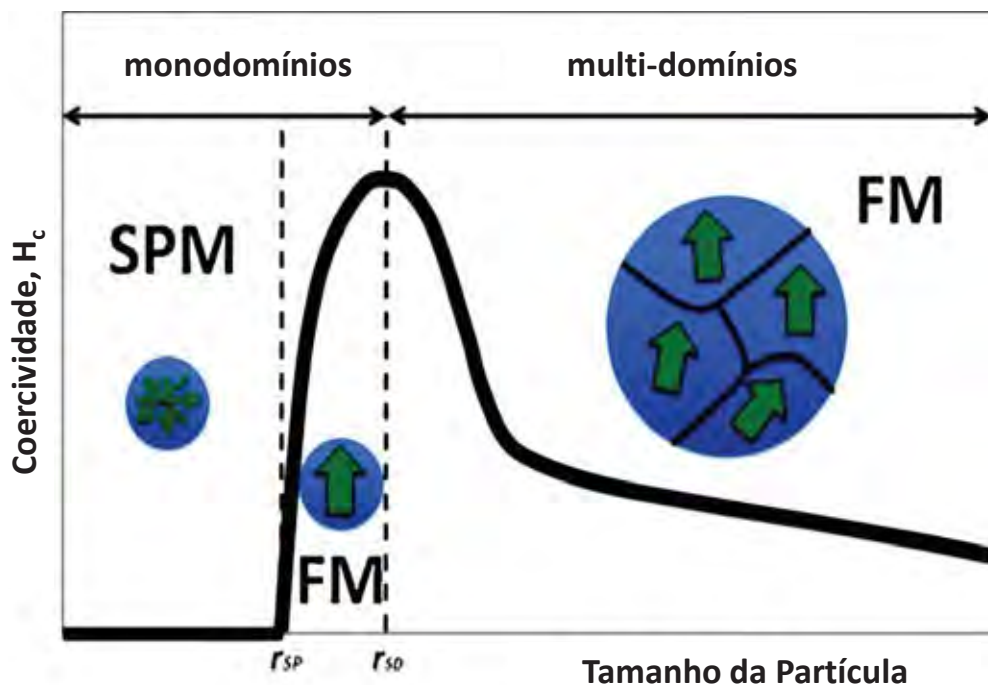


Figura 8. Variação da coercividade (H_c) de nanopartículas magnéticas com tamanho⁵.

I.3.a. Nanopartículas magnéticas para técnica de imagem por ressonância magnética (IRM)

Nanopartículas magnéticas têm sido amplamente utilizados como agentes de contraste em técnicas de imagem por ressonância magnética (IRM). O sinal gravado durante o exame de ressonância magnética está relacionado com os processos de relaxação magnética nuclear dos spins dos prótons em moléculas de água, na área de interesse. Sob um determinado campo magnético externo (B_0), os spins nucleares dos prótons alinham-se com o campo, dando origem a um momento magnético líquido (m). Se um pulso de rádio frequência transversal (RF) é aplicado perpendicularmente ao B_0 , os spins nucleares estão excitados e começam a precessão no plano perpendicular ao B_0 . Após a remoção do pulso transversal, os spins nucleares recuperam-se gradualmente a seu estado de equilíbrio paralelo a B_0 . A recuperação do equilíbrio se dá através de dois diferentes mecanismos de relaxação: (i) processo de relaxação longitudinal (T_1) - recuperação do momento magnético ao longo da direção B_0 , e (ii) o processo de relaxação transversal (T_2), que corresponde à perda de sinal no plano perpendicular, conforme mostrado na Figura 9c e d. A presença de nanopartículas SPM no órgão ou tecido cria um campo magnético adicional (B_1), que induz um campo local, aumentando significativamente a velocidade de relaxamento dos prótons transversais (diminuição de T_2), conduzindo a um contraste negativo ou escurecimento da imagem⁵⁷ (Figura 9e). É por isso que as nanopartículas magnéticas, como o óxido de ferro, são predominantemente considerados agentes de contraste T_2 ⁵⁸. Tempos de relaxação (T_i) também são expressos pelos seus valores inversos ($r_i = 1/T_i$), chamado de relaxatividade, e são expressos em s^{-1} ou em unidades normalizadas $s^{-1}mM^{-1}$ ⁵.

A habilidade de nanopartículas SPM de melhorar o contraste da imagem aumenta com o aumento do momento magnético da nanopartícula. Para um determinado material, a magnetização máxima alcançável corresponde à magnetização de saturação do *bulk* e no valor de tal princípio poderia ser alcançado, independentemente do tamanho da partícula. Na

realidade, os átomos na superfície de nanopartículas têm coordenação incompleta no que diz respeito aos da maior parte das nanopartículas, portanto seus momentos magnéticos estão orientados de maneira diferente do que os dos átomos do interior. Conseqüentemente, a magnetização global de um nanocrystal é menor do que a de uma partícula maior. É fácil, portanto, entender que a magnetização de uma amostra de nanopartículas aumenta com o aumento em seu tamanho médio e, assim, tendo o contraste da imagem ponderada em T_2 .

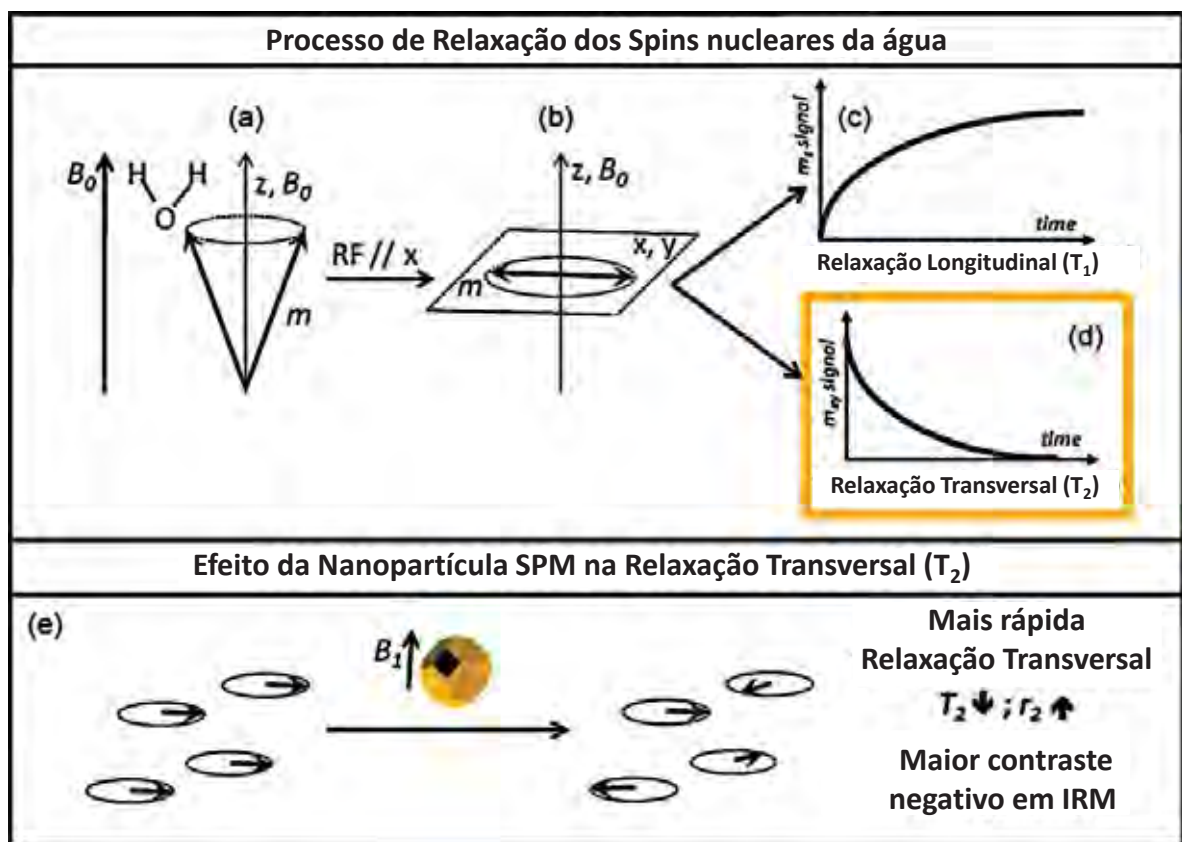


Figura 9. Ilustração do processo de ressonância magnética mostrando o princípio e o papel das nanopartículas magnéticas como um agente de contraste: Acima: (a) rede de spins magnéticos (m) da precessão dos prótons da água em torno da direção do campo magnético externo aplicado (B_0), (b) mediante aplicação de um pulso de RF, m começa a precessar perpendicularmente ao B_0 ; (c) m relaxa de volta para seus estados de equilíbrio original através do modo longitudinal (T_1) e (d) transversal (T_2); (e) na presença de nanopartículas magnéticas, os spins dos prótons da água começam a precessar de forma não homogênea sob o efeito adicional do campo local dipolar (B_1). Conseqüentemente, relaxar mais rápido induz um sinal forte de ressonância magnética, que produz efeitos de contraste escuro⁵.

É importante notar que, enquanto em todos os materiais a magnetização diminui com a redução do tamanho das nanopartículas, a correlação entre a magnetização e o tamanho

depende da constante anisotropia magnética (K_u), que é única para cada material. Por exemplo, o material à base de $MnFe_2O_4$ é caracterizado por um baixo valor de K_u e, conseqüentemente, sua magnetização será mais dependente do tamanho do que as $CoFe_2O_4$, que possuem um alto valor de K_u . Outra observação importante é que os materiais com alta anisotropia magnética podem possuir uma magnetização não desprezível mesmo em tamanhos muito pequenos.⁵

I.3.b. Nanopartículas magnéticas para tratamento de hipertermia

Hipertermia à base de nanopartículas magnéticas é uma terapia promissora para a apoptose seletiva de células tumorais por meio de aquecimento controlado do tecido danificado⁵⁹. O procedimento envolve inicialmente a dispersão de nanopartículas magnéticas por todo o tecido-alvo. A aplicação de um campo magnético estático externo (B_0) de suficiente força induz uma magnetização das nanopartículas e, em seguida, pela aplicação de um campo alternado com frequência elevada (f), a magnetização das partículas é continuamente invertida, o que se traduz em uma conversão de energia magnética para térmica. Esse calor é liberado imediatamente para o tecido doente adjacente⁵. Se a temperatura pode ser mantida acima do limite terapêutico de 42 °C por 30 minutos ou mais, o câncer é destruído. A Figura 10 descreve os fenômenos físicos e os mecanismos específicos de aquecimento observado em nanopartículas durante a hipertermia. A hipertermia via partículas magnéticas é atraente porque oferece um caminho para garantir que apenas o tecido-alvo seja aquecido. Nanopartículas magnéticas que são estáveis sob condições fisiológicas podem facilmente circular através da corrente sanguínea e podem atingir os órgãos-alvo, que não poderiam ser tratados de outra forma. Além disso, a vasta oferta disponível de protocolos de biofuncionalização da superfície das nanopartículas pode ser explorada para ajustar seus recursos de reconhecimento de química e, portanto, sua

especificidade para células tumorais. A melhora da especificidade é responsável pela minimização de superaquecimento em células saudáveis, portanto, menos efeitos colaterais são observados⁵.

Quando exposto a um campo magnético alternado, nanopartículas ferromagnéticas liberam calor pelo mecanismo de perda de histerese. A quantidade de calor gerado por este mecanismo é proporcional à frequência aplicada e à área do ciclo de histerese magnética, como mostra a Figura 10 (à esquerda). Isso significa que as nanopartículas com maiores valores de magnetização de saturação e de coercividade geraram calor com mais eficiência. Portanto, a capacidade de aquecimento das nanopartículas magnéticas é expressa pela taxa de absorção específica (sigla em inglês SAR)⁵.

Nanopartículas superparamagnéticas mostram dois diferentes mecanismos de geração de calor: o chamado mecanismo de relaxação Néel e o de Brown, como mostrado na Figura 10 ao centro e à direita, respectivamente. O mecanismo de relaxação Néel depende estritamente do valor da barreira de energia de anisotropia magnética (ΔE), que precisa ser superado para a reversão da magnetização da partícula durante a aplicação do campo magnético alternado (B_0, f). Esse valor depende de dois parâmetros principais: (i) da anisotropia intrínseca da partícula (material, superfície e forma) e (ii) do volume da partícula. Por outro lado, o mecanismo de relaxação de Brown depende da capacidade da partícula para inverter a magnetização pela rotação física no meio fisiológico em que está imerso. A capacidade de rotação no meio depende dos parâmetros de viscosidade do meio (η) e do diâmetro global da partícula, conhecido como diâmetro hidrodinâmico, que compreende, além do núcleo inorgânico, qualquer tipo de molécula orgânica provida do meio de dispersão^{60,61}. Ambos os mecanismos ocorrem simultaneamente nas nanopartículas e, conseqüentemente, a variação da sua capacidade de aquecimento com o seu diâmetro mostra uma dependência particular com um valor máximo de SAR para um determinado tamanho⁵.

Os ensaios clínicos na fase II estão agora sob investigação para a realização intracelular e / ou hipertermia intersticial em pacientes humanos⁶², utilizando nanopartículas de óxido de ferro. Está bem estabelecido que as células cancerosas são mais sensíveis à temperatura mais elevada que as células provenientes de um tecido saudável⁶³. Diversas abordagens foram utilizadas até agora para elevar a temperatura dos tecidos: hipertermia do corpo inteiro, hipertermia por radiofrequência e hipertermia indutiva. A questão crítica destes métodos tem sido sempre a forma de limitar o calor só para a região patológica, como o tratamento da hipertermia inespecífica, que pode danificar os tecidos saudáveis. A este respeito, as nanopartículas de óxido de ferro, devido ao seu pequeno tamanho, são capazes de penetrar a parede celular e podem comportar-se como melhores mediadores de calor. Focalizando SPIO, principalmente duas formulações têm sido investigadas em ensaios clínicos: suspensões coloidais de apenas nanopartículas magnéticas e lipossomas magnéticos decorrentes da aglomeração de nanopartículas SPIO⁵.

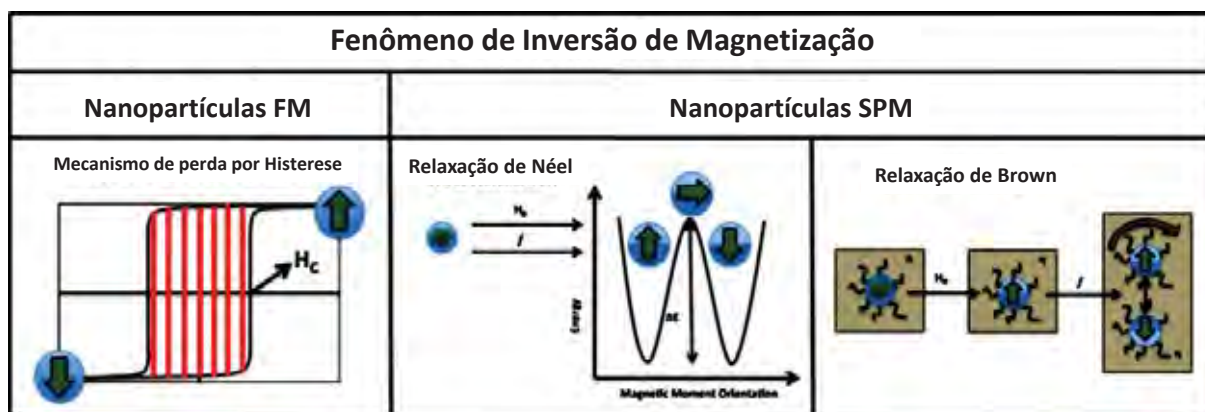


Figura 10. Fenômenos de reversão da magnetização para geração de calor sob o efeito de um campo magnético alternado (B_0, f). À esquerda, mecanismo de perda histerese de geração de calor por nanopartículas de ferro- e ferrimagnético. Mecanismo de relaxação de Néel (ao centro) e de Brown (à direita) para geração de calor por nanopartículas superparamagnéticas⁵.

Recentemente Jordan, *et al*⁶⁴ relataram um estudo comparativo sobre a influência de diferentes revestimentos no sucesso da terapia. Os animais receberam dois tratamentos de termoterapia após uma única injeção intratumoral de nanopartículas USPIO

revestidos com aminosilano e dextrana. A eficácia do tratamento foi avaliada com base no tempo de sobrevivência dos animais. O tratamento realizado com aminosilano-USPIO levou ao prolongamento de 4,5 vezes da sobrevivência em relação ao controle, enquanto as partículas revestidas com dextran não diferem de maneira significativa do controle. Análises histológicas e imuno-histoquímicas, após tratamento com partículas revestidas com aminosilano, revelam grandes áreas de necrose na área tratada e uma taxa de diminuição da proliferação nas regiões adjacentes ao tumor⁵.

I.4. Engenharia de superfície de nanopartículas para propósitos médicos

Uma série de métodos químicos pode ser utilizada para a conjugação de biomoléculas e agentes terapêuticos nas superfícies das nanopartículas. Tais métodos podem ser categorizados em estratégias de ligação covalente e interações físicas (interações eletrostáticas e hidrofílicas/hidrofóbicas). A escolha química é ditada, em parte, pelas propriedades químicas e grupos funcionais encontrados na superfície SPIO e também pelo ligante a ser conjugado. O principal objetivo é vincular as biomoléculas, ou grupo terapêutico, sem comprometer sua funcionalidade quando conjugadas à 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 anexado. Por exemplo, se um anticorpo é ligado à NP de tal forma que seu local de reconhecimento é blindado, pode perder sua capacidade de vincular-se a um alvo específico⁶⁵.

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. Interação eletrostática tem se mostrado útil principalmente na montagem de DNA plasmidial em SPIO⁶⁶. Interações hidrofóbicas/hidrofílicas provaram-se muito úteis para a adsorção de drogas hidrofóbicas nos SPIO. Para esta aplicação, os SPIO são projetados com camadas hidrofóbicas, que podem adsorver drogas hidrofóbicas, que são, então, acionadas para liberação intracelular quando o revestimento se degrada⁶⁷.

I.4.a. Preparação da superfície dos SPIO com os reagentes alcoxissilanos

As biomoléculas não são originalmente reativas com a superfície das nanopartículas, assim, uma alteração inicial antes da conjugação se faz necessária. A química dos alcoxissilanos (ou organossilanos) é extremamente versátil, sendo chamados de agentes de acoplamento, porque permitem melhorias da adesão de materiais inorgânicos com orgânicos. Isso se deve à sua biofuncionalidade, pois um dos grupos hidrolisáveis pode ser substituído por um grupo não hidrolisável. Assim, os alcoxissilanos disponíveis comercialmente apresentam a característica de poderem se ligar em superfícies dielétricas, tais como óxidos de ferro, por meio das reações de hidrólise e condensação (via processo sol-gel) de seus grupos alcóxidos. Ainda, possuem um grupo terminal não hidrolisável, que é responsável pela ancoragem de drogas ou por formar ligações cruzadas (cross-link) entre substratos inorgânicos e polímeros orgânicos^{68,69}.

O processo sol-gel nas últimas décadas tem sido uma rota interessante na obtenção de materiais híbridos de natureza bastante diversificada. O *sol* é constituído de suspensão de partículas coloidais (dimensão entre 1 e 10³ nm) em líquido e o gel é formado pela estrutura rígida de partículas coloidais ou por cadeias poliméricas, que imobilizam a fase líquida nos seus interstícios⁷⁰. Além de ser um método controlável e prático para a síntese de vidro e cerâmicas, as condições moderadas nas sínteses sol-gel permitem a preparação de outros materiais, tais como, filmes, monolitos, fibras e de particular interesse, revestimentos. O

processo sol-gel usualmente utiliza soluções aquosas de sais inorgânicos (base inorgânica) ou alcóxidos metálicos dissolvidos em solventes orgânicos (base alcóxida)⁷⁰. Encontra-se bem estabelecido que os catalisadores ácidos produzem estruturas mais lineares e fáceis de dispersar que os catalisadores alcalinos. Nesse caso, estruturas mais ramificadas e condensadas são geradas, as quais não se dispersam bem em matrizes poliméricas. Em matrizes polares, como acrílicos, poli(imidas), poli(vinil acetato) e poli(álcool vinílico), a presença de segmentos lineares ricos em grupos Si-OH favorece a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos carbonila e N-H desses polímeros, favorecendo a compatibilização entre as fases orgânica e inorgânica⁷¹.

Para fins de funcionalização de superfícies dielétricas, os alcóxissilanos destacam-se e podem ser representados pela fórmula geral $R_nSiX_{(4-n)}$, sendo X o grupo hidrolisável e R o grupo terminal que irá funcionalizar a superfície. Dentre os diversos precursores, encontram-se os agentes sililantes organofuncionalizados de fórmula geral $(R'O)_3-Si-R-NH_2$, que se caracterizam por possuírem dois grupos funcionais bastante reativos: o grupo amínio e o grupo alcóxido. O grupo amínio, identificado como parte orgânica do alcóxissilano, é responsável pelas ligações com outros compostos orgânicos (por exemplo, servirá como âncora para a modificação com ácido fólico) e o grupo alcóxido é responsável pelas ligações entre os oligômeros e a superfície do substrato, normalmente uma matriz inorgânica que possua hidroxilas (OH) na superfície. As reações entre oligômeros e a superfície do substrato inicialmente são realizadas por forças intermoleculares, porém, por aquecimento, elas evoluem em grande parte para ligações covalentes, reações estas de condensação com formação de H_2O como subproduto⁷¹. Assim, funcionalizar a superfície de NPs magnéticas com alcóxissilanos pode levar à policondensação dos silanóis em solução para formar ligações Si-O-Si estáveis antes da formação de ligações Si-O-Fe na superfície das NPs. A Figura 11 ilustra um possível esquema de funcionalização de superfícies de nanopartículas.

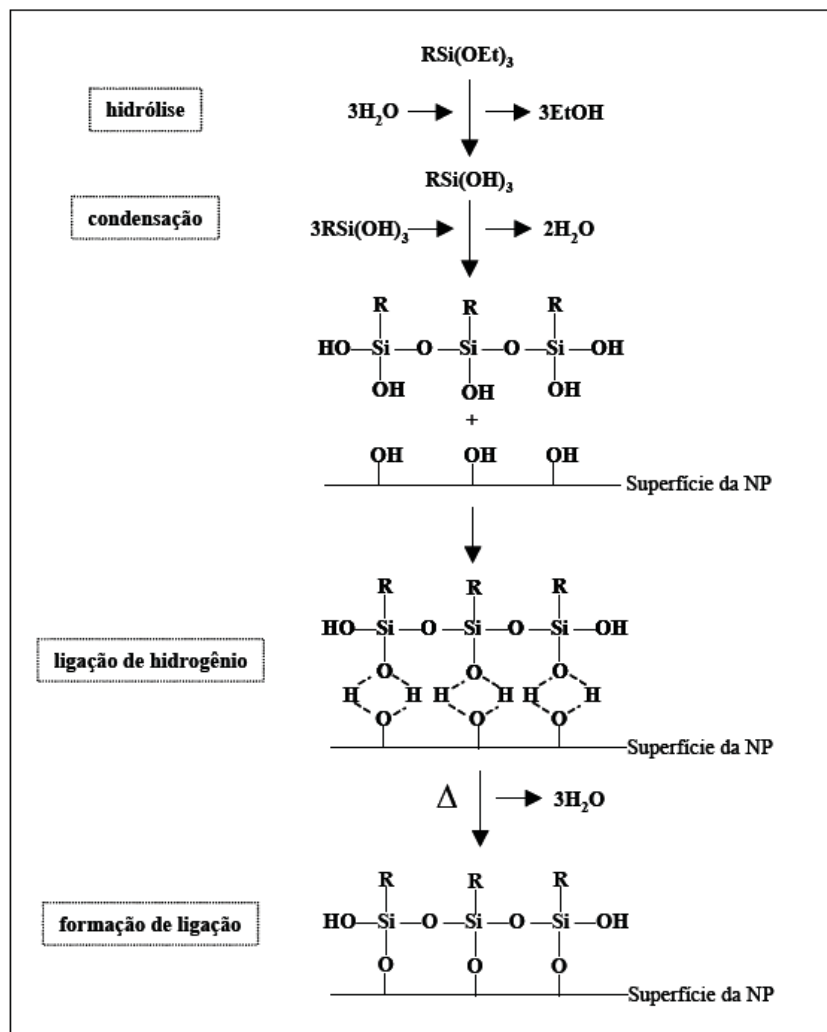


Figura 11. Esquema das reações de hidrólise e condensação de alcoxissilanos na funcionalização de superfícies de nanopartículas⁷².

I.4.b. Alvos específicos de nanopartículas de óxido de ferro

As nanopartículas de óxido de ferro podem atingir um tumor tanto por agentes ativos quanto por passivos. O primeiro modo se baseia no acúmulo de nanopartículas em tecidos tumorais, graças às estruturas vasculares porosas do sistema capilar sanguíneo na região do tumor. Essa permeabilidade reforçada no local do tumor, acompanhada por um efeito de retenção melhorada devido à ruim drenagem linfática, tem sido explorada para a liberação de diferentes sistemas carreadores de fármacos, incluindo algumas formulações à base de óxido de ferro. O alvo tumoral é baseado na funcionalização da superfície das nanopartículas com um ligante, tendo uma alta especificidade para células cancerígenas. Diferentes proteínas,

antígenos, pequenos peptídeos e vitaminas podem ser conjugados na superfície de nanopartículas. Estudos *in vitro* realizados em nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas têm demonstrado uma maior internalização em relação às nanopartículas não funcionalizadas⁷³⁻⁷⁵.

A Figura 12 descreve o modelo de uma nanopartícula multifuncional (NPM) e as atividades locais de várias categorias de agentes terapêuticos concebidos para terapia de câncer. Como mostrado, NPM desenvolvida para uma dupla aplicação pode transportar moléculas alvo na superfície, como também múltiplos agentes de imagens (rádio, ópticas, magnéticas). As terapias nas formas de bioterapia (por exemplo, gene), quimioterápicos (ou seja, formulações de medicamentos químicos), e/ou radioterapia (por exemplo, radionucleotídeos) podem ser utilizadas (Figura 12A). Ao nível celular diferentes mecanismos terapêuticos podem ser ativados dependendo da escolha de terapêuticas integradas nas NPMs. Por exemplo, conforme mostrado na Figura 12B, peptídeos/anticorpos estão se ligando aos receptores da superfície celular, possivelmente requerendo internalização mediada por receptor (a); agentes quimioterápicos requerem interiorização e liberação lenta da droga intracelular (b); siRNA DNA e terapia gênica exigem uma ação na região perinuclear ou núcleo, necessitando de captação de celulares, seguido pelo escape dos compartimentos endossomal (c) e, por último, a radioterapia requer a internalização celular (d)⁶⁵.

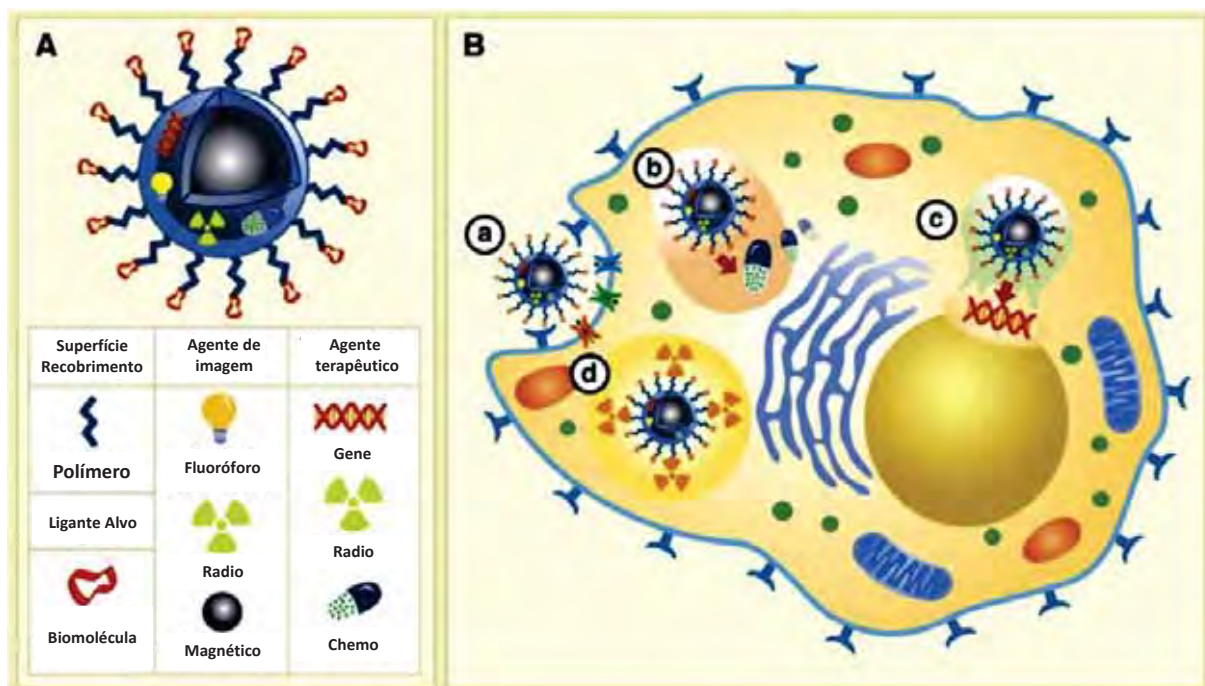


Figura 12. Ilustração da nanopartícula multifuncional (NPM) terapêutica e possíveis mecanismos de ação ao nível celular. (A) Um NPM modificada com moléculas alvo e agentes de imagem, como também potencial cargas terapêuticas (gene, radio, quimio). (B) Quatro possíveis modos de ação para vários agentes terapêuticos: (a) NPM ligando-se a receptores da superfície celular facilitando-se a sua internalização, (b) liberação controlada intercelular de quimioterápicos, (c) liberação do gene terapêutico pós interação endossomal e posterior alvo do núcleo e (d) decaimento intracelular de materiais radioativos⁶⁵.

I.4.c. Interface Nano-bio

O rápido crescimento em nanotecnologia está aumentando a possibilidade de os nanomateriais entrarem em contato com os seres humanos e com o meio ambiente. A interface entre os nanomateriais e as biomoléculas pode ser chamada de interface "nano-bio" (Figura 13), a qual compreende as interações físico-dinâmica, cinética e termodinâmica entre as superfícies de nanomateriais e as superfícies de componentes biológicos (por exemplo, proteínas, membranas, fosfolípidios, vesículas de endocitose, organelas, DNA e fluidos biológicos)⁶. A interface nano-bio é composta por três componentes, que interagem de forma dinâmica: (i) a superfície das nanopartículas, cujas características são determinadas por sua composição físico-químicas, (ii) a interface sólido-líquido e as mudanças que ocorrem quando a partícula interage com componentes do meio envolvente, (iii) a zona de interface sólido-líquido em contato com substratos biológicos. Em um determinado meio, as características

das nanopartículas mais importantes, que determinam as propriedades de superfície, são a composição química do material, a funcionalização da superfície, a forma e o ângulo de curvatura de porosidade, a cristalinidade da superfície, a heterogeneidade, a aspereza e a relação hidrofóbico/hidrofílico^{6,76,77}. Outras propriedades quantificáveis, tais como, a carga de superfície eficaz (potencial zeta), a agregação das partículas, o estado de estabilidade, dispersão / biodegradabilidade, características de dissolução, a hidratação e a valência da camada de superfície, são determinadas pelas características do meio de suspensão, incluindo a força iônica, pH, temperatura e presença de grandes moléculas orgânicas (proteínas, por exemplo) ou tensoativos^{6,77,78}.

Quando uma nanopartícula é introduzida no corpo, vários aspectos podem comprometer a sua estabilidade. O meio fisiológico tem força iônica diferente em comparação com a água ultrapura utilizada principalmente em laboratórios. O aumento da força iônica da solução aquosa irá suprimir a dupla camada elétrica em torno das partículas carregadas, resultando em uma agregação, parcial ou total, do sistema. Um comportamento semelhante pode ser observado pelas partículas após a sua entrada em compartimentos específicos do corpo, devido a uma variação de pH em relação aos meios de comunicação em que as nanopartículas são inicialmente dispersas. Além disso, quando as nanopartículas são injetadas no sangue, uma adsorção não específica de proteínas do plasma pode ocorrer na superfície de nanopartículas. Esse fenômeno, conhecido como opsonização, é mais frequente em partículas de tamanho nanométrico, devido a dois efeitos principais: à alta relação superfície-volume às forças atrativas entre as nanopartículas. Quando esse fenômeno ocorre, uma rápida depuração das nanopartículas é observada⁵. Embora, muitas vezes, para nanopartículas assume-se um comportamento de estado estacionário para avaliar as propriedades de suspensões em massa (por exemplo, carga líquida, ponto isoelétrico ou o tamanho do agregado médio), esta

abordagem deve ser ajustada quando se considera a interface nano-bio. Essa interface é submetida a um ambiente heterogêneo e dinâmico, conduzindo a um estado metaestável⁷⁹.

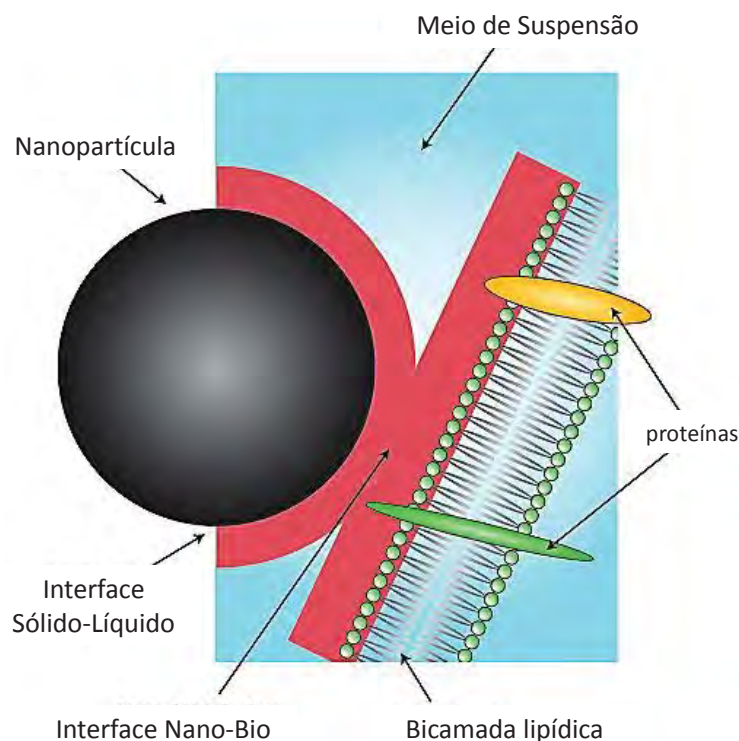


Figura 13. Representação da interface entre a nanopartícula e uma bicamada lipídica⁶

O envolvimento de partículas pela superfície da membrana e a internalização celular irão introduzir as partículas a novas interfaces. As interações na superfície celular e compartimentos intracelulares envolvem um grande número de forças e interações moleculares.. Os princípios da interface nano-bio estão sendo investigados por meio de novas técnicas de imagem e abordagens biológicas⁶, entretanto os princípios básicos da Química coloidal ainda são utilizados para investigar essa interface.

Quando nanopartículas são introduzidas em um fluido biológico (por exemplo, de sangue, plasma ou líquido intersticial), elas são revestidas com as proteínas que podem sofrer mudanças conformacionais, levando à exposição dos epítopos, efeitos de avidéz e/ou funções alteradas⁸⁰⁻⁸². O conceito de nanopartícula recoberta com uma coroa de proteína é importante na definição das propriedades de superfície, cargas, resistência à agregação e tamanho

hidrodinâmico das nanopartículas (Figura 14). A superfície das nanopartículas interativa pode ser pré-ligada a substâncias químicas, que podem afetar a cinética de adsorção de proteínas. A coroa de proteína poderia moldar as interações celulares com nanomateriais, uma questão chave é saber se tais interações proteicas dependem da composição das partículas (Figura 14). A natureza da superfície das partículas (por exemplo, hidrofobicidade, tamanho, raio de curvatura, carga, revestimentos que exercem efeitos estéricos ou eletroestérico) irá controlar a interação das biomoléculas com as partículas, e, portanto, mediar seu acesso às células⁸⁰. Várias proteínas são conhecidas por formar complexos transitórios com nanopartículas; grandes variações em suas taxas de dissociação estabelecem interações preferenciais entre os tipos específicos de partículas e fluidos biológicos em que estão suspensos⁶.

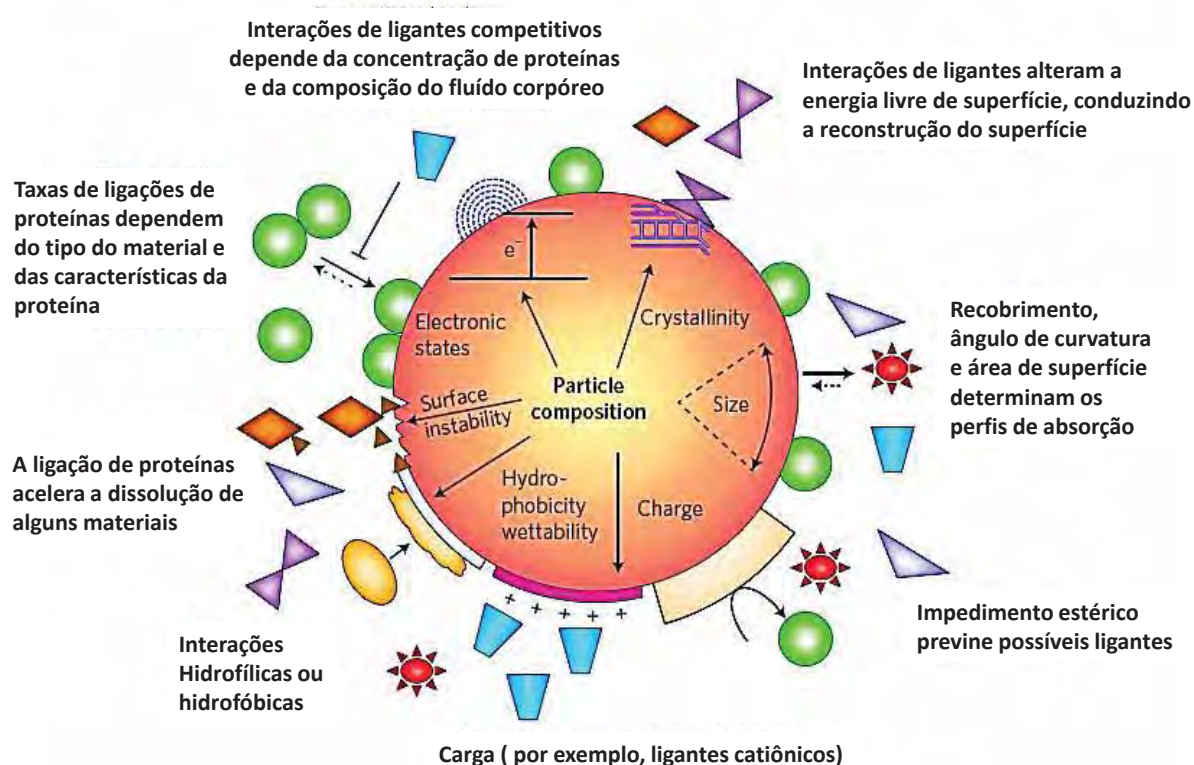


Figura 14. Efeitos da coroa de proteína em torno de uma nanopartícula. A coroa representa uma interface primária nano-bio, que determina o destino da nanopartícula e pode causar efeitos deletérios sobre as proteínas interativas. As características do material pré-existente ou inicial contribuem para a formação da coroa em um ambiente biológico. Característica da coroa de proteína, tais como, taxas de desagregação, interações competitivas entre moléculas por impedimento estérico e polímeros adsorvidos, e o perfil de proteínas do fluido corporal levam a mudanças dinâmicas na coroa. A coroa pode mudar quando as partículas se movem de um compartimento biológico para outro⁶.

As características biofísicoquímicas das nanopartículas determinam sua biocompatibilidade *in vivo* na área de nanoterapia. Depois de avaliar mais de 130 tipos diferentes de nanopartículas, incluindo os fulerenos, óxidos de metais, polímeros, lipossomas, dendrímeros, pontos quânticos e colóides de ouro, o Laboratório de Caracterização de Nanotecnologia (NCL) no Instituto Nacional do Câncer, em Maryland, constatou que a carga, o tamanho e a hidrofobicidade da superfície são os principais parâmetros que influenciam a biocompatibilidade das nanopartículas⁸³. A Figura 15 mostra um diagrama de fase tridimensional, apresentando as tendências de biocompatibilidade de cerca de 130 nanopartículas para uso terapêutico. As principais variáveis das partículas independentes, que determinam a biocompatibilidade *in vivo* (cor do espectro) são tamanho, potencial zeta, (carga superficial) e dispersão (em particular o efeito da hidrofobicidade). A biocompatibilidade é refletida no espectro de cores. A toxicidade é representada pela cor vermelha, segurança como azul e azul-verde-amarela como intermédios de segurança (na mesma ordem). As partículas que promovem o aumento do efeito da permeação e retenção (EPR) e, portanto, ideal para administração de medicamentos quimioterápicos para câncer, geralmente têm tamanhos médios do diagrama e cargas superficiais relativamente neutras⁶.

As nanopartículas hidrofóbicas geralmente têm tempos de vida *in vivo* com curta duração (segundos a minutos), porque elas são rapidamente removidas da circulação por elementos celulares do sistema reticuloendotelial, particularmente no fígado e no baço. Embora esse comportamento pode limitar a biodisponibilidade e a utilidade das partículas como transportadoras de medicamentos, alguns aplicações *in vivo* mostram rápida absorção pelos macrófagos para levar nanopartículas para os gânglios linfáticos ou locais de inflamação (por exemplo, a ressonância magnética do fígado por nanopartículas de ferro paramagnético). A importância do tamanho das partículas é corroborada por dados que revelam que os pulmões, trato gastrointestinal e pele são barreiras bastante eficazes contra a absorção e a

disseminação de nanopartículas. Por exemplo, as nanopartículas de TiO_2 e de poliestireno não penetram na pele humana normal, enquanto que os pontos quânticos podem penetrar na pele e ser encontrados em outros tecidos e órgãos⁸⁴. Quando deliberadamente injetada na corrente sanguínea, no entanto, o tamanho das nanopartículas tem um efeito importante sobre as taxas e vias de liberação do corpo. Os rins, por exemplo, podem excretar pequenas partículas de 8 nm (Figura 15). Por outro lado, o fígado e o baço podem captar partículas maiores que 200 nm. Células de Kupffer prendem as partículas até o fígado degradá-las. Nanopartículas variando em tamanho 30-40 nm e centenas de nanômetros podem sofrer acúmulo passivo em locais de tumor através do aumento do efeito de retenção e de permeação (EPR). Esse fenômeno refere-se à maior permeabilidade da vascularização do tumor, que quando acoplado com diminuição da drenagem linfática, permite que os materiais se acumulem nas proximidades do tumor. Finalmente, a importância da carga das partículas é ilustrada através dos estudos do NCL da segurança de nanomaterial *in vivo* e *in vitro* de uma série de nanopartículas de tamanho relativamente constante, mas variando o potencial zeta⁸³. Partículas catiônicas são mais citotóxicas e mais prováveis para induzir a agregação plaquetária do que as partículas neutras ou aniônicas⁸⁵; esta tendência foi confirmada em estudos da capacidade de poliestireno catiônico induzir citotoxicidade, derrame vascular e infiltrados inflamatórios nos pulmões de ratos e camundongos. Este mecanismo de toxicidade também pode explicar a ocorrência de edema agudo pulmonar e bronquiolite obliterante em seres humanos expostos ao spray de partículas catiônicas⁸⁶.

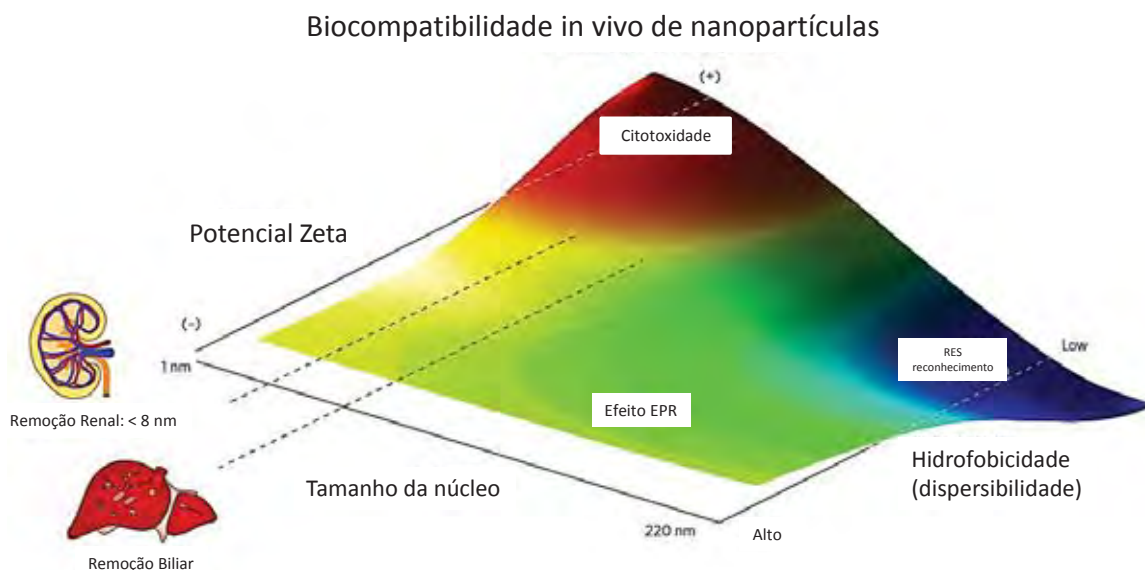


Figura 15. Características físicas de nanopartículas que determinam suas biocompatibilidades *in vivo* ^{6,7}.

I.5. Início dos estudos deste trabalho

Este trabalho de pesquisa originou-se a partir de estudos iniciais realizados pelo pesquisador Rodrigo Fernando Costa Marques (FAPESP nº 05/56761-3) ⁷², os quais foram realizados no Laboratório de Materiais Magnéticos e Colóides no período de 2006 a 2007. O pesquisador Marques investigou a funcionalização de nanopartículas de óxidos magnéticos com os reagentes 3-aminopropil-trietóxisilano (APTS) e n-propil-trimetóxisilano (NPTS). Os resultados indicaram que a mistura de NPTS e APTS conduz a um aumento da densidade de amina livre na superfície das nanopartículas em relação às nanopartículas funcionalizadas com apenas APTS. Marques correlacionou o aumento da densidade de amina na superfície das NP funcionalizadas com APTS-NPTS com o mecanismo oscilatório de adsorção de APTS em superfície de óxidos de ferro. Marques verificou que o NPTS é condensado preferencialmente na superfície das nanopartículas de magnetita seguido da condensação com APTS. Neste aspecto, este trabalho prosseguiu na mesma linha de pesquisa, contudo, modificando os reagentes de estudo.

II. OBJETIVOS

Este trabalho de pesquisa tem como objetivo geral desenvolver metodologia para a obtenção de nanopartículas magnéticas funcionalizadas, compostas por um núcleo magnético e recobertas por compostos inorgânicos/orgânicos bifuncionais, visando suas aplicações biomédicas.

Na primeira etapa do trabalho, o objetivo foi investigar os efeitos da irradiação ultrassônica simultaneamente ao processo de coprecipitação, considerando-se a influência da amplitude acústica, a fim de verificar os efeitos da cavitação acústica na formação das partículas.

Na segunda etapa do trabalho, o objetivo foi investigar a influência da quantidade dos grupos alcóxidos hidrolisáveis (mono, di e trialcóxidos), visando controlar a densidade de grupos amina na superfície das nanopartículas.

Na terceira etapa, a superfície das nanopartículas foram funcionalizadas com ácido fólico, via química das carbodiimidas, com o objetivo de investigar a influência dos diferentes alcóxissilanos na quantificação de ácido fólico e de suas propriedades cinéticas coloidais em solução tampão de fosfato.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Preparação das amostras

Durante todas as etapas de preparação das amostras e tratamentos utilizaram-se reagentes químicos com grau analítico e sem nenhum tratamento prévio. Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando água mili-Q e/ou deionizada.

III.2. Síntese das nanopartículas

A magnetita foi obtida via coprecipitação pela adição de uma solução de brometos de ferro (mistura de 1:2 de Fe^{2+} e Fe^{3+} de concentração total de $1,5 \text{ mol L}^{-1}$) numa solução aquosa de 25 mL de 1 mol L^{-1} NaOH, mantendo a temperatura da solução em $80 \text{ }^\circ\text{C}$. Simultaneamente com esse procedimento, utilizou-se uma sonda ultrassônica (tapered microtip exponential – 3mm; Sonics&Vibracell, UK, $f = 25 \text{ kHz}$) inserida na solução reagente. O equipamento de ultrassom (US) utilizado possui o controle da porcentagem da amplitude acústica, sendo que nesta etapa do trabalho usou-se 21, 25 e 30%, conforme Tabela III. A nomenclatura utilizada foi A0, A21, A25 e A30, que representam as amostras sem US, amplitude de 21, 25 e 30%, respectivamente. A energia e potência dissipadas no sistema, mostradas na Tabela III, são fornecidas pelo software do equipamento.

Tabela III. Amostras submetidas ao ultrassom por um período de 60 min.

Amostras	Ultrassom		
	Amplitude (%)	Potência (W)	Energia (J)
A0	-	-	-
A21	21	2 ± 1	9920
A25	25	7 ± 1	25035
A30	30	13 ± 1	46543

Após o procedimento, as suspensões foram colocadas em repouso para a separação do precipitado, sendo que nessa etapa utilizou-se um ímã permanente colocado na parte inferior externa do béquer. O sobrenadante foi removido e um precipitado foi separado, o qual foi lavado com excesso de água e re-sedimentado pelos mesmos processos. As amostras foram secas em estufa na temperatura de 50 °C.

III.3. Modificação da superfície das nanopartículas com alcoxissilanos

Para a investigação da modificação de superfície com diferentes alcoxissilanos, os óxidos magnéticos foram obtidos pelo mesmo procedimento descrito no item III.2 deste trabalho. Entretanto, limitou-se apenas ao procedimento com aplicação de 30% de amplitude acústica devido à obtenção de tamanho menor das NPs. Uma camada fina de silanos foi realizada pela direta silanização das partículas das NPs com os alcoxissilanos. Após a estabilização das nanopartículas de óxidos de ferro, adicionou-se o reagente silano em uma concentração de 0,1% (v/v). Os alcoxissilanos utilizados foram: 3-aminopropil-trietóxisilano (APTS), 3-aminopropil-etil-dietóxisilano (APDS) e 3-aminopropil-dietil-etóxisilano (APES). O ultrassom, com amplitude de 30%, foi utilizado simultaneamente ao processo de silanização. O processo de lavagem das nanopartículas modificadas com os alcoxissilanos foi realizado conforme o item III.2.

Para investigar a modificação da superfície das partículas foi realizado o planejamento fatorial 2^n , sendo n o número de variáveis, que nesse caso foram os 3 diferentes tipos de alcoxissilanos. Estudou-se a influência da quantidade dos grupos alcóxidos hidrolisáveis, visando controlar a densidade de grupos amina na superfície das nanopartículas. Para todas as amostras foi utilizada a mesma concentração final de alcoxissilanos. Assim, foram realizados 8 experimentos (2^3), conforme a Tabela IV, sendo os símbolos (+), indicando a presença, e o (-), indicando a ausência dos alcoxissilanos.

Tabela IV. Planejamento fatorial da funcionalização das nanopartículas magnéticas.

Amostras	(APTS)	(APDS)	(APES)
A30	-	-	-
A30-APTS	+	-	-
A30-(TS/DS)	+	+	-
A30-(TS/DS/ES)	+	+	+
A30-(DS/ES)	-	+	+
A30-(APES)	-	-	+
A30-(APDS)	-	+	-
A30-(TS/ES)	+	-	+

A numeração das amostras procedeu-se dando sequência à numeração do A30 e acrescentando o alcóxissilano usado; por exemplo, a amostra A30-(TS/DS) é o óxido de ferro com a superfície modificada com uma mistura proporcional dos alcóxissilanos APTS e APDS.

III.4. Quantificação da concentração do grupo amina livres na superfície das nanopartículas sintetizadas

Para determinar a densidade do grupo amina na superfície das NPs preparadas, utilizou-se o método proposto por Moon, *et al*⁸⁷, que consiste na reação entre um aldeído e grupos amina na superfície das NPs, formando 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 ($\lambda_{\max} = 267 \text{ nm}$) do aldeído após a hidrólise das iminas permite a determinação indireta da concentração de aminas na superfície das NPs.

A determinação do grupo amina livre procedeu-se da seguinte forma:

- 1) Pesou-se aproximadamente 20 mg da amostra A30-APTS em um ependorf. Em seguida, adicionou-se 1,0 mL da solução de acoplamento (SOLUÇÃO 1: $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de 4-nitrobenzaldeído em solução de etanol absoluto e ácido acético (0,8% v/v)).

Centrifugou-se a amostra, retirou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento 3 vezes. Na última vez do procedimento, manteve o ependorf em repouso por 30 minutos antes da centrifugação.

- 2) Após a formação da ligação imina, adicionou-se 1,0 mL da solução de lavagem ao ependorf (SOLUÇÃO 2 – etanol absoluto com 0,8% v/v de ácido acético).

Centrifugou-se a amostra, retirou-se o sobrenadante e repetiu-se o procedimento 4 vezes para retirar o excesso de 4-nitrobenzaldeído que não reagiu.

- 3) A etapa final consiste em adicionar 1,0 mL da solução de hidrólise ao ependorf (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.

As etapas 1, 2 e 3 foram repetidas para as amostras A30-APDS, A30-APES, A30-TS/DS, A30-TS/DS/ES, A30-DS/ES e A30-TS/ES. Para a quantificação da concentração do teor de amins na superfície das NPs, a curva padrão de absorção UV de 4-nitrobenzaldeído em solução de água, etanol absoluto e ácido acético (0,8% v/v) foi utilizada. Através de espectroscopia UV, a absorbância do 4-nitrobenzaldeído foi medida em λ_{max} igual a 267 nm. A Figura 16 apresenta a curva padrão do 4-nitrobenzaldeído realizada com o espectrofotômetro OceanOptics USB4000. Assim, conhecendo a massa das amostras e o volume da solução utilizado nas medidas de absorbância, foi possível determinar indiretamente a concentração de amina em função da massa da amostra.

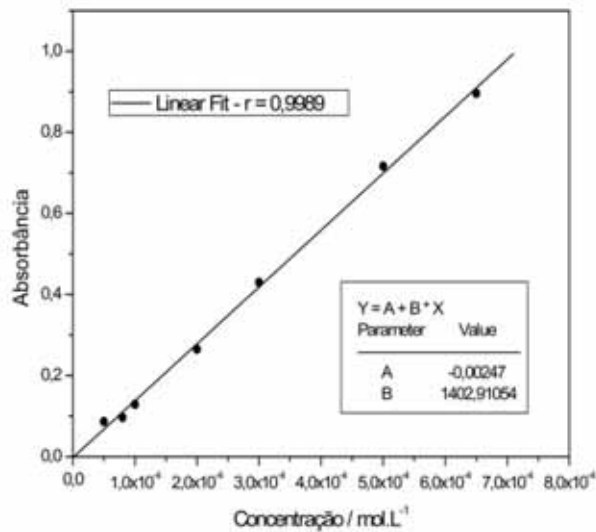


Figura 16. Curva padrão da solução de 4-nitrobenzaldeído em 267 nm utilizada para determinar a concentração do grupo amina na superfície das nanopartículas.

III.5. Funcionalização da superfície das nanopartículas com ácido fólico

Para a funcionalização da superfície das nanopartículas com ácido fólico utilizou-se o procedimento das carbodiimidias. Os reagentes utilizados foram: solução aquosa de 1% (m/v) de ácido fólico (AF), 4% (m/v) de 1-etil-3-(3'-dimetilamino) carbodiimida (EDC), 1% (m/v) de N-hidroxisuccinimida (NHS).

A reação de formação da ligação amida foi realizada da seguinte forma: 5 mL da solução de AF foram adicionados a 4 mL da solução de EDC. Após 5 minutos, 4 mL da solução de NHS foi adicionada no meio reacional. Após 5 minutos, uma dispersão de nanopartículas modificadas com os alcóxissilanos, sintetizadas conforme item III.3, 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 agitando-se em banho de gelo por um período de 24 horas. As dispersões foram lavadas com o auxílio de um ímã permanente colocado na parte inferior externa do béquer. Após cada troca do sobrenadante, a dispersão foi submetida ao banho de ultrassom por um período de 10 minutos. Dessa dispersão final foi retirada uma alíquota para as análises pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, o restante da amostra foi secado em estufa na temperatura de 50 °C.

III.6. Quantificação de ácido fólico na superfície das nanopartículas sintetizadas

Para a quantificação do ácido fólico na superfície das nanopartículas utilizou-se o reagente cromogênico *p*-dimetilaminocinamaldeído (*p*-DAC). Os reagentes utilizados foram: uma solução em metanol de $3,44 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de *p*-DAC (Riedel-de Haën), a qual é estável por uma semana se guardada no escuro a temperatura de 4°C; uma solução em metanol de $2,13 \times 10^{-1} \text{ mol}$ de ácido clorídrico (Mallinckrodt) foi preparada pela adequada diluição de HCl concentrado; uma solução aquosa de $1 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ de dodecil sulfato de sódio (SDS). As soluções padrões do trabalho foram preparadas pela apropriada diluição de soluções stock com água mili-Q para a construção da curva analítica de 2×10^{-5} a 2×10^{-3} , a qual foi realizada com o espectrofotômetro OceanOptics USB4000. Para a quantificação das amostras, preparou-se uma dispersão aquosa stock das nanopartículas sintetizadas ($1,2 \text{ mg mL}^{-1}$, $\Phi = 0,6\%$). Um (1) mL desta dispersão foi utilizado para a reação com o *p*-DAC e, em seguida, diluído com água mili-Q para um balão de 10 mL.

III.7. Difração de raios X

A identificação das fases presentes nas amostras foi realizada através da difratometria de raios X, pelo método do pó, utilizando o difratômetro Siemens D5000, no intervalo de 10 a 70 graus em 2θ . Utilizou-se radiação $K\alpha$ do cobre com velocidade de varredura de $0,020^\circ/2,0$ segundos em 2θ .

III.8. Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Para a caracterização por microscopia eletrônica de transmissão (MET), as amostras foram preparadas conforme descrito nos itens III.2 e III.3, das quais foi retirada uma alíquota de cada amostra após a síntese. As amostras foram lavadas com isopropanol anidro três vezes, em seguida, aplicou-se ultrassom por um período de 3 minutos. A dispersão foi,

então, gotejada em uma grade de cobre recoberta com carbono e seca à temperatura ambiente antes de ser submetida à análise. As medidas foram realizadas por microscópio eletrônico de transmissão (CM 120 Philips) do Laboratório de Caracterização Estrutural do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos.

III.9. Espectroscopia infravermelho com Transformada de Fourier

A fim de identificar os grupos funcionais presentes nas nanopartículas sintetizadas, medidas no infravermelho foram realizadas. Os espectros das amostras foram obtidos em pastilha de KBr previamente seco em estufa a 120°C por 24 horas na proporção de 2:100 (m/m) e faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 1 cm^{-1} , utilizando-se um espectrômetro FTIR IRAffinity-1 Shimadzu.

III.10 Mobilidade eletroforética

O ponto isoelétrico das amostras puras e recobertas e informações adicionais sobre o recobrimento das nanopartículas foram obtidos utilizando as medidas de mobilidades eletroforéticas. As medidas foram realizadas em $25 \pm 1^\circ\text{C}$ em cela capilar (ZET 5104) do equipamento Zetasizer (Malvern). As medidas preliminares foram realizadas em amostras com concentração de 1 mg L^{-1} ($\Phi = 0,5\%$), contendo 0,001 mol.L^{-1} de NaCl, e o pH foi ajustado entre 3–12 com soluções de NaOH e HCl. Em contato com água ocorre a formação de centros ativos na superfície dos óxidos, devido à adsorção de íons H^+ e OH^- , os quais determinam a magnitude do potencial de superfície⁸⁸. Devido ao comportamento anfótero destes centros, os mesmos podem dissociar-se em virtude do pH do meio, de acordo com as seguintes reações:



Tais reações mostram a dependência da carga superficial com o pH do meio e, quando o número de cargas negativas e positivas se equivalem, a carga global sobre a superfície é neutra, dando origem ao chamado ponto de carga zero (p.c.z.). O ponto isoelétrico (p.i.e.) e o ponto de carga zero (p.c.z.) coincidem quando não existe adsorção específica de íons sobre a superfície da partícula. Assim, a utilização de um eletrólito de suporte com força iônica moderada, como no caso de NaCl, permite inferir que no caso das amostras analisadas, o p.c.z. e o p.i.e. são coincidentes⁸⁸.

III.11. Medidas de espalhamento de luz dinâmico

As medidas de Espalhamento de Luz Dinâmico (Dynamic Light Scattering - DLS) foram conduzidas com a analisador de partículas Malvern Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, U.K.). O diâmetro e a intensidade média foram calculados via software Zetasizer Nano 4.2, utilizando o algoritmo CONTIN⁸⁹. As medidas foram feitas em amostras com concentração de 1 mg L^{-1} ($\Phi = 0,5\%$). Todas as medidas foram realizadas após o preparado das nanopartículas, conforme itens 2.3 e 2.5. As análises por DLS foram realizadas com o objetivo de investigar o comportamento do diâmetro hidrodinâmico das NPs em função do tempo em solução de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ hexametáfosfato de sódio, soluções de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $150 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ NaCl e tampão fosfato salina – PBS (concentração salina de soluções fisiológicas). Cada amostra foi dispersada em água destilada e submetida a 5 minutos em banho ultrassônico. As soluções stock foram preparadas em um balão de 10 mL, com concentrações de aproximadamente $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$. Cada amostra foi analisada num período de 1 hora e o diâmetro hidrodinâmico foi medido a cada 3 minutos, sendo que, antes da realização das medidas, cada amostra teve um atraso de 15 minutos.

III.12. Propriedades magnéticas

A caracterização magnética das amostras foi realizada em magnetômetro de Quantum Design SQUID a temperatura de 320 a 5 K com campo aplicado ± 7 T. As amostras foram preparadas pelo empacotamento do pó em um tubo plástico, tal que a razão axial da amostra resultante foi maior do que cinco, evitando, assim, correções devido aos efeitos de desmagnetização de forma. Os valores de magnetização de saturação (MS), coercividade (HC) e magnetização remanente (MR) foram obtidos através das curvas de histerese magnética a temperatura ambiente. Nas medidas ZFC, parte-se de uma temperatura ambiente e a amostra é resfriada em campo magnético nulo até baixas temperaturas. Em seguida um campo magnético constante é aplicado, e as medidas são feitas durante o aquecimento da amostra. Nas medidas FC, parte-se de uma temperatura ambiente e a amostra é resfriada sob ação de campo magnético constante até baixas temperaturas. Essas duas medidas foram realizadas seguidamente, com uma medida ZFC seguida de uma FC. Para a medida de ZFC, a temperatura foi diminuída até 5 K sem aplicação de campo magnético. Em seguida, um campo magnético de 100 Oe foi aplicado paralelamente ao eixo do cilindro e a medida da suscetibilidade magnética foi realizada até a temperatura de 320 K. Após esse procedimento, o campo é mantido e a medida da magnetização foi realizada com o resfriamento da amostra até a temperatura de 5 K (FC). Todos os dados de magnetização foram normalizados com a massa da amostra medida.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO MAGNÉTICO

O esquema geral da reação química de formação de magnetita utilizada neste trabalho é mostrado na Figura 17. O processo de coprecipitação a partir de sais contendo Fe^{2+} e Fe^{3+} ocorreu de acordo com a reação (03), conforme Tabela V. Porém, a química dos íons ferro em solução aquosa é, geralmente, acompanhada de reações paralelas, devido à facilidade de oxidação do Fe^{2+} e Fe^{3+} .(reação 11).

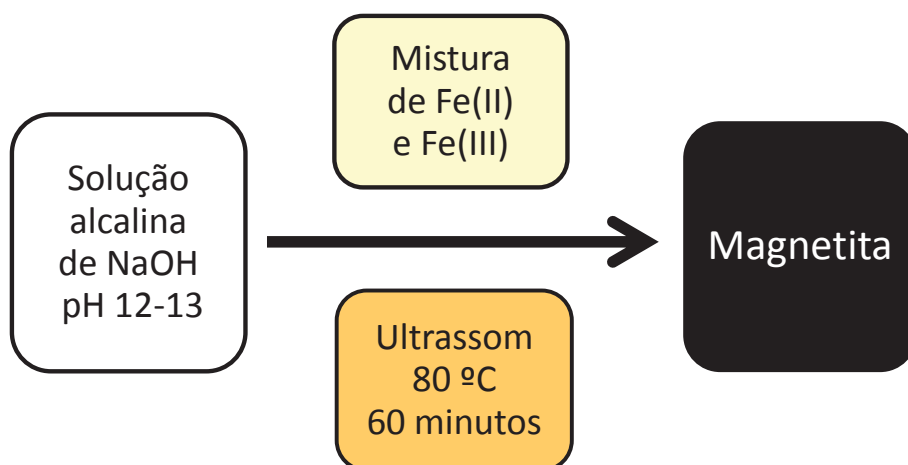


Figura 17. Esquema geral para representar o processo de formação de magnetita utilizada neste trabalho.

IV.1.a. Difratometria de raios X

Medidas de difração de raios X das amostras sintetizadas via método de sonoprecipitação química foram realizadas (Figura 18). Picos de difração de raios X característicos das distâncias interplanares das fases magnetita e maghemita foram observados. Porém, por meio de difratometria de raios X é difícil distinguir entre magnetita e maghemita, pois estas duas fases apresentam estrutura espinélio com posições de Bragg muito próximas, conforme Figuras 18. Tanto a formação de maghemita como a de hidróxido de

ferro (III) podem ocorrer devido à presença de oxigênio na solução aquosa, causando a oxidação de Fe^{2+} para Fe^{3+} , conforme reações (04), (05) e (07), (08), respectivamente.

Tabela V. Reações em solução aquosa do Ferro (II) e (III)¹⁰

	Reação	Fase
(03)	$\text{Fe}^{2+} + 2\text{Fe}^{3+} + 8\text{OH}^- \rightarrow \text{Fe}_3\text{O}_4 + 4\text{H}_2\text{O}$	Magnetita
(04)	$2\text{Fe}_3\text{O}_4 + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow 3 \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Maghemita
(05)	$2\text{Fe}^{3+} + 6\text{OH}^- \rightarrow \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3 + 3\text{H}_2\text{O}$	Maghemita
(06)	$2\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+} \rightarrow \alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3 + 6\text{H}^+ + 9\text{H}_2\text{O}$	Hematita
(07)	$\text{Fe}_3\text{O}_4 + \frac{1}{4} \text{O}_2 + \frac{9}{2} \text{H}_2\text{O} \rightarrow 3\text{Fe}(\text{OH})_3$	Hidróxido de Fe (III)
(08)	$\text{Fe}^{3+} + 3\text{OH}^- \rightarrow \text{Fe}(\text{OH})_3$	Hidróxido de Fe (III)
(09)	$\text{Fe}^{3+} + 3\text{OH}^- \rightarrow \alpha\text{-FeOOH} + \text{H}_2\text{O}$	Goetita
(10)	$\text{Fe}^{3+} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \alpha\text{-FeOOH} + 3\text{H}^+$	Goetita
(11)	$\text{Fe}^{2+} + \frac{1}{4} \text{O}_2 + \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^-$	Oxidação de Fe^{2+} para Fe^{3+}

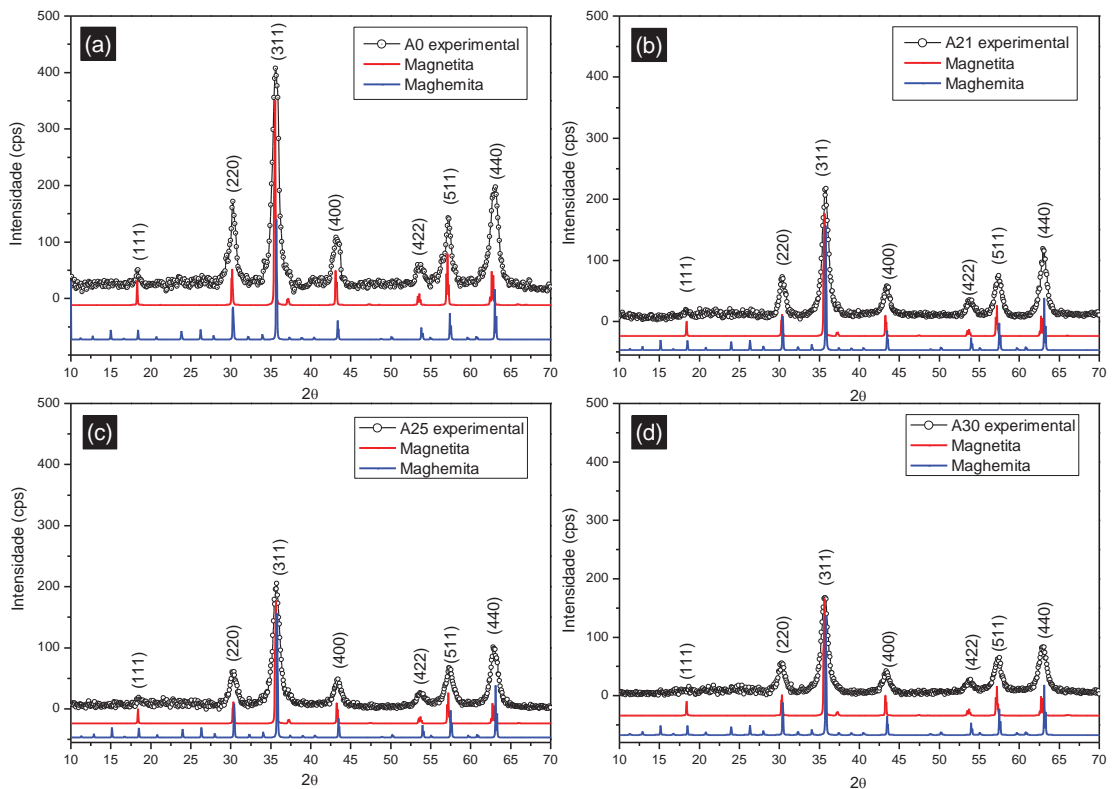


Figura 18. Difractogramas das amostras sintetizadas via coprecipitação/ultrassom; (a) sem ultrassom – A0, (b) A21, (c) A25 e (d) A30.

Conforme a reação (6), a fase hematita não foi observada, pois sua formação é favorecida em meio ácido. Não foi verificada a presença de picos de difração de raios X característicos das fases goetita e hidróxido de ferro (II). Entretanto, uma camada fina da fase goetita pode ser formada na superfície das nanopartículas e sua presença é detectada por meio de medida de Mossbauer, pois o campo hiperfino da goetita difere consideravelmente dos demais óxidos, hidróxidos e óxidos hidróxidos de ferro¹⁰.

A partir dos difratogramas foram determinados o tamanho médio do cristalito e os parâmetros de rede. O tamanho médio do cristalito para as amostras sintetizadas foi calculado utilizando a largura máxima à meia altura das reflexões de interesse, aplicando-se a equação de Scherrer (equação 5):

$$t_c = \frac{K_c \lambda}{\beta_c (\cos \theta_{\beta c})} \quad (\text{Eq. 5})$$

sendo K_s a constante de Scherrer, a qual depende da morfologia dos cristais e o comprimento de onda da radiação X, neste caso igual a K_α do cobre (1,5406Å); $\theta_{\beta c}$ corresponde ao ângulo de difração da reflexão de interesse; β_c corresponde ao valor da largura máxima a meia altura da reflexão de interesse, expresso em 2θ e deve ser corrigido com relação ao alargamento instrumental. Nesse caso, a largura instrumental utilizada foi determinada a partir de um padrão de Si, do qual foi subtraído o valor de 0,12 referente à largura máxima à meia altura⁹⁰. Os parâmetros de rede foram calculados com o auxílio do software UnitCell. Este software é um programa livre de refinamento realizado pela comparação dos índices hkl dos padrões do banco de dados JCPDS com valores de 2θ encontrados nos difratogramas de raios X das amostras⁹¹.

Os tamanhos médios do cristalito e os parâmetros de rede calculados para as amostras sintetizadas estão na Tabela VI. Pode-se verificar a influência do ultrassom (US) no sistema pela diminuição do tamanho do cristalitos, de 28,1 nm sem ultrassom até 11,6 nm com 30% de amplitude. Para a amostra sem US verificou-se que o valor do parâmetro de rede calculado

está similar ao valor da magnetita do banco de dados JCPDS (#88-866)⁹². Entretanto, a aplicação do US proporcionou a diminuição do parâmetro, o que, para a amostra com 30% de amplitude, verificou-se um valor similar ao da maghemita (#39-1346)⁹².

Tabela VI. Tamanho médio das nanopartículas

Amostras	t_c (nm)	Parâmetro de rede (a) ⁹² (Å)	
		(i)	(ii)
A0	28,1	8,3808	<i>Magnetita</i> (#88-866)
A21	22,8	8,3700	$a = 8,3847$
A25	15,6	8,3683	<i>Maghemita</i> (#39-1346)
A30	11,6	8,3607	$a = 8,3515$

Conforme dados mostrados na Tabela VI, observou-se que o aumento da intensidade ultrassônica no sistema resultou na diminuição do tamanho médio do cristalito. O aumento da amplitude da onda mecânica (sonora) aumenta a pressão acústica no sistema (Eq. 1), sendo que a intensidade é proporcional ao quadrado da pressão acústica (Eq.2)⁴³.

$$P_a = P_A \sin 2\pi f t \quad (\text{Eq. 1})$$

$$I = \frac{P_A^2}{2\rho c} \quad (\text{Eq. 2})$$

A sonicação em sistemas líquido-sólido gera dois efeitos físicos: jatos líquidos de alta velocidade e ondas de choque, criados pela cavitação acústica. Assim, para a amplitude de 30% tem-se a maior atenuação desses fenômenos. Segundo Li, *et al*⁵², pelo efeito desses dois fenômenos físicos, a sonicação pode controlar a magnitude do número primário de nucleação por unidade de volume. Portanto, esses fenômenos físicos podem influenciar a nucleação e o crescimento do cristalito, que, neste caso, o aumento da intensidade acústica no sistema conduziu à formação de cristalitos com tamanho menor.

IV.1.b Formação de peróxido de hidrogênio

Em estudos anteriores mencionados na literatura^{38,44,48,49} foi verificado que, quando soluções aquosas são submetidas à cavitação acústica, ocorre a formação de radicais livres hidrogênio e hidroxila, como produtos da sonólise de moléculas da água. Esses radicais são formados a partir da vaporização e posterior pirólise, os quais são gerados a partir das altas temperaturas e pressões causadas pelo colapso da bolha. O processo da formação de radicais via cavitação acústica pode ser sumarizado pelas seguintes reações^{44,45,47,49}:



sendo H^\bullet o símbolo internacional para a representar o uso do ultrassom em sistema,; e HO_2^\bullet o radical perhidroxila.

A concentração de peróxido de hidrogênio formada durante a síntese foi determinada pelo método colorimétrico do iodeto de potássio. Quando uma solução de iodeto de potássio em pH 5,9 é misturada com peróxido de hidrogênio, ocorre a produção do íon triiodeto ($\text{I}_3^- + 2\text{e}^- \rightarrow 3\text{I}^-$), o qual absorve em 353nm^{44,47} (reação 16). Este processo é conhecido como reação de Weissler⁹³ e tem permanecido como um método padrão para reações sonoquímica⁴⁹.



A Figura 19 mostra o gráfico com as concentrações de H_2O_2 determinadas experimentalmente. Verificou-se que o aumento da amplitude acústica da onda ultrassônica aumentou a formação de peróxido de hidrogênio da solução, sendo que os resultados obtidos estão de acordo com a literatura⁹⁴. Conforme dados da Tabela VI, para as amostras submetidas à cavitação acústica verificou-se pelos parâmetros de rede a possível formação da fase maghemita relativa à amostra sem US. Portanto, a formação de maghemita pode ter

ocorrido devido às formações de peróxido de hidrogênio e um aumento do teor de O₂ no sistema, os quais conduziram à oxidação do ferro (reações 17 e 18).

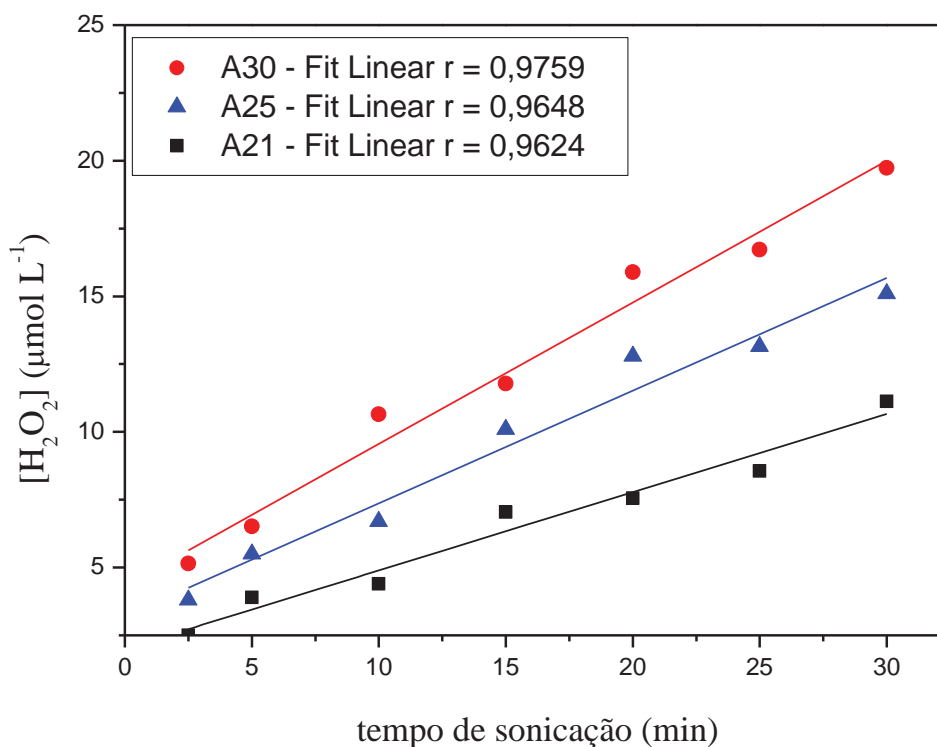
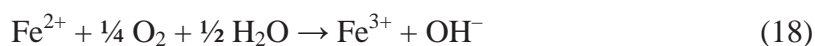


Figura 19. Formação de peróxido de hidrogênio em água, em pressão e atmosfera ambiente sonicada a 25 kHz.

IV.1.c. Microscopia Eletrônica de Transmissão.

As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de óxido de ferro com e sem a influência de diferentes amplitudes acústicas estão na Figura 20. Pelas medidas de difração de raios X verificou-se a influência da amplitude acústica na obtenção do tamanho médio das nanopartículas, a qual proporcionou uma diminuição do tamanho com o aumento da amplitude. Este fenômeno pode ser observado comparando as imagens das amostras sem US (Figuras 20(a) e 20(b)) com as das amostras sob a influência do US (Figuras 20(c) a 20(h)). Pode-se observar também que a morfologia das nanopartículas dos óxidos de ferro é próxima de esférica. O colapso de uma bolha próximo à superfície sólida estendida conduz jatos de alta velocidade do líquido para a superfície e cria ondas de

choque, as quais podem danificar a superfície, tornando-a não-esférica^{44,49,95}. Pelas análises das imagens obtidas pelo MET, verificou-se que o tamanho das partículas foram de aproximadamente 32, 25, 20 e 14 nm para as amostras A0, A21, A25, A30, respectivamente. Assim, os tamanhos analisados por MET estão de acordo com os tamanhos do cristalito obtidos pela análise de difração de raios X.

Pode-se observar pelos resultados de microscopia eletrônica das Figuras 20(c), 20(e) e 20(g), que as amostras submetidas ao US com amplitudes de 21, 25 e 30%, respectivamente, apresentaram as mesmas características. Segundo Prozorov⁹⁵ e colaboradores, no fluxo turbulento das ondas de choque geradas pela cavitação acústica, as partículas são conduzidas umas contra as outras com alta velocidade, as quais, no impacto, são capazes de induzir um efetivo ponto de contato, gerando mudança da morfologia da superfície da partícula.

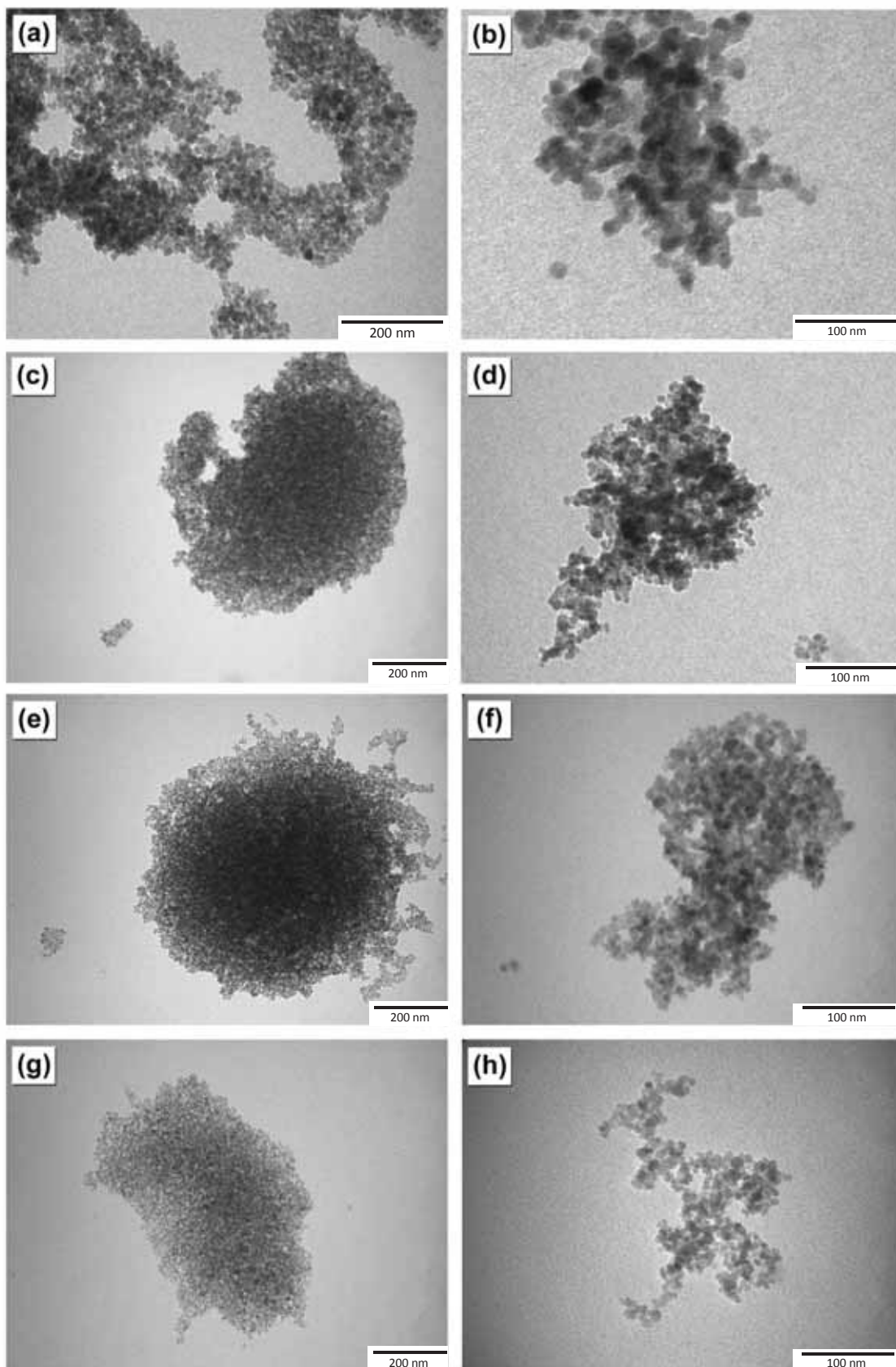


Figura 20. Microscopia eletrônica de transmissão dos óxidos ferro sem US – amostra A0 (a) e (b), e sob a influência do US – amostra A21 (c) e (d), amostra A25 (e) e (f), amostra A30 (g) e (h).

III.2. MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DOS ÓXIDOS DE FERRO MAGNÉTICOS

A terceira etapa deste trabalho refere-se à funcionalização das nanopartículas com ácido fólico. Para realizar a conjugação do ácido fólico com a superfície das nanopartículas é necessário modificar a superfície dos óxidos de ferro. A simples adsorção física da molécula do ácido fólico na superfície dos óxidos de ferro não é suficiente para ancorar certos tipos de moléculas por causa de sua força de ligação. Assim, neste trabalho utilizou-se a química dos alcoxissilanos para criar uma superfície apropriada para posterior conjugação das moléculas de ácido fólico com os grupos da superfície modificada. As estruturas dos alcoxissilanos utilizadas estão representadas na Figura 21. Para a investigação da modificação de superfície com diferentes alcoxissilanos, os óxidos magnéticos foram obtidos apenas pelo procedimento com aplicação de 30% de amplitude acústica, devido à obtenção de tamanho menor das NPs.

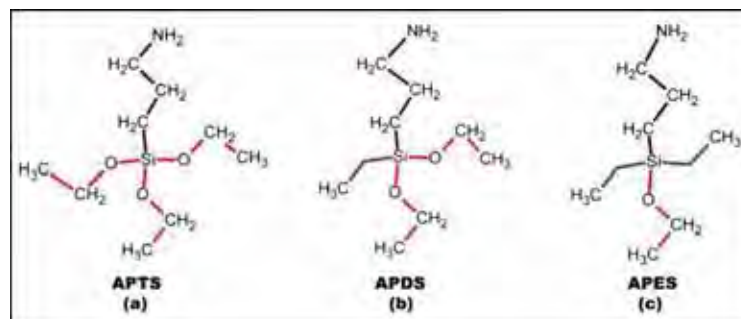


Figura 21. Alcoxissilanos utilizados neste trabalho; (a) 3-aminopropil-trietóxisilano (APTS), (b) 3-aminopropil-etil-dietóxisilano (APDS) e (c) 3-aminopropil-dietil-etóxisilano (APES)

IV.2.a. Difração de raios X

As Figuras 22 e 23 mostram os difratogramas de raios X das amostras sintetizadas, comparadas com os padrões de difração de raios X das fases magnetita (ficha nº 87-2324), maghemita (ficha nº 25-1402) e óxido de silício (ficha nº 76-6470), todas extraídas do banco de estruturas cristalinas JCPDF⁹², e observados os picos de difração de raios X característicos das distâncias interplanares da fase magnetita e maghemita como descrito no item **III.1.a.**

Pode-se observar nos difratogramas de raios X das Figuras 22 e 23 que a inserção dos alcóxissilanos na síntese não causou mudança estrutural nas fases dos óxidos de ferro. Em alguns difratogramas das figuras 22 e 23, observou-se a presença de um halo amorfo na região entre 20 e 25 de 2θ , a qual corresponde à interação do porta amostra utilizado na medida.

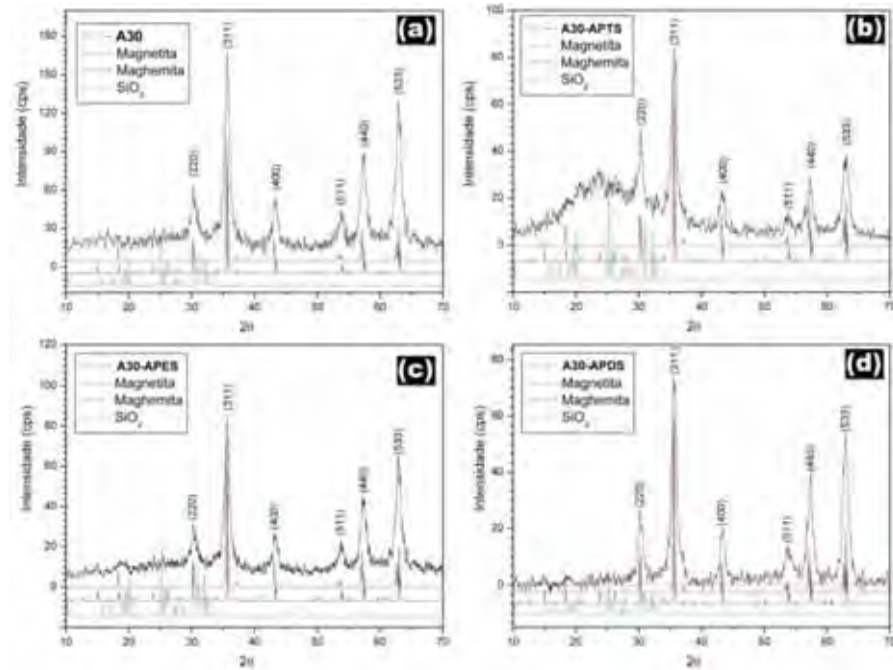


Figura 22. Difratogramas de raios X das amostras modificadas; (a) amostra A30 (NP sem funcionalização); (b) amostra A30-APTS (NP funcionalizada com APTS); (c) amostra A30-APES (magnetita funcionalizada com APES); (d) amostra A30-APDS (magnetita funcionalizada com APDS).

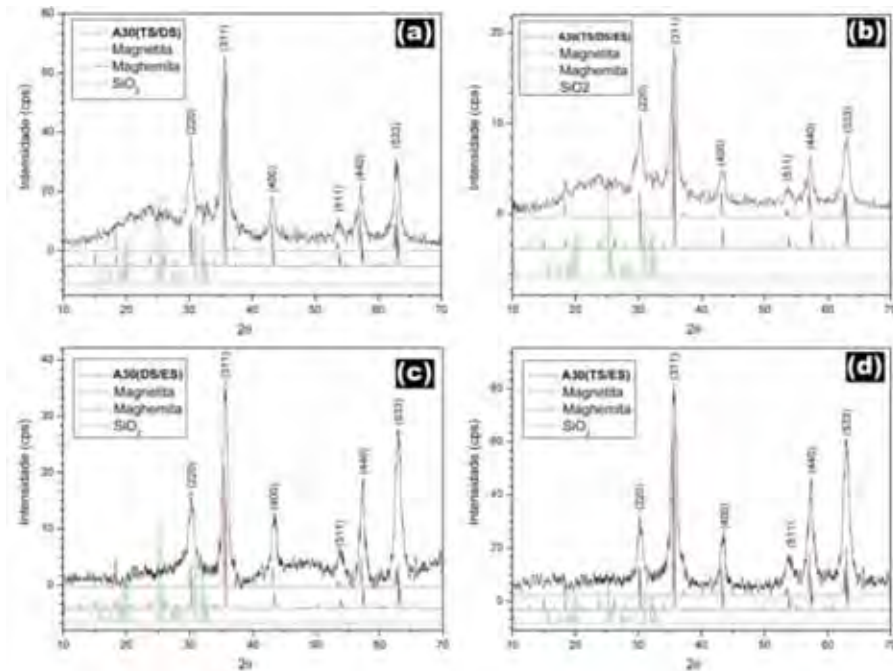


Figura 23. Difratogramas de raios X das amostras modificadas; (a) amostra A30-(TS/DS), (b) amostra A30-(TS/DS/ES), (c) amostra A30-(DS/ES); (d) amostra A30-(TS/ES).

IV.2.b. Espectroscopia no Infravermelho

A identificação dos grupos funcionais nas NPs modificadas com alcoxissilanos foi realizada por meio dos espectros no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). A Figura 24 apresenta o espectro infravermelho das amostras A30 (a), A30-APES (b), A30-APDS (c) e A30-(APTS) (d). Verificou-se a presença das bandas de absorção correspondentes às ligações Fe-O ($630-570$ e 440 cm^{-1}), Si-OH ($920-830\text{ cm}^{-1}$), Si-O-Si ($1100-1000\text{ cm}^{-1}$), C-N ($1400-1220\text{ cm}^{-1}$), C-H ($2920-2850\text{ cm}^{-1}$) e N-H ($3370-3305$ e $1670-1590\text{ cm}^{-1}$). Waldron e colaboradores⁹⁶ atribuíram as bandas de absorção da ligação Fe-O em partículas de Fe_3O_4 em 570 e 375 cm^{-1} , às vibrações de estiramento ν_1 e ν_2 , respectivamente. Entretanto, quando as dimensões da partícula são reduzidas à escala nanométrica, ocorre o aumento da constante de força de ligação química na superfície e as bandas de absorção das ligações Fe-O são deslocadas para valores maiores de número de onda. Assim, em NPs de Fe_3O_4 as bandas de absorção devidas aos estiramentos ν_1 e ν_2 ocorrem em 600 e 440 cm^{-1} , respectivamente^{96,97}. Além deste deslocamento, a banda em 600 cm^{-1} é desdobrada em duas bandas em torno de 640 e 580 cm^{-1} . O deslocamento e o desdobramento das bandas de absorção na região do infravermelho em função do tamanho finito da NP devem-se à diminuição do número de ligações para átomos na superfície, resultando no rearranjo dos elétrons não localizados na superfície das NP⁹⁷. Em todas as amostras funcionalizadas deste trabalho (Figuras 24 e 25), verificou-se que as bandas de absorção do Fe-O ocorreram em torno de 600 e 440 cm^{-1} , sendo que as bandas em 600 cm^{-1} foram desdobradas em duas bandas em torno de 640 e 580 cm^{-1} .

As bandas de absorção no infravermelho características dos grupos silanol e siloxano foram observadas em todas as amostras, indicando a condensação dos alcoxissilanos na superfície das NPs, conforme Figuras 24 e 25. O grupo silanol (Si-OH) apresenta uma banda de absorção infravermelho envolvendo o estiramento Si-O na região entre 920 e 830 cm^{-1} ⁹⁸,

enquanto que os grupos siloxanos (Si-O-Si) são caracterizados por uma banda de absorção infravermelho de 1100 a 1000 cm^{-1} ⁹⁷. Observou-se uma banda na região de 1325 cm^{-1} , a qual pode corresponder ao deslocamento na banda de absorção infravermelho característica da frequência de vibração da ligação Si-C (1250 cm^{-1}).

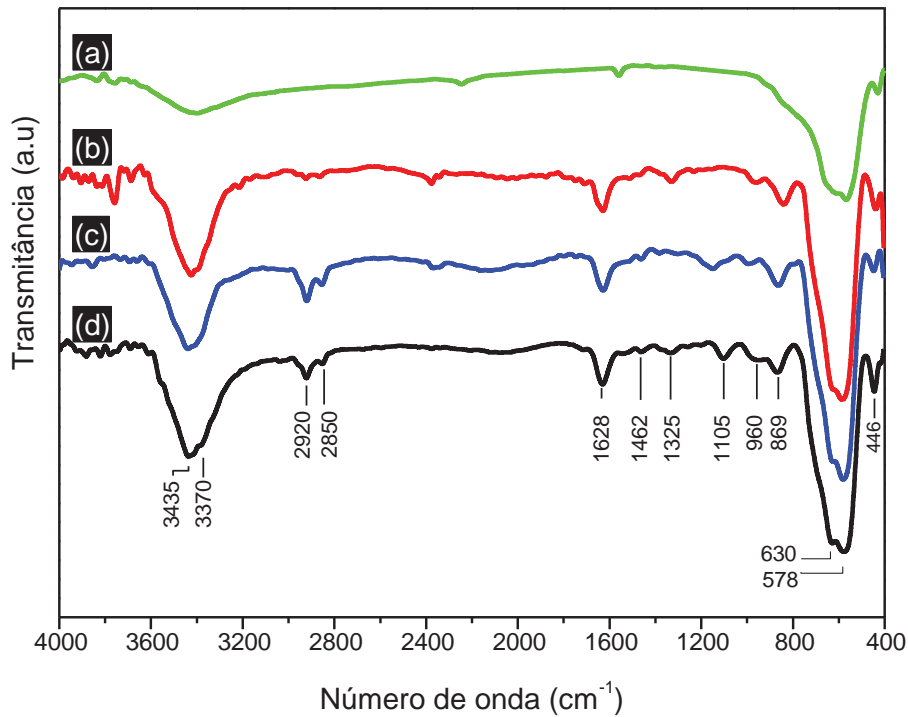


Figura 24. Espectro de absorção na região do infravermelho das amostras A30 (a), A30-APES (b), A30-APDS (c), A30-APTS (d).

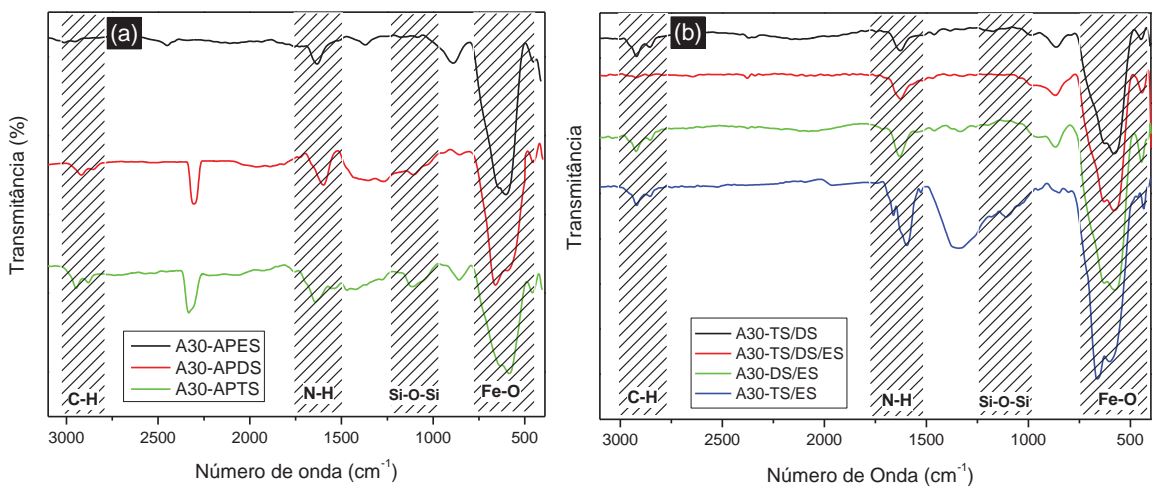


Figura 25. Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras: (a) A30-APTS, A30-APDS, A30-APES e (b) A30-TS/DS, A30-TS/DS/ES, A30-DS/ES, A30-TS/ES.

A espectroscopia por absorção infravermelho indicou a presença do grupo amina nas amostras, atribuídas às frequências de vibrações do grupo R-NH₂. As bandas na região entre 1400 e 1260 cm⁻¹ são atribuídas ao estiramento da ligação C-N em grupos R-NH₂. O movimento de deformação da ligação R-NH₂ é caracterizado por duas bandas nas regiões de 1670-1590 cm⁻¹ e de 854-778 cm⁻¹, as quais indicam que o grupo amina está livre⁹⁸. Entretanto, o grupo amina também pode estar ligado diretamente com a superfície das NPs via ligação de hidrogênio. Contudo, o estiramento da ligação N-H via ligação de hidrogênio é atribuído na região de 3370 a 3305 cm⁻¹⁹⁸. Ainda, verificou-se a presença da banda dupla na região entre 3000 e 2800 cm⁻¹, que é atribuída ao modo de estiramento das ligações C-H⁹⁸ provenientes do grupo propil do APTS, APDS e APES e também dos grupos etila providos do APDS e APES.

A principal diferença entre os espectros de absorção infravermelho das amostras funcionalizadas com os alcoxissilanos encontra-se na região de 640 a 580 cm⁻¹. Conforme Figura 26, verificou-se o deslocamento na banda de absorção infravermelho característica da frequência de vibração de estiramento da ligação Fe-O (583 cm⁻¹).

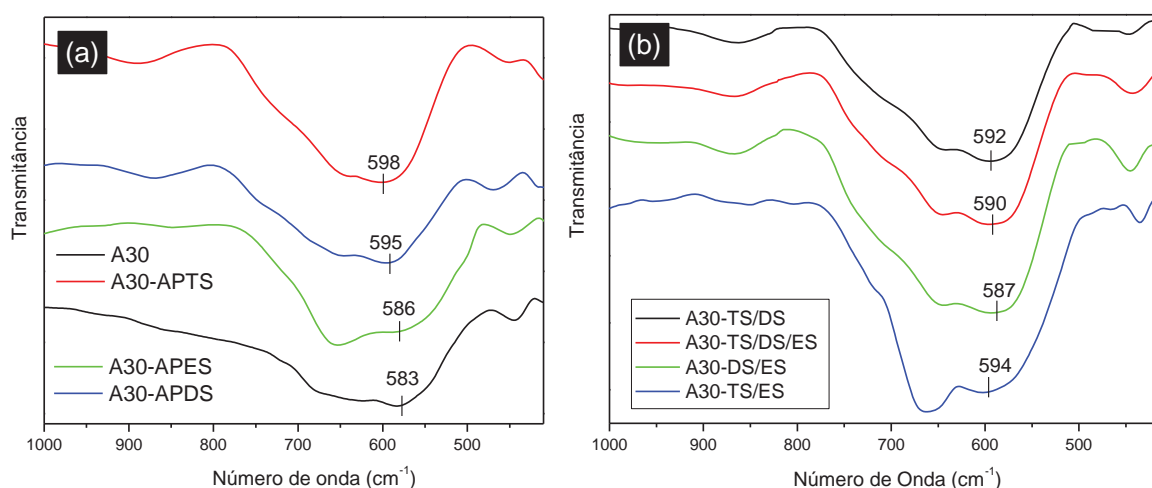


Figura 26. Espectros de absorção na região do infravermelho das amostras: (a) A30-APTS, A30-APDS, A30-APES e (b) A30-TS/DS, A30-TS/DS/ES, A30-DS/ES, A30-TS/ES.

A amostra A30 (sem alcoxisilano) apresentou a banda de estiramento da ligação Fe-O em 583 cm^{-1} , enquanto que as demais amostras apresentaram frequência de: A30-APTS = 598 cm^{-1} , A30-(APDS) = 595 cm^{-1} , A30-(TS/ES) = 594 cm^{-1} , A30-(TS/DS) = 592 cm^{-1} , A30-(TS/DS/ES) = 590 cm^{-1} , A30-(DS/ES) = 587 cm^{-1} e A30-(APES) = 586 cm^{-1} . Este deslocamento para valores maiores de frequência é atribuído à substituição de ligações Fe-O-H por Fe-O-Si(O)_n-R na superfície das NPs. A maior eletronegatividade do grupo -Si(O)-₂- em relação ao -H causa o aumento da constante de força de ligação Fe-O, deslocando a banda de absorção para valores maiores de frequência⁹⁹. A Figura 27 mostra possíveis condensações dos alcoxisilanos sobre a superfície das NPs, podendo se verificar o porquê de a amostra com APTS apresentar maior deslocamento comparado com o APDS e o APES. Entretanto, existem outras possíveis conformações de adsorção: (i) ligação na superfície via grupo amino protonado; (ii) ligação na superfície via grupo amino protonado e condensação do grupo silanol; (iii) ligação na superfície via condensação do grupo silanol¹⁰⁰. Segundo Quinton, *et al*¹⁰¹, com estudos cinéticos de adsorção de APTS em superfícies de óxido de ferro, observou-se que a orientação do APTS na superfície do óxido varia com o tempo, indicando que a estrutura do filme de APTS varia durante a adsorção a partir da fase líquida.

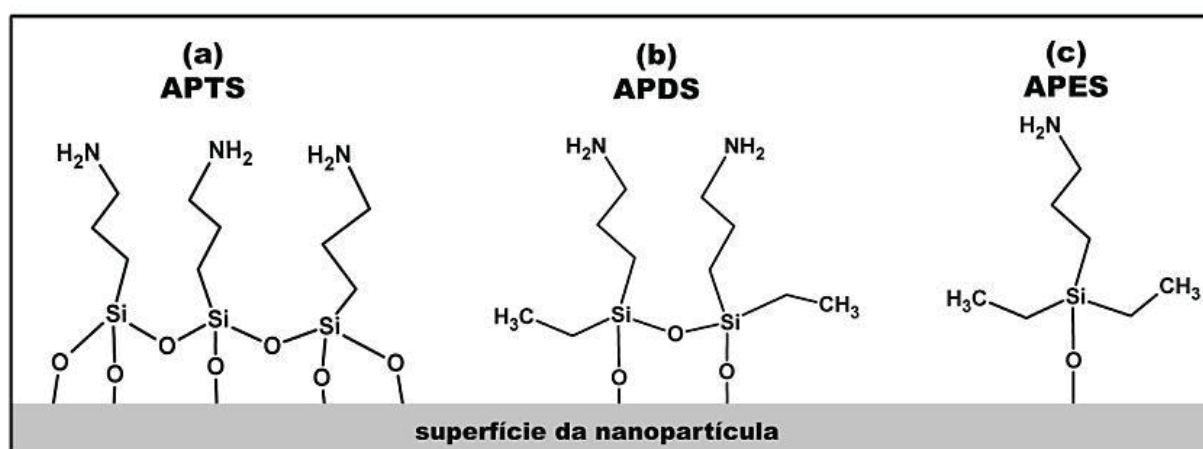


Figura 27. Modelo de possíveis conformações de adsorção dos alcoxisilanos sobre a superfície das nanopartículas; (a) 3-aminopropil-trietóxisilano (APTS), (b) 3-aminopropil-etil-dietóxisilano (APDS) e (c) 3-aminopropil-dietil-etóxisilano (APES).

IV.2.c. Densidade de amina das nanopartículas sintetizadas

As Figuras 28 e 29 mostram um esquema do processo de quantificação de amina livre na superfície das nanopartículas sintetizadas.

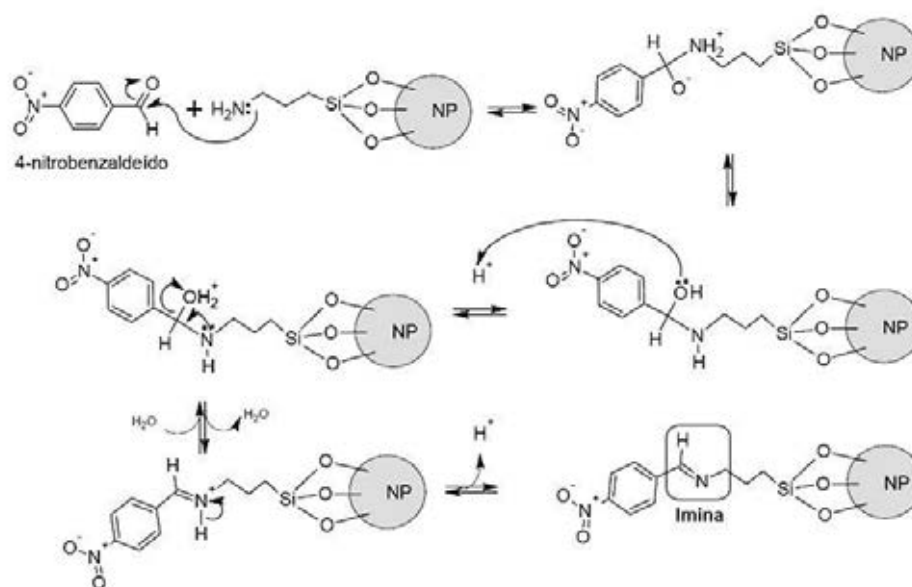


Figura 28. Esquema mecânico da reação entre benzaldeído e amina para a formação de imina na superfície de NP funcionalizadas com alcoxissilanos⁷².

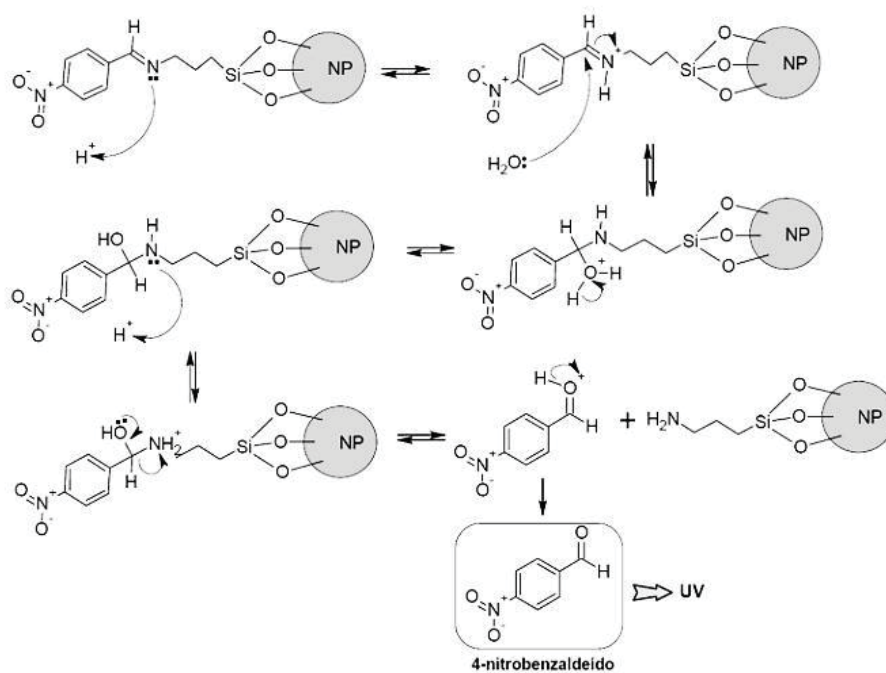


Figura 29. Esquema mecânico da reação de hidrólise da ligação imina⁷².

Os valores obtidos para a densidade de grupos amina na superfície das NPs das diferentes amostras estão listados na Tabela VII. Pode-se constatar o decréscimo da densidade de grupos amina para as amostras A30-APTS>A30-APDS>A30-APES, nas quais estão presentes apenas os alcóxissilanos sem mistura (APTS>ATDS>ATES). Esse decréscimo foi interpretado observando a Figura 28, no qual se verifica a influência do número de grupos alcóxidos hidrolisáveis dos reagentes na densidade de grupos amina. Este resultado pode ser decorrente da inserção do grupo etila das moléculas de APDS e APES, que, por meio de impedimento estérico, pode ter impedido a policondensação dos grupos alcóxidos.

Tabela VII. Densidade de grupos amina na superfície das nanopartículas sintetizadas.

Amostras	(APTS)	(APDS)	(APES)	Densidade de amina ($\mu\text{mol.mg}^{-1}$)
A30	-	-	-	-
A30-APTS	+	-	-	8,72 \pm 0,0748
A30-(TS/DS)	+	+	-	8,69 \pm 0,0896
A30-(TS/DS/ES)	+	+	+	4,69 \pm 0,0675
A30-(DS/ES)	-	+	+	1,80 \pm 0,1744
A30-(APES)	-	-	+	2,28 \pm 0,0779
A30-(APDS)	-	+	-	3,20 \pm 0,0860
A30-(TS/ES)	+	-	+	16,96 \pm 0,1238

As amostras A30-(DS/ES) e A30-(TS/ES) apresentaram a menor e a maior densidade de grupos amina, respectivamente. Portanto, com a investigação do uso de diferentes alcóxidos utilizando o planejamento fatorial, pode-se controlar a densidade do grupo amina na superfície de SPIO. O controle da densidade de grupos funcionais na superfície de nanopartículas torna-se uma etapa importante para posterior funcionalização com agentes específicos. Como o objetivo proposto foi investigar a influência da quantidade de grupos etila, das moléculas de APDS e APES, na superfície das nanopartículas, limitou-se a estudar

as modificações de superfície apenas com os alcoxissilanos APTS, APDS e APES, sem nenhum tipo de mistura.

IV.2.d. Microscopia eletrônica de transmissão

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de óxido de ferro modificadas com APTS, APDS e APES estão na Figura 30. Pode-se observar que a morfologia e o tamanho das nanopartículas dos óxidos de ferro não sofreram modificação com a adição dos alcoxissilanos.

Pelas análises de microscopia eletrônica de transmissão, observa-se que as amostras de A30-APDS e A30-APES apresentaram menor aglomeração em relação às amostras A30 e A30-APTS. A inserção de um grupo etila na molécula de APDS ou de dois grupos etilas na molécula APES proporcionou um impedimento de maior aglomeração, entretanto as moléculas APDS e APES não foram capazes de impedir o processo de agregação.

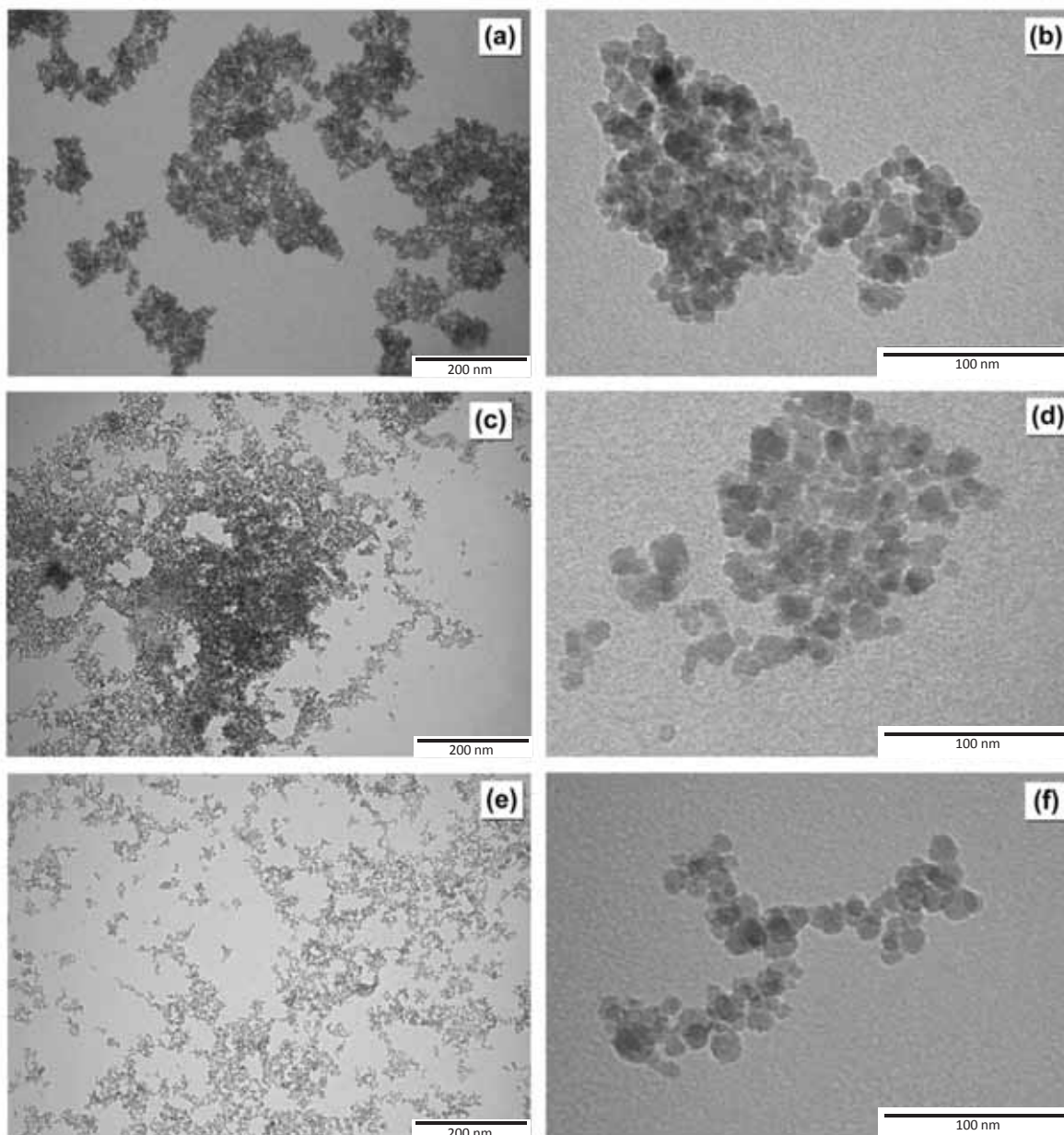


Figura 30. Microscopia eletrônica de transmissão da modificação de superfície com os alcóxissilanos, (a,b) A30-APTS, (c,d) A30-APDS e (e,f) A30-APES. As barras nas micrografias representam 500 nm (esquerda) e 100 nm (direita).

IV.2.e. Propriedades magnéticas – Magnetização vs. Temperatura

A Figura 31 mostra a curva de dependência da magnetização com a temperatura (resfriada sem campo e com campo magnético, ZFC e FC, respectivamente). O valor máximo de temperatura da curva ZFC define a temperatura de bloqueio (T_B), na qual a energia térmica se torna comparável à barreira energética de anisotropia magnética (energia necessária para se manter uma orientação de domínio magnético). Acima da temperatura de bloqueio, as

nanopartículas apresentam a propriedade de superparamagnetismo, as quais, devido aos seus pequenos tamanhos, tornam-se termicamente instáveis, isto é, como o volume das pequenas partículas é menor do que o tamanho do domínio crítico, a proximidade de muitas paredes de monodomínio em um pequeno volume (na escala de nanômetros) não é energeticamente estável¹⁰². É conhecido que a T_B de nanopartículas magnéticas depende do tamanho e da distribuição de tamanho, do estado de superfície e das interações mútuas das NP magnéticas, de acordo com a equação 6¹⁴:

$$T_B = \frac{K_{eff}V}{25 k_B} \quad (Eq. 6)$$

com K_{eff} sendo a constante de anisotropia magnética efetiva, V é o volume da partícula e k_B é a constante de Boltzmann.

As temperaturas de bloqueio para as amostras A30, A30-APES, A30-APDS e A30-APTS foram 120, 140, 170 e 190 K, respectivamente, nas quais se pode observar a influência dos diferentes alcoxissilanos nas medidas. As mudanças na T_B mostram os efeitos das interações interpartículas, as quais tendem a aumentar as barreiras de energia. Este aumento pode ser originado a partir de anisotropia intrínseca das partículas (forma, tamanho, magnetocristalino, etc.) ou interações interpartículas (dipolar ou de troca). Já que esses dois mecanismos contribuem para modificar a barreira de energia, é difícil separar ambos os tipos de efeitos¹⁰³. Sendo assim, como foi realizado o mesmo procedimento para a obtenção das NP magnéticas, o deslocamento da T_B para valores maiores pode ser atribuído à adição dos alcoxissilanos ao sistema. Entretanto, este deslocamento de T_B não é devido à propriedade paramagnética dos alcoxissilanos, mas à formação de agregados no sistema, como observado pelas micrografias. A formação de agregados altera a distribuição de tamanho das partículas e o volume magnético, propriedades que influenciam diretamente as medidas de ZFC/FC. Portanto, a presença de um grupo etila na molécula de APDS e de dois grupos etilas na

molécula APES acarretou um maior e um menor deslocamento da TB com relação às amostras sem e com APTS..

A formação de grandes agregados também pode ser verificada pelas curvas na forma de “y” das amostras da Figura 31. Observa-se que abaixo da T_B a magnetização diminui para ZFC, enquanto que para a curva FC, a magnetização aumenta. Esse comportamento normalmente é atribuído às interações interpartículas com um significativo grau de aglomeração¹⁰⁴.

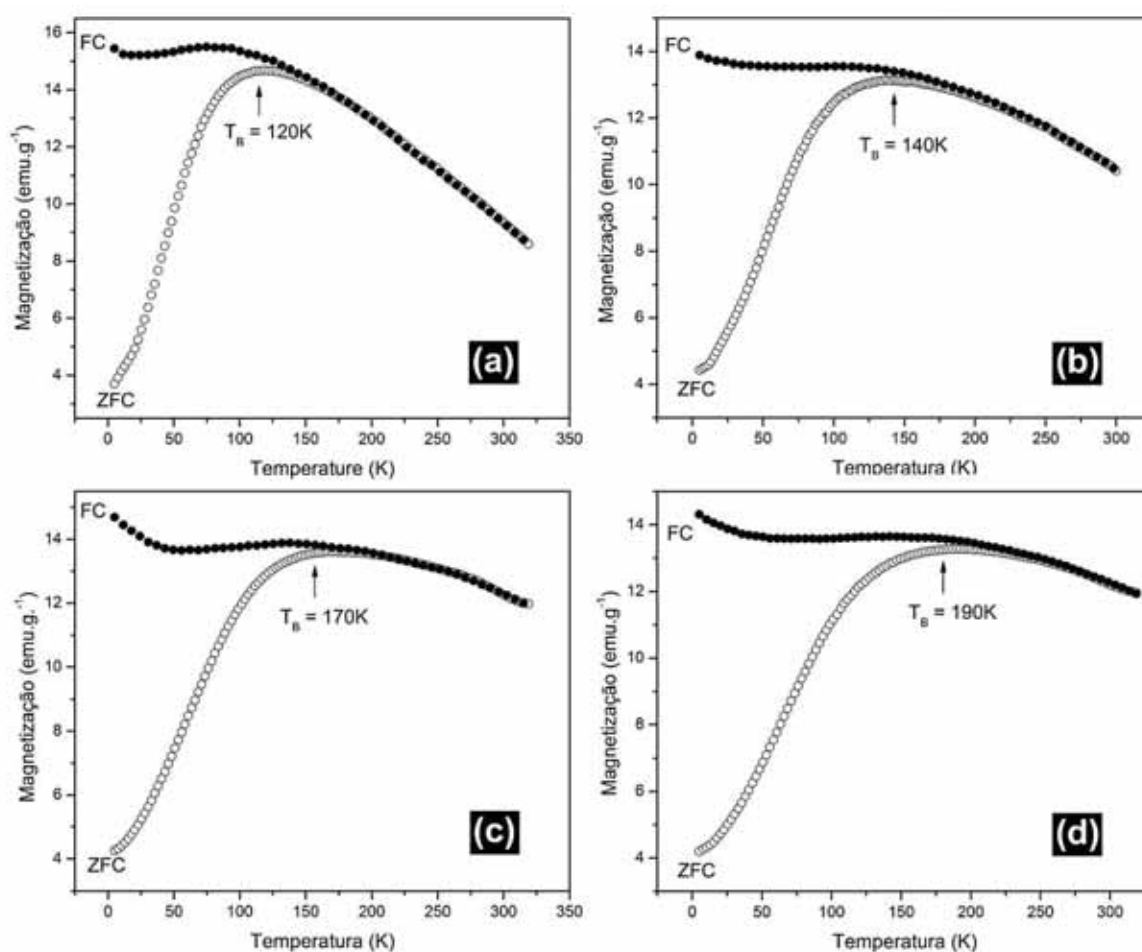


Figura 31. Medidas de Magnetização ZFC-FC, (a) A30, (b) A30-APES, (c) A30-APDS e (d) A30-APTS.

IV.2.f. Propriedades magnéticas – Magnetização vs. Campo Magnético

A Figura 32 mostra as curvas de magnetização vs. o campo magnético para as amostras A30, A30-APES, A30-APDS e A30-APTS. As curvas de magnetização para as amostras sem e com alcoxissilanos apresentaram típico comportamento superparamagnético a

300 K (acima da T_B). Como verificado pela medida de ZFC/FC, as NP apresentaram “loop” de histerese em temperaturas abaixo da T_B . Esse resultado pode ser ressaltado pelos gráficos M vs baixo H inseridos ao lado direito de cada gráfico; verificou-se, ainda, que a magnetização de saturação diminui com o aumento da temperatura.

As magnetização de saturação para as amostras A30, A30-APTS, A30-APDS e A30-APES foram 78,83, 63,74, 64,08 e 67,16 emu.g^{-1} , respectivamente. Esses resultados estão de acordo com a literatura para magnetita obtida via coprecipitação em meio alcalino. Verificou-se que as amostras com a presença de alcoxissilanos apresentaram menor magnetização de saturação devido à presença de um material não magnético, a sílica, que justifica o menor volume magnético das NPs.

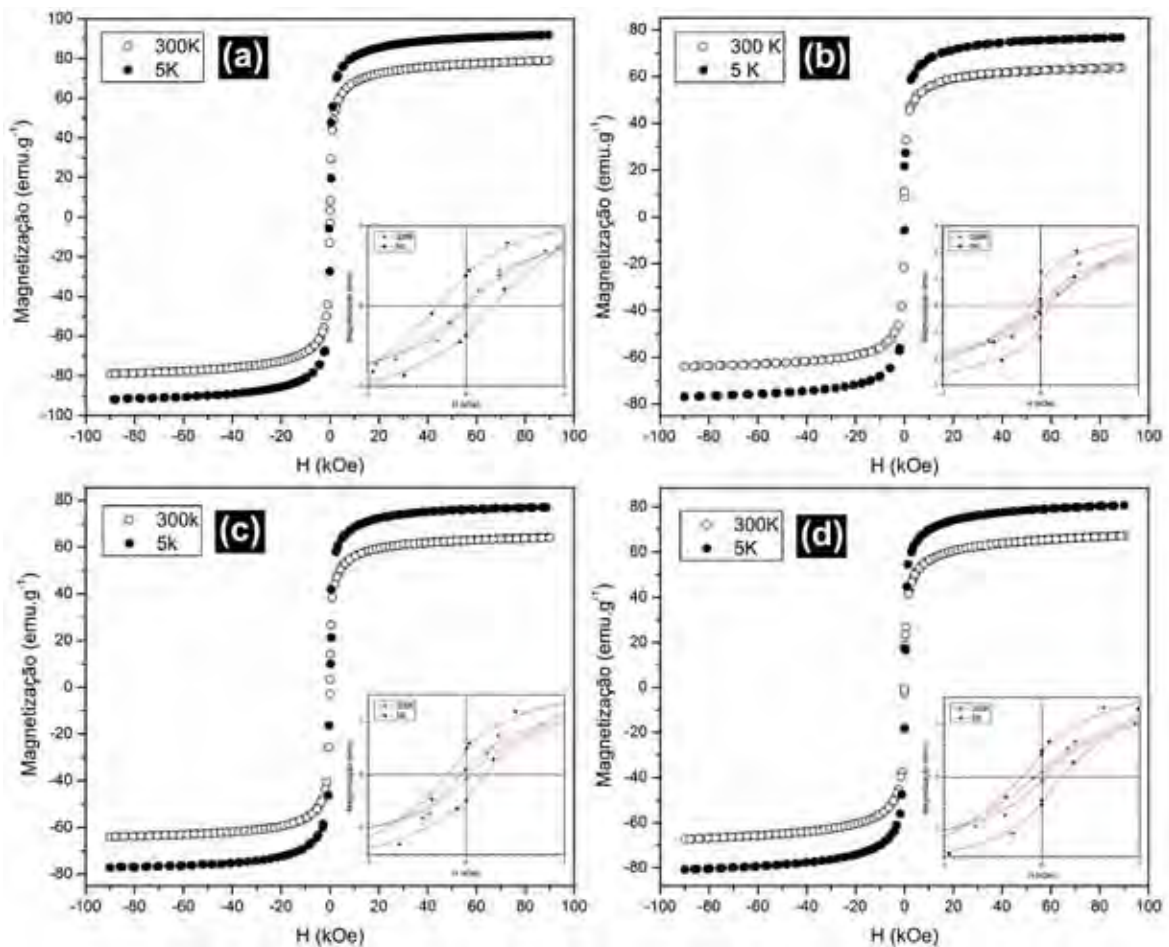


Figura 32. Curvas de Magnetização vs Campo Magnético: (a) A30, (b) A30-APES, (c) A30-APDS e (d) A30-APTS. Inserida ao lado direito de cada imagem tem-se a mesma medida de magnetização, contudo numa escala de baixo campo magnético.

IV.2.g. Estudo das propriedades coloidais dos óxidos magnéticos sintetizados

IV.2.g.i Mobilidade microeletroforética

A Figura 33 apresenta a variação dos valores de potencial zeta (ζ) em função do pH para as amostras sintetizadas. O potencial zeta é obtido pela equação de Henry, com aproximação de Smoluchowski, por meio da medida da mobilidade eletroforética em sistemas aquosos⁸⁸. Analisando as medidas eletroforéticas das amostras, pôde-se verificar que as amostras com silanos, quando submetidas à variação do pH de 3 a 12 e força iônica ajustada em $1 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ de NaCl, apresentaram comportamento eletroforético diferente da amostra sem silano, indicando a modificação superficial das amostras sintetizadas.

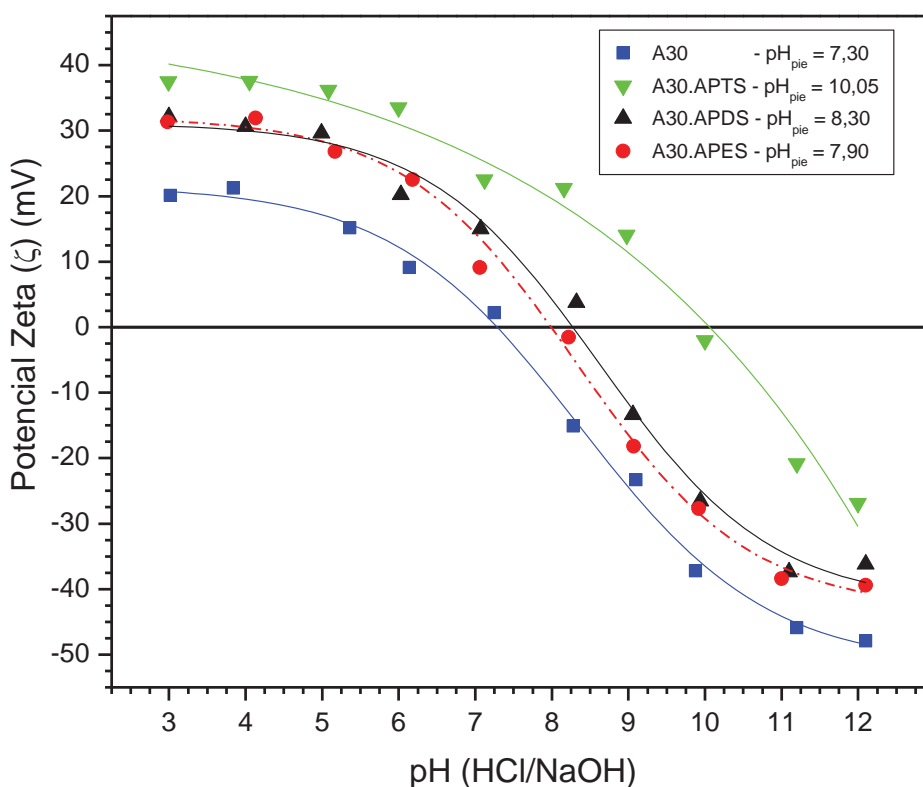


Figura 33. Curva do potencial zeta (ζ) em função do pH para as amostras sem e com modificação com os alcóxissilanos. Força iônica ajustada em $1 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ de NaCl

Conforme as medidas experimentais, os pH_{pie} (pH do ponto isoelétrico) para as amostras A30, A30-APES, A30-APDS e A30-APTS foram 7,30, 7,90, 8,30 e 10,05,

respectivamente. Em contato com água, ocorre a adsorção de cargas na superfície de materiais dielétricos devido à adsorção de íons H_3O^+ e OH^- , os quais determinam a magnitude do potencial de superfície. O ponto isoelétrico é quando a quantidade de cargas positivas é igual à quantidade de cargas negativas da superfície ($\text{pie} \rightarrow \sigma_+ = \sigma_-$)^{88,105,106}. O pH_{pie} de óxidos de ferro sintético foi determinado por diferentes métodos entre 5 e 8^{105,107}. Para a magnetita, utilizando como eletrólito o NaCl, o $\text{pH}_{\text{pie}} \approx 7,30$ é significativamente maior do que o pH_{pie} por volta de 6,0 determinado a partir de medidas de mobilidade eletroforética, usando o eletrólito NaClO_4 ¹⁰⁵, ou o pH_{pie} de 6,3 medidos em soluções de NaNO_3 ¹⁰⁸.

Analisando as medidas eletroforéticas das amostras, pôde-se verificar que as amostras A30-APES e A30-APDS apresentaram comportamento similar quando submetidas à variação do pH de 3 a 12, contudo diferente da amostra A30-APTS. Esse diferente comportamento está de acordo com os diferentes valores da densidade do grupo amina das amostras. A Tabela VIII mostra os valores do pH_{pie} encontrados na literatura para os grupos silanol, amina e óxidos de ferro magnético – e os experimentais das amostras. Para a amostra A30-APTS verificou-se que o valor do pH_{pie} encontra-se de acordo com a literatura¹⁰⁸. Entretanto, para as amostras com APDS e APES verificaram-se diferentes valores pH_{pie} ; essa diferença pode estar relacionada com o mecanismo oscilatório dos alcóxissilanos em superfície dielétricas. Segundo Xu *et al*¹⁰⁹, a condensação de silanos sobre a superfície das NP pode gerar o grupo amina livre, o grupo amina ligado com a superfície por meio da ligação hidrogênio e/ou grupo amino protonado ligado à superfície, gerando grupos silanos livres (Figura 34). Outra possibilidade para o deslocamento do pH_{pie} das amostras contendo APDS e APES pode estar correlacionada à inserção do grupo etila. Este, através de impedimento estérico, pode diminuir a interação dos silanos sobre a superfície, causando, assim, a diminuição da eficiência do recobrimento.

Tabela VIII. Valores do pH do PIE teóricos dos grupos silanol, amina e óxidos de ferro magnético; e os experimentais das amostras.

Teórico			Experimental		
	PIE aproximado	Polaridade de carga em pH 12	Amostras	pH _{pie}	Densidade de amina
Grupo silanol	3-4*	Negativo	A30	7,30	-
Grupo amina	10-11**	Negativo	A30-APES	7,90	2,28
Fe ₃ O ₄	5-8***	Negativo	A30-APDS	8,30	3,20
γ-Fe ₂ O ₃	6,6****	Negativo	A30-APTS	10,05	8,78

* 110 , **110 , *** 111 , **** 10

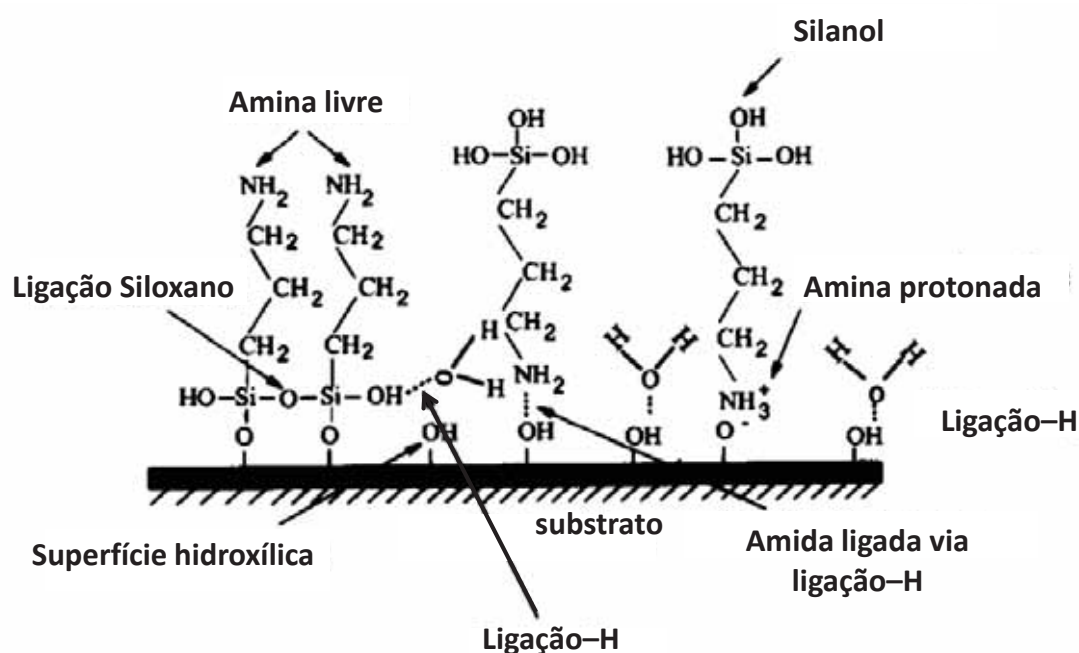


Figura 34. Representação esquemática das possíveis conformações da condensação de alcoxilanos sobre a superfície das NPs¹⁰⁹.

IV.2.g.ii Medidas de espalhamento de luz dinâmico

A Figura 35 mostra o comportamento do diâmetro hidrodinâmico com o tempo em soluções hexametáfosfato de sódio e cloreto de sódio. Pode-se observar que as amostras dispersas em solução de hexametáfosfato de sódio apresentaram-se estáveis no período de 1

hora, devido ao hexametáfosfato ser um agente dispersante utilizado com sucesso em análises de distribuição de tamanho em medidas de DLS. Entretanto, para as medidas com eletrólitos, verificou-se a formação de agregados, sendo que a amostra A30 apresentou a menor estabilidade.

Quando se adiciona uma solução de eletrólito a uma dispersão, inicia-se o processo de agregação pela supressão da dupla camada elétrica entre as partículas. De acordo com a teoria de estabilidade coloidal de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO)^{88,106}, a espessura da repulsão da dupla-camada elétrica diminui com o aumento da concentração de um eletrólito. A barreira de repulsão (energia) é que indica se, após a colisão de duas partículas, ocorrerá à agregação ou não. O tamanho da barreira de repulsão, a qual estabiliza uma suspensão coloidal, depende da natureza da superfície^{88,106}. No caso deste trabalho, como a suspensão pode ser estabilizada eletrostaticamente, a barreira depende da magnitude da carga na superfície e da extensão da dupla camada elétrica ao redor das partículas, a qual, em troca, depende da concentração total do eletrólito⁸⁸. Portanto, a formação de agregados foi maior para a amostra A30 devido à menor magnitude de sua carga na superfície, $\zeta = 5,85$ e $\zeta = -2,72$ mV para as soluções de $1,00 \times 10^{-3}$ e $0,15$ mol L⁻¹ de NaCl, respectivamente.

Segundo a teoria DLVO, quando uma superfície carregada possui energia de repulsão maior que as forças atrativas de van der Waals, o sistema tenderá a permanecer estável^{88,106}. Esse fenômeno pode ser observado quando se comparam as Figuras 37(a) e 37(b), podendo-se observar uma menor agregação para a suspensão, contendo uma densidade de carga maior, como na amostra A30-APTS. Contudo, esse comportamento não é observado nas amostras A30-APDS e A30-APES. Nessas amostras, verificaram-se menores potenciais de superfície quando comparadas com a amostra A30-APTS, porém aquelas apresentaram um comportamento mais estável com menor formação de agregados, o que também foi verificado pela medidas de ZFC/FC e MET. Os grupos etila presentes nas moléculas do APDS e APES

foram os responsáveis por proporcionar uma estabilização estérica nas suspensões, gerando um sistema eletroestérico, o qual possui maior estabilidade quando comparado apenas com a estabilidade eletrostática ou estérica^{88,106}. Baseados nesses argumentos de estabilidade coloidal, a Figura 36 representa um esquema mostrando diferentes superfícies proporcionadas pelos alcoxissilanos.

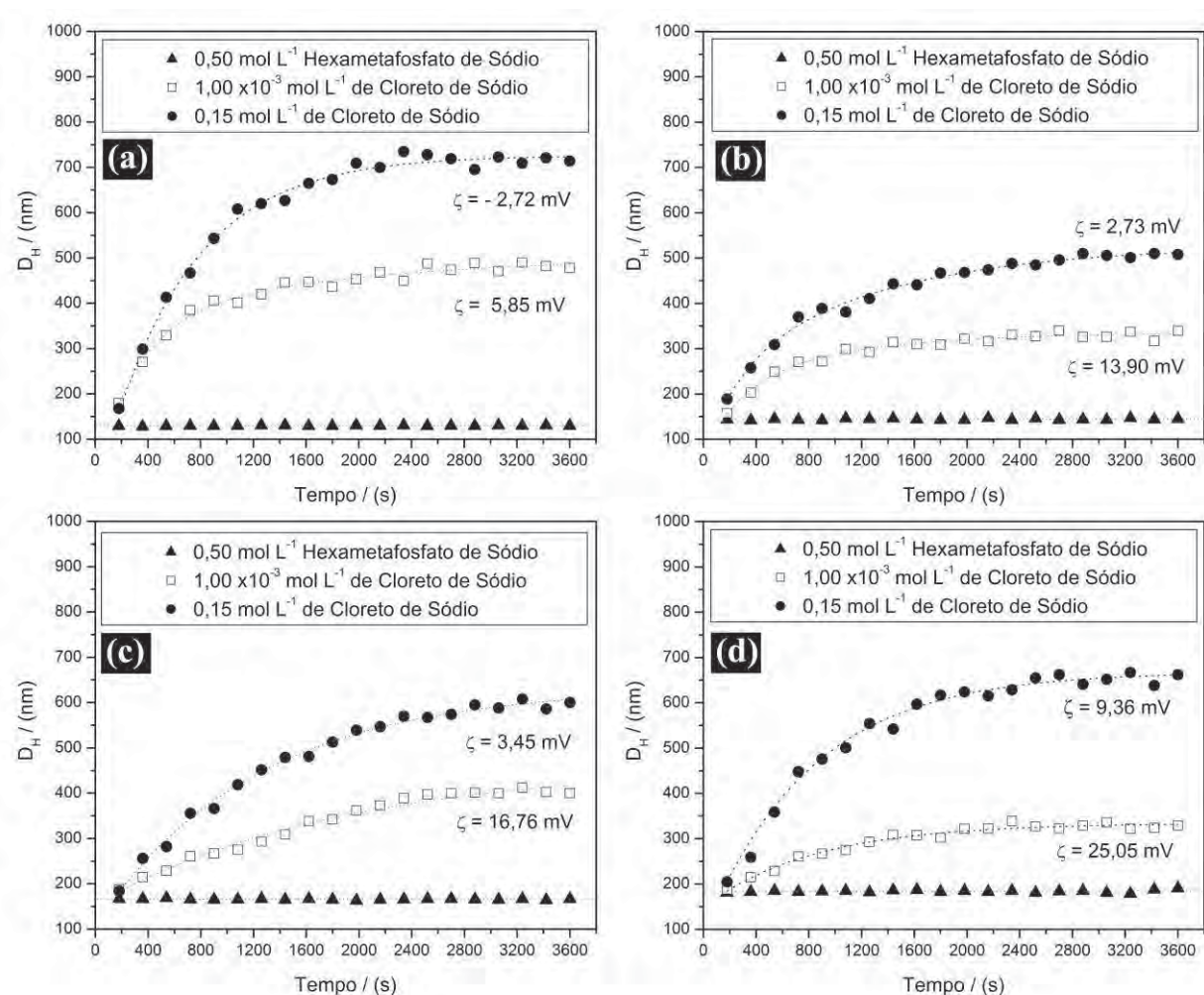


Figura 35. Diâmetro hidrodinâmico das amostras medidas por DLS vs. tempo, (a) A30, (b) A30-APES, (c) A30-APDS e (d) A30-APTS.

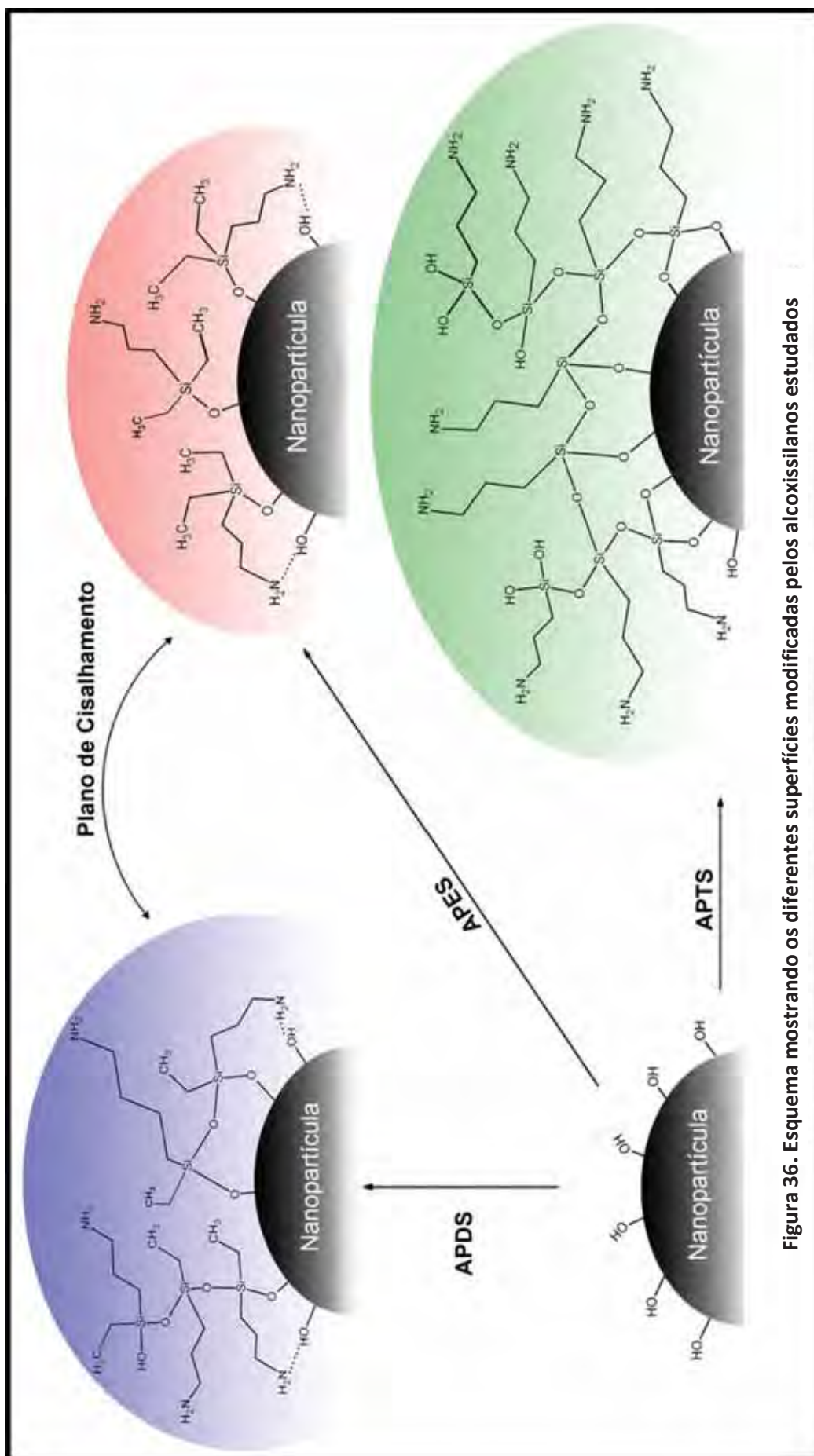


Figura 36. Esquema mostrando os diferentes superfícies modificadas pelos alcossilanos estudados

IV.3. FUNCIONALIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS COM ÁCIDO FÓLICO

As aplicações de imagem por ressonância magnética (IRM) e liberação controlada de fármacos (LCF) 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 nanopartículas¹¹². O ácido fólico (AF) é reconhecido como um efetivo agente alvo para tumor. Os receptores folatos 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 neuroendócrinos¹¹³⁻¹¹⁵. A Figura 37 mostra a estrutura molecular do ácido fólico.

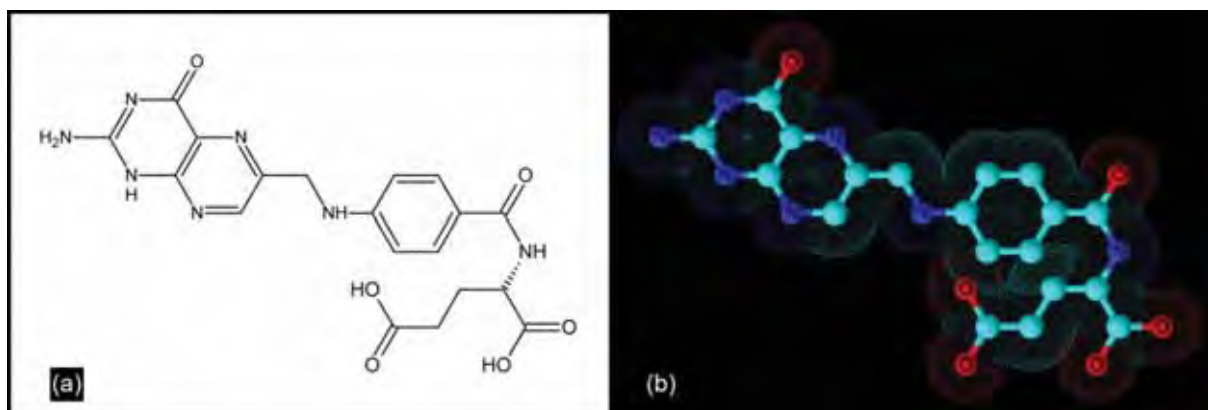
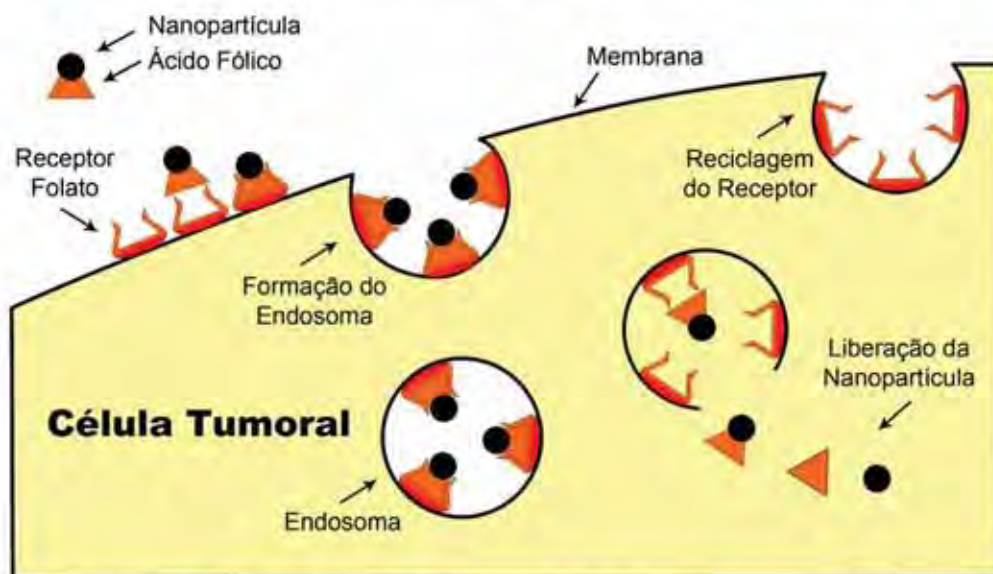


Figura 37. Estrutura molecular do ácido fólico. Software ACD/3d Viewe – ChemSketch.

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 alvo¹¹⁵. A Figura 38 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 tráfico 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 célula¹¹⁶. As moléculas do ácido fólico podem ser conjugadas na superfície das nanopartículas via adsorção física¹¹⁷, ligação iônica¹¹⁸ e ligação covalente^{119,120}. 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 peptídica¹²¹. 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 cancerígenas¹¹².

Endocitose Mediada pelo Receptor Folato



Wang, S., et al. *Journal of Controlled Release* 53 (1998) 39–48

Figura 38. Representação por diagrama do processo de endocitose mediada pelo receptor folato¹¹⁶.

IV.3.a. Formação de amida usando carbodiimida como agente de acoplamento

A funcionalidade das amidas é uma característica comum em pequenas ou complexas moléculas sintéticas ou naturais. Existem diferentes formas de acoplamento reativo dos derivados carboxílicos com uma amina, para formar uma ligação amida. Este acoplamento pode ser via haletos de acila, azidas de acila, carbodiimida, ésteres, etc¹²¹. Diferentes tipos de carbodiimidas são empregados na formação da ligação amida, sendo que a escolha dependerá da natureza do ácido carboxílico e da amina. Os agentes de acoplamento mais utilizados são o dicitlohexil carbodiimida (DCC), diisopropil carbodiimida (DIC) e 1-etil-3-(3'-dimetilamino) carbodiimida (EDC)¹²¹. Neste trabalho, utilizou-se o EDC devido à sua solubilidade em meio aquoso.

A carbodiimida (DIC) (2) reage com o ácido carboxílico do ácido fólico (1) para formar o anidrido misto O-acilisourea (3), conforme mostrado no esquema da Figura 39(a). A molécula de O-acilisourea pode sofrer racemização e formar o N-acilureia (4), o

qual é estável e, se formado, impede a formação da ligação amida. Esta reação colateral pode ser diminuída pela adição de um agente nucleofílico, como, por exemplo, o N-hidroxisuccinimida (**5**). A N-hidroxisuccinimida reage com O-acilisourea, formado um éster intermediário ativo (**6**) e um subproduto da ureia, o diisopropilureia (**7**)¹²¹. Neste trabalho, optou-se em realizar a síntese via reagente EDC (**11**) devido à sua solubilidade em água, o qual gera como subproduto da ureia o (dimetilamino) propil-3-etilureia (**12**) (Figura 39(b)). O éster (**6**) formado é um intermediário suficientemente ativo para acoplar com a amina na superfície das nanopartículas (**8**), formando a ligação amida.

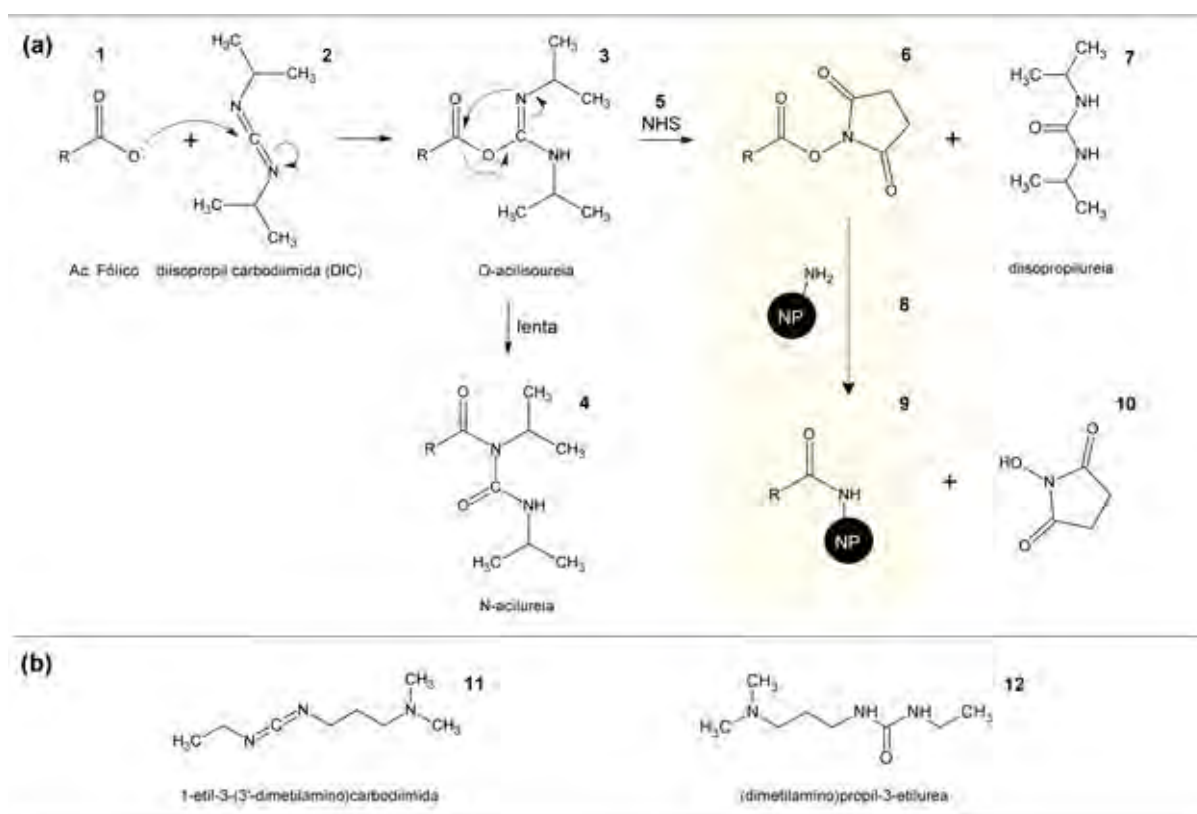


Figura 39. Esquema mecanístico representando a formação da ligação amida entre a molécula de ácido fólico e amina da superfície das nanopartículas (a)¹²¹. Carbodiimida solúvel em meio aquoso, EDC, e seu sub-produto da ureia (b).

IV.3.b. Espectrometria no infravermelho

A Figura 40 mostra o espectro no infravermelho das amostras de ácido fólico e da nanopartícula A30/APTS/AF. A análise de um grupo peptídico por meio da técnica de espectroscopia no infravermelho fornece até nove bandas características da ligação amida, as

quais são nomeadas A, B, I, II ... VII. A molécula de ácido fólico, como mostrado na Figura 38, possui as funções amina (primária, secundária e terciária), amida e ácido carboxílico, as quais geram uma sobreposição de bandas, dificultando uma análise mais rígida via técnica no infravermelho. Contudo, de forma qualitativa, a identificação da presença de ácido fólico na superfície das nanopartículas pela técnica no infravermelho pode ser realizada devido à presença das bandas das frequências de vibrações envolvidas na ligação amida I e II, R-C(C=O) e -NH-R₁, respectivamente. As frequências de vibrações do estiramento C=O (1690-1630 cm⁻¹) e a deformação N-H (1620-1550 cm⁻¹) foram observados em todos os espectros, conforme mostrado na Figura 40 e 41. A confirmação da formação ligação amida, ainda, pode ser realizada analisando as áreas das bandas referentes a esta ligação. A Figura 42 mostra a deconvolução gaussiana da região entre 1730-1660 cm⁻¹, em que se pode verificar um aumento de área referente à deformação N-H em todos os espectros quando comparada com a mesma região da amostra contendo o ácido fólico. Esse aumento de área é um indicativo de que o ácido fólico foi conjugado com a superfície das nanopartículas via ligação amida¹²².

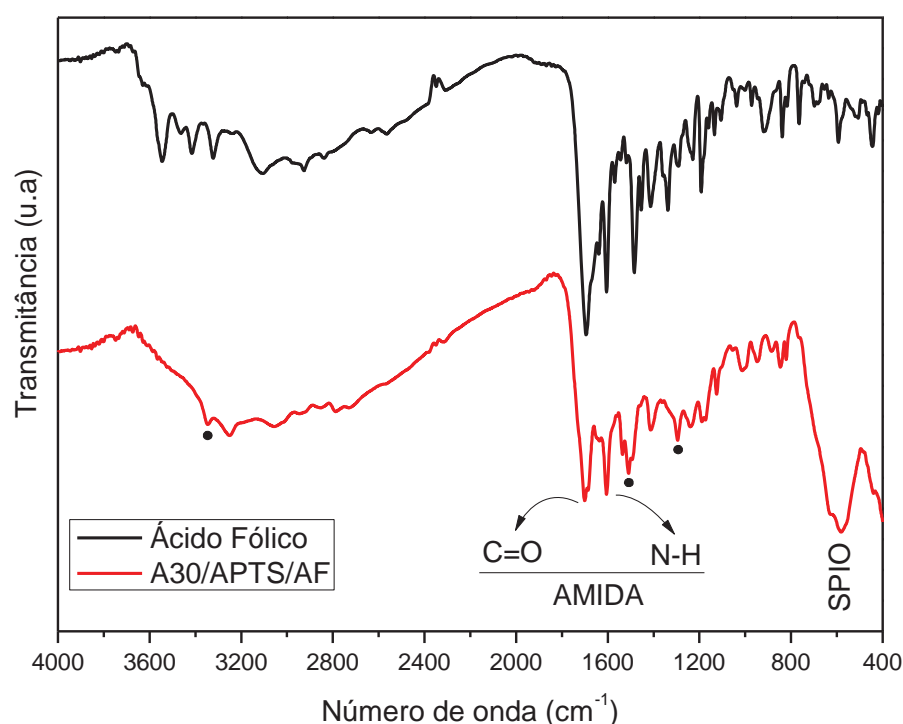


Figura 40. Espectro no infravermelho das amostras de ácido fólico e A30/APTS/AF.

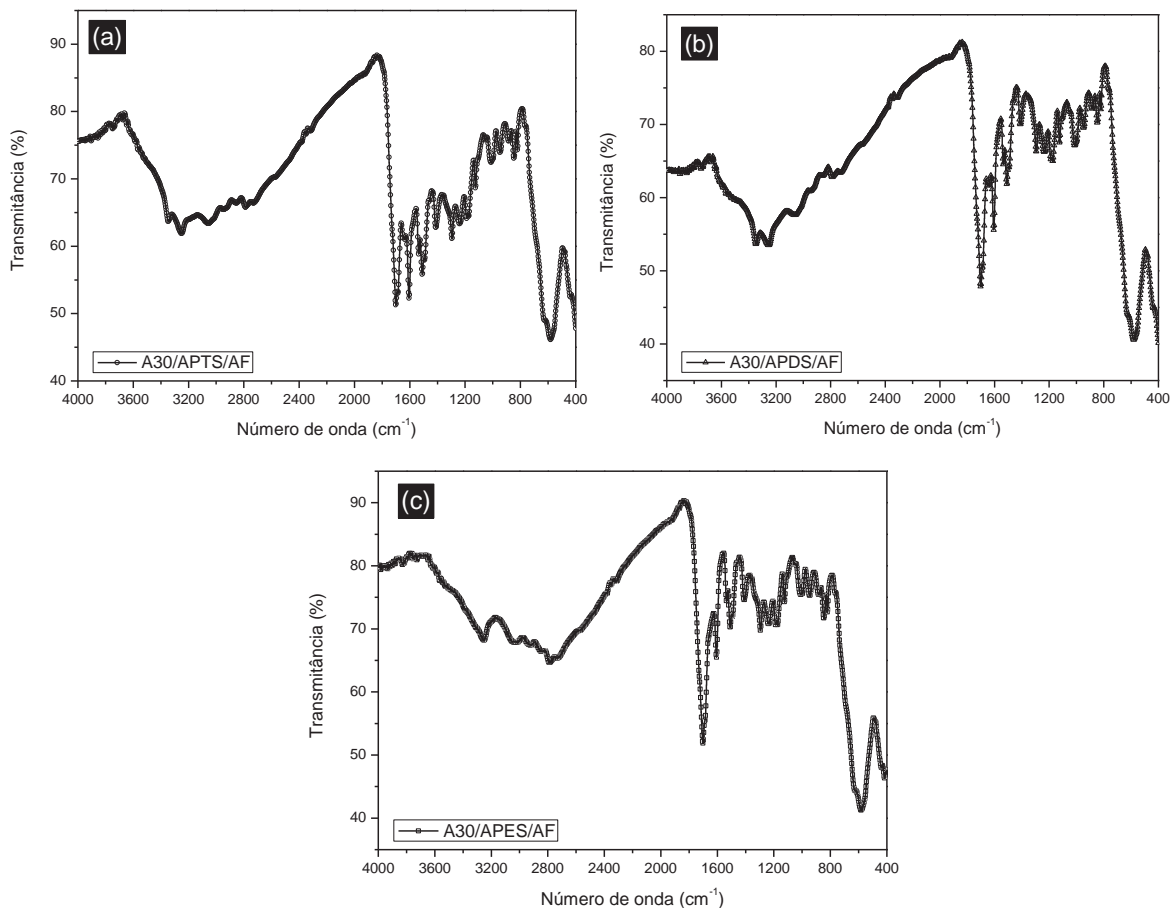


Figura 41. Espectros no infravermelho referentes às amostras A30/APTS/AF (a), A30/APDS/AF (b), e A30/APES/AF (c).

O grupo amida (ligação O=C–N–) geralmente apresenta estrutura planar do tipo *trans* ou *cis*, sendo que a distância de ligação C–N está mais próxima da distância da dupla ligação C=N (127pm) do que da ligação simples C – N (149pm)¹²³. Amidas com estruturas *cis* ou *trans* podem ser distinguidas pela diferença entre as respectivas bandas de absorção na região do infravermelho. Bandas de absorção características indicaram a preferência pela posição *trans*, as quais estão representadas por um círculo em preto na Figura 40⁷². A Tabela IX mostra as frequências de absorção características na região do infravermelho.

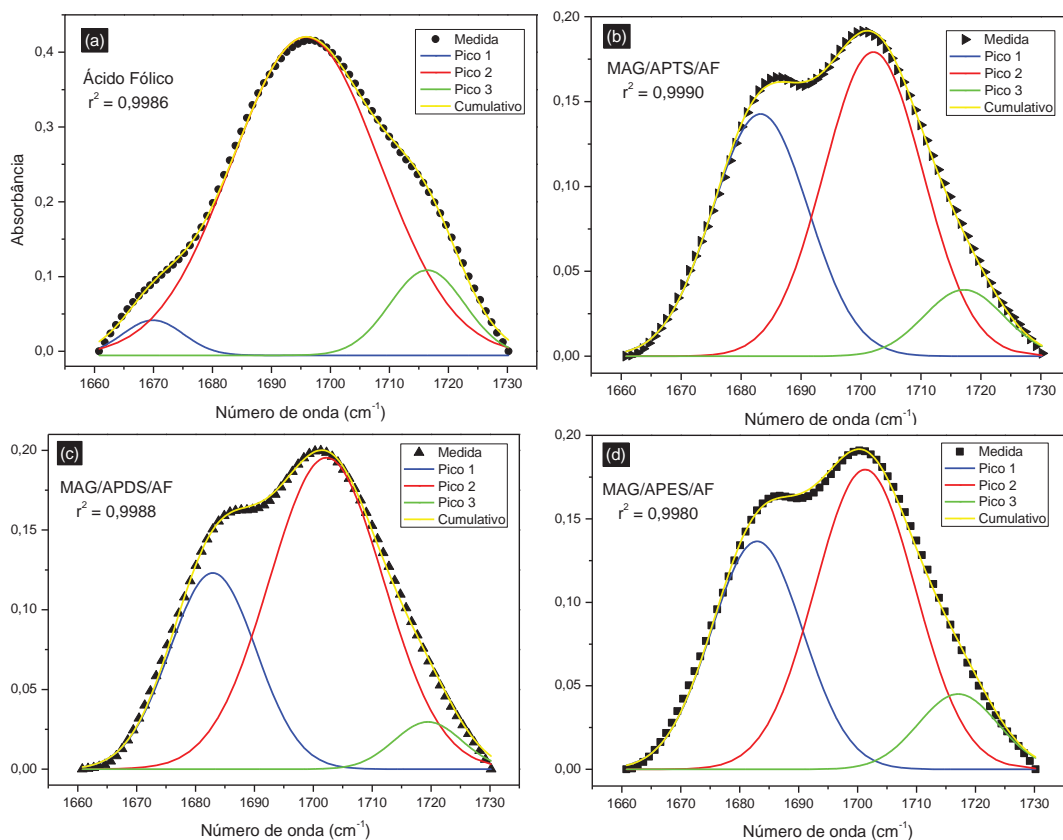


Figura 42. Deconvolução Gaussiana da região entre 1730–1660 cm^{-1} . O pico 1 refere-se ao estiramento C=O da ligação amida, enquanto os pico 2 e 3 referem-se ao estiramento C=O da ligação do ácido carboxílico.

Tabalea IX. Frequências de absorção características na região no infravermelho das amidas¹²⁴.

Modo de vibração	Função	Número de onda (cm^{-1})
<i>Estiramento C=O</i>	Ácido carboxílico	1750 – 1710
<i>Deformação no plano C=O</i>	Ácido carboxílico	1320 - 1210
<i>Estiramento C=O</i>	Amida	1690 – 1630
<i>Deformação N–H</i>	Amida	1620 – 1550
<i>Estiramento N – H</i>	Amida <i>cis</i>	3200
	Amida <i>trans</i>	3300
<i>Estiramento aberto CNH</i>	Amida <i>cis</i>	1350 – 1320
	Amida <i>trans</i>	1300 – 1250
<i>Deformação CNH</i>	Amida <i>cis</i>	1490-1430
	Amida <i>trans</i>	1570-1510
<i>Deformação N–H (aromático)</i>	Amina	1630-1600

IV.3.c. Quantificação de ácido fólico na superfície das nanopartículas

Dados da literatura mostram que aminas aromáticas primárias e secundárias podem reagir com *p*-dimetilamino-cinamaldeído (*p*-DAC) em meio ácido^{125,126}. Neste estudo, como o ácido fólico possui em sua estrutura uma amina aromática secundária, utilizou-se o reagente *p*-DAC para quantificar a concentração de AF na superfície das nanopartículas. A Figura 43 mostra um esquema mecanístico da interação do sistema NP/ALCOXISSILANO/AF com o *p*-DAC. De maneira simplificada, o grupo carbonil do *p*-DAC (**1**) reage com um catalisador ácido, formando o cátion oxônio (**2**), o qual é mais ativo para receber o ataque de um nucleófilo do que o carbono da carbonila. Em seguida, ocorre a adição nucleofílica da amina (**3**) sobre o grupo carbonil eletrofílico do aldeído, formando um hemiaminal (**4**) como intermediário, o qual, na continuação, perde uma molécula de água para conduzir a formação do íon imínio (**5**) e (**6**)^{121,123}.

Observou-se experimentalmente que a reação apenas ocorre na presença do tensoativo dodecil sulfato de sódio (SDS). O efeito de tensoativos na condensação de aldeídos, tal como *p*-DAC, com aminas aromáticas, também tem sido assunto de um número de publicações¹²⁷⁻¹²⁹. Sabe-se que o meio micelar formado por tensoativos é capaz de alterar significativamente o equilíbrio, cinética e propriedades espectrais de reações em que estão envolvidos, e isso tem sido utilizado para melhorar as características dos procedimentos analíticos¹²⁹.

Para a quantificação de ácido fólico na superfície das nanopartículas, realizou-se a construção da curva analítica (Figura 44) na faixa de concentração de 2×10^{-5} a 2×10^{-3} , determinado os valores das figuras de mérito, tais como, comprimento de onda de absorção (533 nm), coeficiente linear (-0,0077), coeficiente angular (38,7318) e o coeficiente de correlação linear ($R = 0,9969$). A Tabela X mostra os valores de AF obtidos para as amostras estudadas. Verificou-se que a densidade de ácido fólico na superfície das nanopartículas está

de acordo com os valores da densidade de amina referente aos alcoxissilanos. Considerando-se essa densidade de amina na superfície das nanopartículas, obtidas conforme item IV.2.c, como sendo a quantidade de aminas disponíveis para interagir com o AF e formar a ligação amida, o rendimento para a síntese foi de 59,98, 63,75 e 79,39% para as nanopartículas modificadas com o APTS, APDS, e APES, respectivamente. Essa diferença de rendimento está correlacionada com as diversas superfícies proporcionadas pelos diferentes alcoxissilanos, como mostrada na Figura 36.

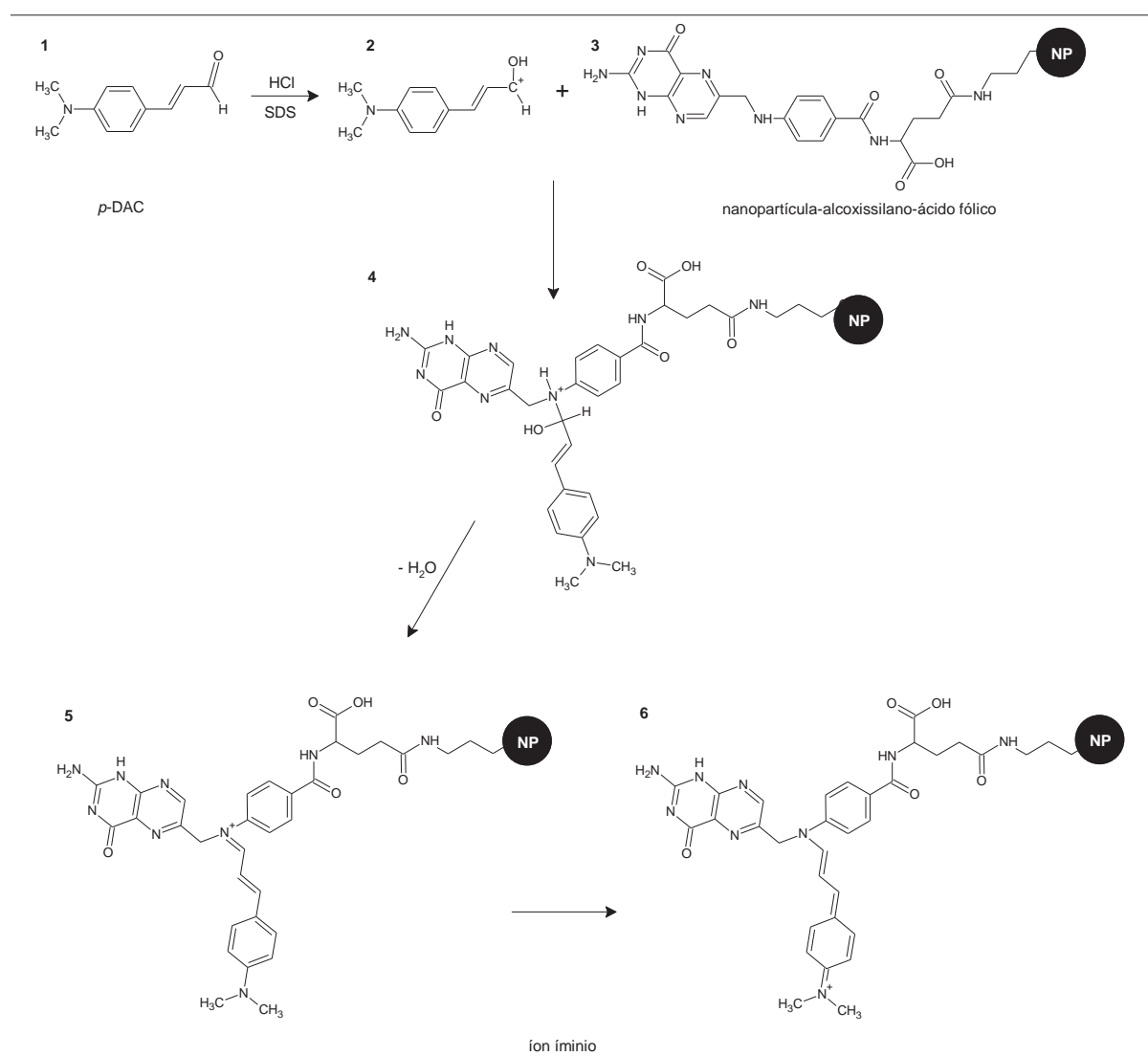


Figura 43. Esquema mecânico para reação entre o p-DAC e o NP/ALCOXISSILANO/AF.

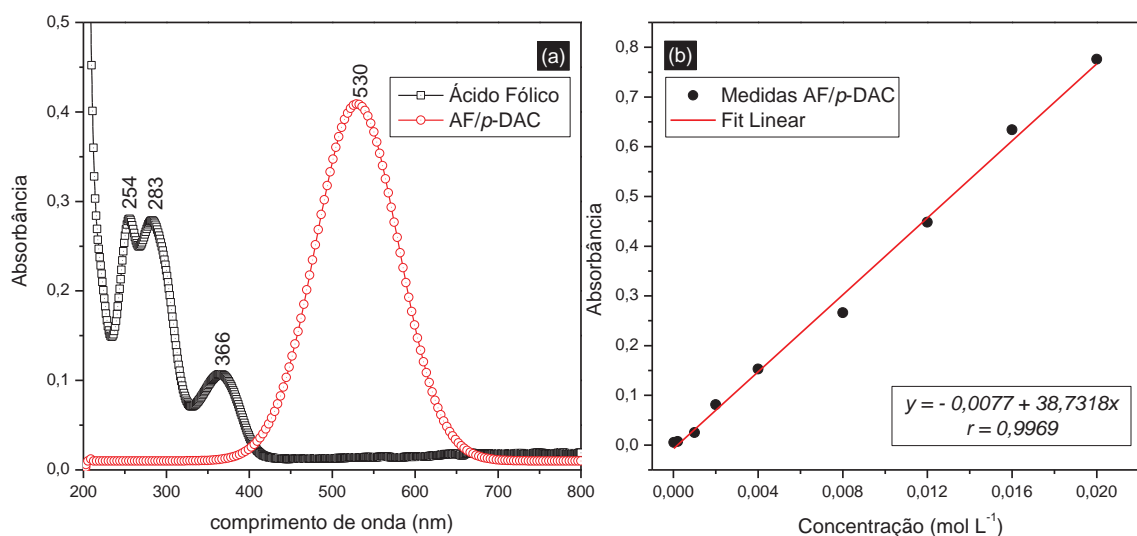


Figura 44. Espectros de absorção na região do UV-Vis (a) e a curva analítica do AF/p-DAC (b)

Tabela X. Resultados da quantificação de ácido fólico na superfície de SPIO.

Amostras	Densidade / ($\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1}$)	
	Amina-Alcoxissilanos	Ácido Fólico
A30/APTS/AF	8,72	5,23
A30/APDS/AF	3,20	2,04
A30/APES/AF	2,28	1,81

IV.3.d. Medidas de mobilidade eletroforética e raio hidrodinâmico

A Figura 45 mostra o potencial zeta em função do pH para as amostras A30, A30/APTS e A30/APTS/AF. Analisando as medidas eletroforéticas das amostras funcionalizadas com ácido fólico, com as das nanopartículas modificadas com o APTS, puderam-se verificar diferentes comportamentos quando submetidas à variação do pH de 3 a 12. Esse diferente comportamento está correlacionado com as propriedades da superfície da nanopartícula, indicando tanto a modificação com o APTS quanto a funcionalização com o AF, os quais se encontram de acordo com a literatura¹³⁰. A Figura 46 apresenta os gráficos do potencial zeta em função do pH para a amostra A30/APTS/AF,

A30/APDS/AF e A30/APES/AF, os quais apresentaram o mesmo comportamento, contudo, tiveram diferentes valores do potencial zeta. Essas diferenças de potencias podem ser ocasionadas pelas variadas concentrações de AF na superfície das nanopartículas.

A estabilidade do sistema SPIO/ALCOXISSILANO/AC.FÓLICO foi analisado medindo-se o comportamento do diâmetro hidrodinâmico das dispersões em diferentes soluções salinas. Após o processo de preparação e lavagem das amostras, dispersou-se-as em solução salina de concentração de 1×10^{-3} mol L⁻¹ de NaCl e ajustou-se o pH em 7,4. Quando um eletrólito é adicionado em uma dispersão de partículas coloidais, a desestabilização deste sistema pode ocorrer, o que é conhecido como processo de coagulação. A desestabilização conduz à formação de agregados como consequência da colisão entre partículas e é dependente tanto da concentração quanto da valência dos íons. Quando as dispersões das nanopartículas funcionalizadas foram submetidas à solução de NaCl, não observou-se significativo processo de coagulação e o diâmetro hidrodinâmico não teve alta variação em um período de 60 minutos, conforme mostrado na Figura 47. Embora tenha observado que apenas para o sistema de SPIO/ALCOXISSILANO houve uma maior formação de agregados.

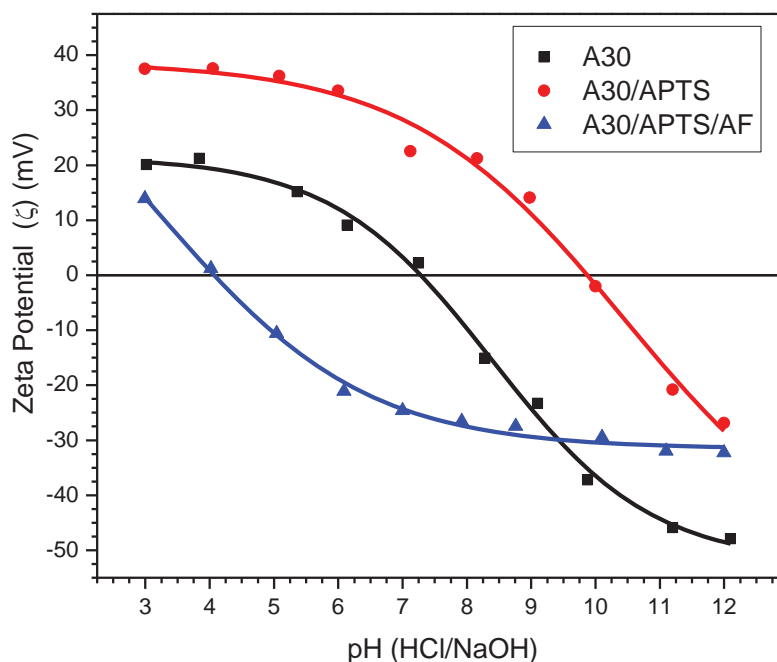


Figura 45. Gráfico do potencial zeta em função do pH para as amostras de SPIO, SPIO/APTS e SPIO/APTS/AF. Força iônica de 1×10^{-3} mol L⁻¹ de NaCl.

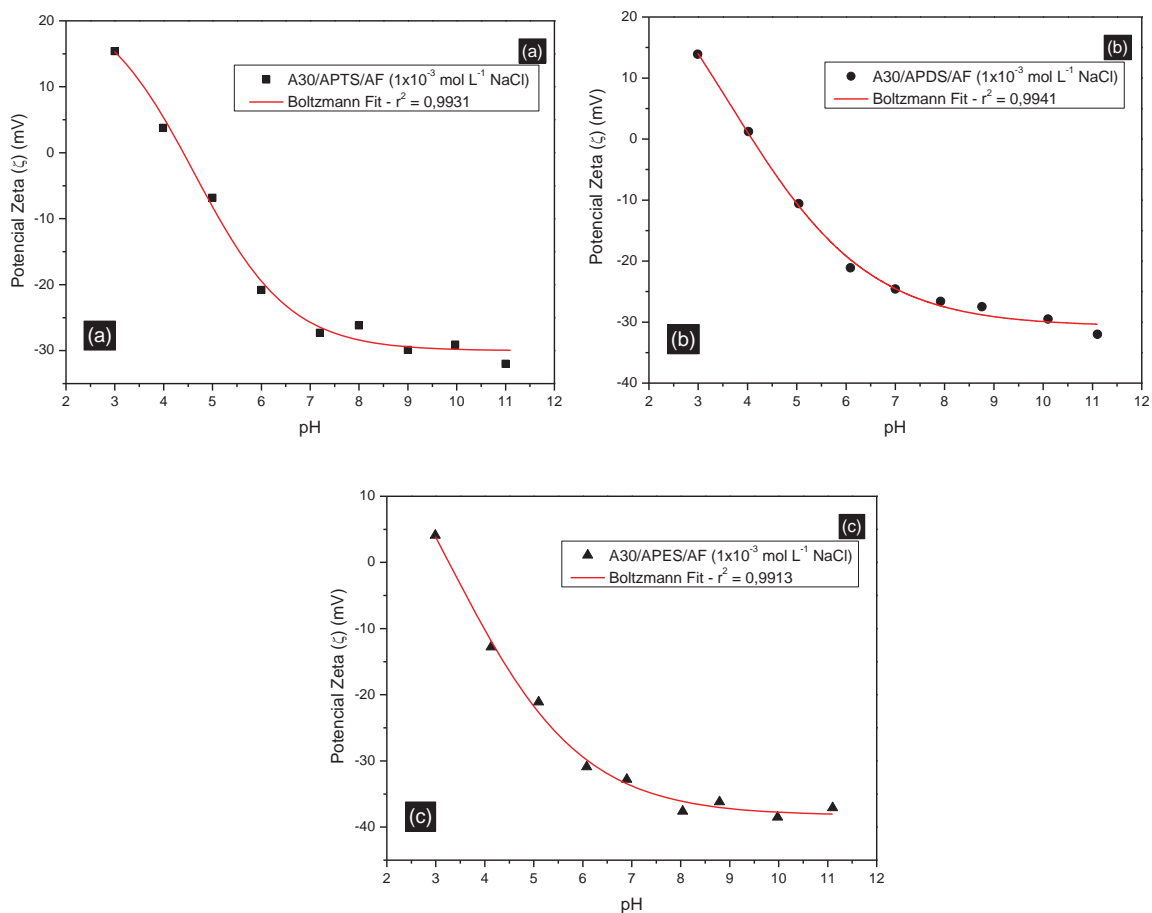


Figura 46. Gráficos do potencial zeta em função do pH para a amostra funcionalizadas com AF; (a) A30/APTS/AF, (b) A30/APDS/AF e (c) A30/APES/AF. Força iônica de 1×10^{-3} mol L⁻¹ de NaCl.

Quando as dispersões das nanopartículas funcionalizadas foram submetidas à solução de tampão fosfato salina (PBS), verificou-se que a formação de agregados em todas as amostras. O PBS é uma solução tampão comumente utilizada em bioquímica, porque é isotônico e não tóxico para as células. O tampão fosfato salino pode ter diferentes composições, neste trabalho utilizou-se a seguinte composição: 137 mmol L⁻¹ de NaCl, 8,1 mmol L⁻¹ de Na₂HPO₄ 2H₂O, 1,76 mmol L⁻¹ de KH₂PO₄, 2,7 mmol L⁻¹ de KCl e um pH de 7,4. A inserção das amostras em solução de PBS causou aumento na densidade de cargas na camada difusa e diminuiu a espessura da dupla camada elétrica das nanopartículas, ocorrendo, assim, o processo de coagulação. Dispersões com força iônica grande, em meio aquoso, proporcionam um acréscimo do número de íons na camada difusa, que, para manter-se

eletricamente neutra, tem seu volume reduzido (diminuição da espessura), de modo tal que as forças de van der Waals prevaleçam sobre as forças eletrostáticas⁸⁸.

De acordo com a teoria DLVO, a espessura da dupla camada elétrica ($1/\kappa$) pode ser estimada pelo inverso do parâmetro de Debye-Huckel^{88,106}. Neste trabalho, o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas funcionalizadas com ácido fólico foram medidas em soluções de 1 mmol L^{-1} de NaCl e $149,56 \text{ mmol L}^{-1}$ de PBS, as quais, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, proporcionam ao sistema uma espessura ($1/\kappa$) de 13,6 e 1,1 nm, respectivamente. Para as três amostras, verificou-se a formação de agregação, entretanto, a maior diferença foi observada quando a análise foi repetida 24 horas após a preparação das dispersões. Após 24 horas, observou-se a formação de agregados na ordem 1100 nm para a amostra A30/APTS/AF e 900 nm para A30/APDS/AF. Contudo, para a amostra A30/APES/AF, os tamanhos dos agregados foram menores (450 nm) em relação às demais amostras. Essas diferenças nos tamanhos dos agregados podem estar relacionadas tanto com a concentração de AF na superfície das nanopartículas quanto na influência dos alcoxissilanos utilizados. Após a formação da ligação amida, a molécula do ácido fólico ainda possui um grupo ácido carboxílico livre, o qual pode interagir com outro grupo ácido carboxílico de uma molécula de AF via interação de hidrogênio, desestabilizando o sistema. Como mostrado anteriormente, os alcoxissilanos proporcionaram diferentes propriedades para as superfícies estudadas. A menor formação de agregados para a amostra A30/APES/AF pode ser relacionada ao fato de que a molécula APES possui dois grupos etila, os quais proporcionaram uma estabilidade eletrostática ao sistema.

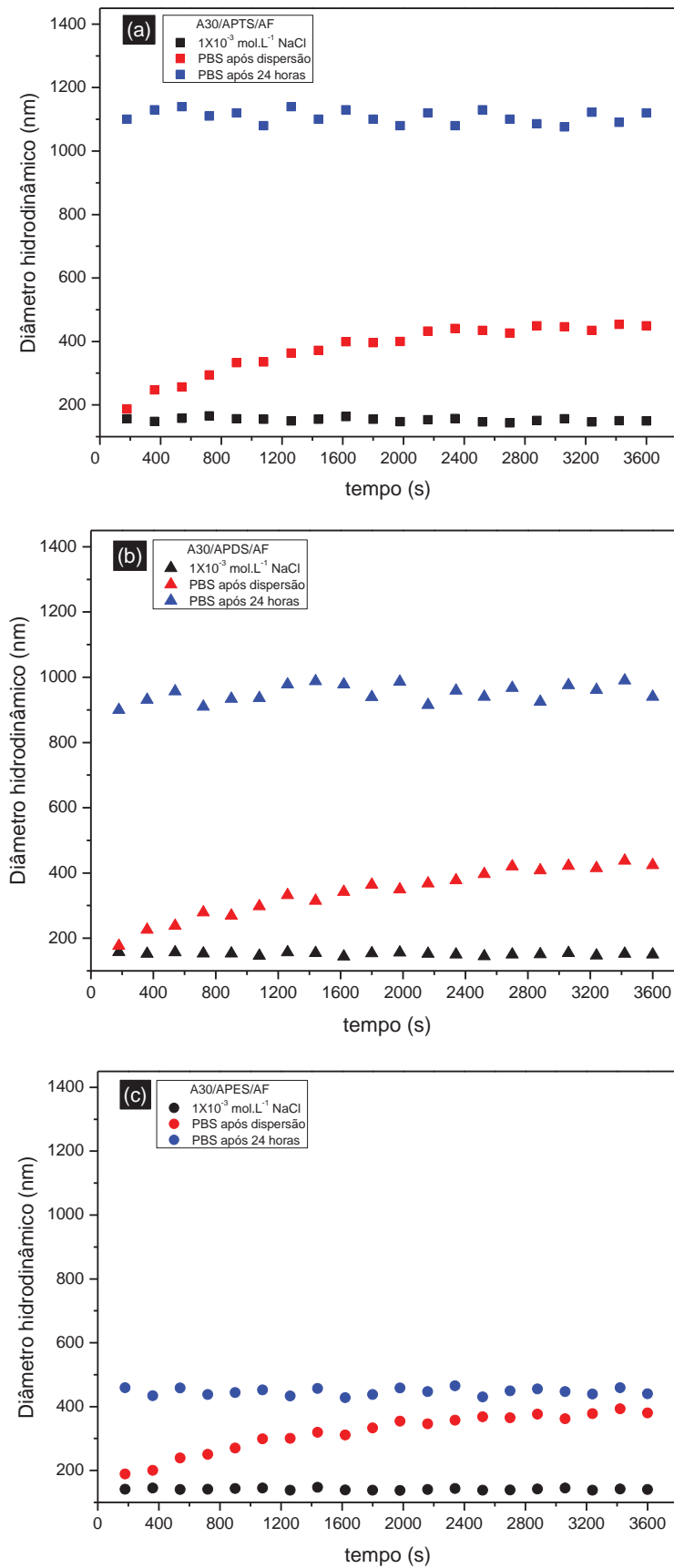


Figura 47. Comportamento do diâmetro hidrodinâmico das dispersões em diferentes soluções salinas, (a) SPIO/APTS/AF, (b) SPIO/APDS/AF e (c) SPIO/APES/AF.

V. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

V.1. Conclusões

Com base nos objetivos propostos e os resultados obtidos destacam-se as conclusões:

(i) o uso do ultrassom, como uma ferramenta de auxílio, na síntese de magnetita via coprecipitação, proporcionou uma diminuição do tamanho das nanopartículas com o aumento da amplitude acústica, que pode ser devido aos efeitos físicos causados pela cavitação acústica; (ii) a utilização dos alcoxissilanos 3-aminopropil-trietóxisilano (APTS), 3-aminopropil-etil-dietóxisilano (APDS) e 3-aminopropil-dietil-etóxisilano (APES) proporcionou a modificação *in situ* das nanopartículas em um único passo, como também o controle da densidade do grupo amina na superfície das nanopartículas e (iii) a funcionalização das nanopartículas com ácido fólico via procedimento das carbodiimidias foi realizada de forma satisfatória. As análises das amostras SPIO/ALCOXISSILANO/AF sintetizadas mostraram que suas propriedades foram dependentes da estrutura química do alcoxissilano utilizado. A presença dos grupos etila nas moléculas de APDS e APES proporcionou diferentes comportamentos em relação à estabilidade cinética coloidal do sistema em solução com diferentes eletrólitos. Medidas de mobilidade microeletroforética e espalhamento de luz revelaram, para essas amostras, menores potenciais de superfície quando comparada com a amostra A30-APTS, porém, essas apresentaram um comportamento mais estável com menor formação de agregados, verificando-se que o tamanho da barreira de repulsão depende da natureza da superfície. Assim, pode ser concluído que a presença do grupo etila proporcionou uma estabilização eletroestérica nas suspensões, sugerindo que as nanopartículas modificadas com APES possuem potencial para utilização em sistemas biológicos devido à sua melhor estabilidade cinética coloidal. Diante disso, o grupo de Materiais Magnéticos e Colóides visa pleitear uma possível patente em relação aos resultados apresentados.

V.2 Perspectivas

O trabalho desenvolvido gerou uma as perspectivas dentre as quais pode-se destacar:

(i) a realização de teste *in vitro* com as amostras sintetizadas verificará se diferentes concentrações de ácido fólico pode ou não proporcionar diferentes internalização celular, a fim de testar sua potencialidade na aplicação em sistema biológicos; (ii) a modificação da superfície ou a encapsulação das nanopartículas magnéticas com polímeros biocompatíveis, tais como, o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), o poli(ácido lático) (PLA) e o poli(3-hidroxi-butilato) (PHB), poderão ser testados com o intuito de se obter sistemas multifuncionais, com elevada estabilidade cinética coloidal no meio de aplicação.

Referências

- 1 ZARBIN, A. J. G. (Nano) materials chemistry. **Quimica Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, ago. 2007.
- 2 TOMA, H. E.; ARAKI, K. Nanociência e nanotecnologia. **Ciência Hoje**, v. 37, n. 217, p. 24-31, maio 2005.
- 3 SUN, C.; LEE, J. S. H.; ZHANG, M. Q. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 11, p. 1252-1265, Aug. 2008.
- 4 KNOBEL, M.; GOYA, G. F. Ferramentas magnéticas na escala do átomo. **Scientific American Brasil**, v. 31, n. 5, p. 58-66, jun. 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. 126-143, Aug. 2010.
- 6 NEL, A. E.; MADLER, L.; VELEGOL, D.; XIA, T.; HOEK, E. M. V.; SOMASUNDARAN, P.; KLAESSIG, F.; CASTRANOVA, V.; THOMPSON, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. **Nature Materials**, v. 8, n. 7, p. 543-557, July 2009.
- 7 NEL, A.; XIA, T.; MADLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622-627, Feb. 2006.
- 8 MIN, Y. J.; AKBULUT, M.; KRISTIANSEN, K.; GOLAN, Y.; ISRAELACHVILI, J. The role of interparticle and external forces in nanoparticle assembly. **Nature Materials**, v. 7, n. 7, p. 527-538, July 2008.
- 9 KIM, H. Y.; SOFO, J. O.; VELEGOL, D.; COLE, M. W.; LUCAS, A. A. Van der Waals dispersion forces between dielectric nanoclusters. **Langmuir**, v. 23, n. 4, p. 1735-1740, Feb. 2007.
- 10 CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. **The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses**. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2003. 694 p.
- 11 SCHWERTMANN, U. **Iron oxides in the laboratory: preparation and characterization**. 2nd ed. New York: VHC, 1991. 137 p.

- 12 CAO, H.; SUIB, S. L. Highly efficient heterogeneous photooxidation of 2-propanol to acetone with amorphous manganese oxide catalysts. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 12, p. 5334-5342, June 1994.
- 13 CURRYHYDE, H. E.; MUSCH, H.; BAIKER, A. Selective catalytic reduction of nitric-oxide over amorphous and crystalline chromia - comparative-study of activities. **Applied Catalysis**, v. 65, n. 2, p. 211-223, Oct. 1990.
- 14 CULLITY, B. D. **Introduction to magnetic materials**. 2nd ed. Reading: Addison-Wesley, 1972. 414 p.
- 15 PILLAI, V.; SHAH, D. O. Synthesis of high-coercivity cobalt ferrite particles using water-in-oil microemulsions. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 163, n. 1-2, p. 243-248, Oct. 1996.
- 16 VESTAL, C. R.; ZHANG, Z. J. Magnetic spinel ferrite nanoparticles from microemulsions. **International Journal of Nanotechnology**, v. 1, n. 1-2, p. 240-263, Feb. 2004.
- 17 BENSEBAA, F.; ZAVALICHE, F.; L'ECUYER, P.; COCHRANE, R. W.; VERES, T. Microwave synthesis and characterization of Co-ferrite nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 277, n. 1, p. 104-110, Sept. 2004.
- 18 DING, J.; LIU, X. Y.; WANG, J.; SHI, Y. Ultrafine ferrite particles prepared by coprecipitation/mechanical milling. **Materials Letters**, v. 44, n. 1, p. 19-22, May 2000.
- 19 NICOARA, G.; FRATILOIU, D.; NOGUES, M.; DORMANN, J. L.; VASILIU, F. Ni-Zn ferrite nanoparticles prepared by ball milling. *Materials Science Forum*, v. 235-238, p. 145-150, May 1997.
- 20 SEIP, C. T.; CARPENTER, E. E.; O'CONNOR, C. J.; JOHN, V. T.; LI, S. C. Magnetic properties of a series of ferrite nanoparticles synthesized in reverse micelles. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 34, n. 4, p. 1111-1113, July 1998.
- 21 MOUMEN, N.; PILENI, M. P. Control of the size of cobalt ferrite magnetic fluid. **Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 5, p. 1867-1873, Feb. 1996.

- 22 SRIVASTAVA, D. N.; PERKAS, N.; SEISENBAEVA, G. A.; KOLTYPIN, Y.; KESSLER, V. G.; GEDANKEN, A. Preparation of porous cobalt and nickel oxides from corresponding alkoxides using a sonochemical technique and its application as a catalyst in the oxidation of hydrocarbons. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 10, n. 1, p. 1-9, Jan. 2003.
- 23 SHAFI, K. V. P. M.; GEDANKEN, A. Sonochemical approach to the preparation of barium hexaferrite nanoparticles. **Nanostructured Materials**, v. 12, n. 1-4, p. 29-34, July 1999.
- 24 YAN, C. H.; XU, Z. G.; CHENG, F. X.; WANG, Z. M.; SUN, L. D.; LIAO, C. S.; JIA, J. T. Nanophased CoFe_2O_4 prepared by combustion method. **Solid State Communications**, v. 111, n. 5, p. 287-291, Sept. 1999.
- 25 HANH, N.; QUY, O. K.; THUY, N. P.; TUNG, L. D.; SPINU, L. Synthesis of cobalt ferrite nanocrystallites by the forced hydrolysis method and investigation of their magnetic properties. **Physica B: Condensed Matter**, v. 327, n. 2-4, p. 382-384, Apr. 2003.
- 26 AMMAR, S.; HELFEN, A.; JOUINI, N.; FIEVET, F.; ROSENMAN, I.; VILLAIN, F.; MOLINIE, P.; DANOT, M. Magnetic properties of ultrafine cobalt ferrite particles synthesized by hydrolysis in a polyol medium. **Journal of Materials Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 186-192, May 2001.
- 27 KIM, Y. I.; KIM, D.; LEE, C. S. Synthesis and characterization of CoFe_2O_4 magnetic nanoparticles prepared by temperature-controlled coprecipitation method. **Physica B: Condensed Matter**, v. 337, n. 1-4, p. 42-51, Sept. 2003.
- 28 LI, J.; DAI, D. L.; ZHAO, B. G.; LIN, Y. Q.; LIU, C. Y. Properties of ferrofluid nanoparticles prepared by coprecipitation and acid treatment. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 4, n. 3, p. 261-264, June 2002.
- 29 MENDELOVICI, E.; VILLALBA, R.; SAGARZAZU, A. Distinctive cobalt ferrites prepared by the thermal-transformation alkoxide route. **Thermochimica Acta**, v. 318, n. 1-2, p. 51-56, Sept. 1998.
- 30 COTE, L. J.; TEJA, A. S.; WILKINSON, A. P.; ZHANG, Z. J. Continuous hydrothermal synthesis of CoFe_2O_4 nanoparticles. **Fluid Phase Equilibria**, v. 210, n. 2, p. 307-317, Aug. 2003.

- 31 THANG, P. D.; RIJNDERS, G.; BLANK, D. H. A. Spinel cobalt ferrite by complexometric synthesis. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 295, n. 3, p. 251-256, Sept. 2005.
- 32 MONTEMAYOR, S. M.; GARCIA-CERDA, L. A.; TORRES-LUBIAN, J. R. Preparation and characterization of cobalt ferrite by the polymerized complex method. **Materials Letters**, v. 59, n. 8-9, p. 1056-1060, Apr. 2005.
- 33 ZHANG, S. P.; DONG, D. W.; SUI, Y.; LIU, Z. G.; WANG, H. X.; QIAN, Z. N.; SU, W. H. Preparation of core shell particles consisting of cobalt ferrite and silica by sol-gel process. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 415, n. 1-2, p. 257-260, May 2006.
- 34 LEE, J. G.; PARK, J. Y.; OH, Y. J.; KIM, C. S. Magnetic properties of CoFe_2O_4 thin films prepared by a sol-gel method. **Journal of Applied Physics**, v. 84, n. 5, p. 2801-2804, Sept. 1998.
- 35 GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, Jan. 2005.
- 36 AUZANS, E.; ZINS, D.; BLUMS, E.; MASSART, R. Synthesis and properties of Mn-Zn ferrite ferrofluids. **Journal of Materials Science**, v. 34, n. 6, p. 1253-1260, Mar. 1999.
- 37 LAMER, V. K.; DINEGAR, R. H. Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. **Journal of the American Chemical Society**, v. 72, n. 11, p. 4847-4854, Oct. 1950.
- 38 SUSLICK, K. S.; CHOE, S. B.; CICHOWLAS, A. A.; GRINSTAFF, M. W. Sonochemical synthesis of amorphous iron. **Nature**, v. 353, n. 6343, p. 414-416, Oct. 1991.
- 39 KOLTYPIN, Y.; KATABI, G.; CAO, X.; PROZOROV, R.; GEDANKEN, A. Sonochemical preparation of amorphous nickel. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 201, n. 1-2, p. 159-162, June 1996.
- 40 CAO, X.; KOLTYPIN, Y.; KATABI, G.; PROZOROV, R. Preparation and characterization of amorphous nanometre sized Fe_3O_4 powder. **Journal of Materials Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 1007-1009, June 1997.

- 41 KOLTYPIN, Y.; CAO, X.; PROZOROV, R.; BALOGH, J.; KAPTAS, D.; GEDANKEN, A. Sonochemical synthesis of iron nitride nanoparticles. **Journal of Materials Chemistry**, v. 7, n. 12, p. 2453-2456, Dec. 1997.
- 42 TIPLER, P. A. **Física moderna**. 3ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001. 515 p.
- 43 MASON, T. S. **Sonochemistry**: the uses of ultrasound in chemistry. 2nd ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1990. 157 p
- 44 SUSLICK, K. S.; DOKTYCZ, S. J.; FLINT, E. B. On the origin of sonoluminescence and sonochemistry. **Ultrasonics**, v. 28, n. 5, p. 280-290, Sept. 1990.
- 45 SUSLICK, K. S. Sonochemistry. **Science**, v. 247, n. 4949, p. 1439-1445, Mar. 1990.
- 46 GEDANKEN, A. Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, n. 2, p. 47-55, Apr. 2004.
- 47 FLINT, E. B.; SUSLICK, K. S. The temperature of cavitation. **Science**, v. 253, n. 5026, p. 1397-1399, Sept. 1991.
- 48 SUSLICK, K. S.; DIDENKO, Y.; FANG, M. M.; HYEON, T.; KOLBECK, K. J.; McNAMARA, W. B.; MDLELENI, M. M.; WONG, M. Acoustic cavitation and its chemical consequences. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A: Mathematical Physical and Engineering Sciences**, v. 357, n. 1751, p. 335-353, Feb. 1999.
- 49 SUSLICK, K. S.; MDLELENI, M. M.; RIES, J. T. Chemistry induced by hydrodynamic cavitation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 39, p. 9303-9304, Oct. 1997.
- 50 SUSLICK, K. S.; FANG, M.; HYEON, T.; MDLELENI, M. M. Applications of sonochemistry to materials synthesis. In: MASON, T. S. (Ed.). **Sonochemistry and sonoluminescence**. Dordrecht: Kluwer Publishers, 1999. v. 524, cap. 3, p. 291-320.
- 51 DUARTE, L. R. The stimulation of bone-growth by ultrasound. **Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery**, v. 101, n. 3, p. 153-159, June 1983.
- 52 LI, H.; LI, H. R.; GUO, Z. C.; LIU, Y. The application of power ultrasound to reaction crystallization. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, n. 4, p. 359-363, May 2006.

- 53 ZHANG, G. Q.; WU, H. P.; GE, M. Y.; JIANG, Q. K.; CHEN, L. Y.; YAO, J. M. Ultrasonic-assisted preparation of monodisperse iron oxide nanoparticles. **Materials Letters**, v. 61, n. 11-12, p. 2204-2207, May 2007.
- 54 KIM, E. H.; LEE, H. S.; KWAK, B. K.; KIM, B. K. Synthesis of ferrofluid with magnetic nanoparticles by sonochemical method for MRI contrast agent. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 289, n. 3, p. 328-330, Mar. 2005.
- 55 ABU MUKH-QASEM, R.; GEDANKEN, A. Sonochemical synthesis of stable hydrosol of Fe₃O₄ nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 284, n. 2, p. 489-494, Apr. 2005.
- 56 COZZOLI, P. D.; PELLEGRINO, T.; MANNA, L. Synthesis, properties and perspectives of hybrid nanocrystal structures. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 11, p. 1195-1208, June 2006.
- 57 PANKHURST, Q. A.; CONNOLLY, J.; JONES, S. K.; DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, n. 13, p. R167-R181, July 2003.
- 58 QIAO, R. R.; YANG, C. H.; GAO, M. Y. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to *in vivo* MRI applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, n. 35, p. 6274-6293, Nov. 2009.
- 59 KALAMBUR, V. S.; HAN, B.; HAMMER, B. E.; SHIELD, T. W.; BISCHOF, J. C. *In vitro* characterization of movement, heating and visualization of magnetic nanoparticles for biomedical applications. **Nanotechnology**, v. 16, n. 8, p. 1221-1233, Aug. 2005.
- 60 ROSENSWEIG, R. E. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 252, n. 1-3, p. 370-374, Nov. 2002.
- 61 HERGT, R.; DUTZ, S.; MULLER, R.; ZEISBERGER, M. Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, n. 38, p. S2919-S2934, Sept. 2006.
- 62 GAZEAU, F.; LEVY, M.; WILHELM, C. Optimizing magnetic nanoparticle design for nanothermotherapy. **Nanomedicine**, v. 3, n. 6, p. 831-844, Dec. 2008.

63 MORNET, S.; VASSEUR, S.; GRASSET, F.; DUGUET, E. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. **Journal of Materials Chemistry**, v. 14, n. 14, p. 2161-2175, Oct. 2004.

64 JORDAN, A.; SCHOLZ, R.; MAIER-HAUFF, K.; VAN LANDEGHEM, F. K. H.; WALDOEFNER, N.; TEICHGRAEBER, U.; PINKERNELLE, J.; BRUHN, H.; NEUMANN, F.; THIESEN, B.; VON DEIMLING, A.; FELIX, R. The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. **Journal of Neuro Oncology**, v. 78, n. 1, p. 7-14, May 2006.

65 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, Mar. 2010.

66 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, Aug. 2007.

67 JURGONS, R.; SELIGER, C.; HILPERT, A.; TRAHMS, L.; ODENBACH, S.; ALEXIOU, C. Drug loaded magnetic nanoparticles for cancer therapy. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 18, n. 38, p. S2893-S2902, Sept. 2006.

68 CORRIU, R. J. P. The control of nanostructured solids: a challenge for molecular chemistry. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2001, n. 5, p. 1109-1121, May 2001.

69 FONSECA, M. G.; OLIVEIRA, A. S.; AIROLDI, C. Silylating agents grafted onto silica derived from leached chrysotile. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 240, n. 2, p. 533-538, Aug. 2001.

70 JOSE, N. M.; PRADO, L. A. S. D. Hybrid organic-inorganic materials: preparation and some applications. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 281-288, mar. 2005.

71 BRINKER, C. J. **Sol gel science the physics and chemistry of sol gel processing**. 3rd ed. Boston: Academic Press, 1990. 908 p.

72 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.

- 73 McCARTHY, J. R.; WEISSLEDER, R. Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 11, p. 1241-1251, Aug. 2008.
- 74 BERRY, C. C. Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 42, n. 22, p. 231-240, Nov. 2009.
- 75 CORCHERO, J.; VILLAVERDE, A. Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 468-476, Aug. 2009.
- 76 OBERDORSTER, G.; OBERDORSTER, E.; OBERDORSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 7, p. 823-839, July 2005.
- 77 VERTEGEL, A. A.; SIEGEL, R. W.; DORDICK, J. S. Silica nanoparticle size influences the structure and enzymatic activity of adsorbed lysozyme. **Langmuir**, v. 20, n. 16, p. 6800-6807, Aug. 2004.
- 78 SIGMUND, W.; PYRGIOTAKIS, G.; DAGA, A. **Chemical processing of ceramics**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2005. 756 p.
- 79 BACA, H. K.; ASHLEY, C.; CARNES, E.; LOPEZ, D.; FLEMMING, J.; DUNPHY, D.; SINGH, S.; CHEN, Z.; LIU, N. G.; FAN, H. Y.; LOPEZ, G. P.; BROZIK, S. M.; WERNER-WASHBURNE, M.; BRINKER, C. J. Cell-directed assembly of lipid-silica nanostructures providing extended cell viability. **Science**, v. 313, n. 5785, p. 337-341, July 2006.
- 80 CEDERVALL, T.; LYNCH, I.; LINDMAN, S.; BERGGARD, T.; THULIN, E.; NILSSON, H.; DAWSON, K. A.; LINSE, S. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 7, p. 2050-2055, Feb. 2007.
- 81 LUNDQVIST, M.; STIGLER, J.; ELIA, G.; LYNCH, I.; CEDERVALL, T.; DAWSON, K. A. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 38, p. 14265-14270, Sept. 2008.

- 82 LINSE, S.; CABALEIRO-LAGO, C.; XUE, W. F.; LYNCH, I.; LINDMAN, S.; THULIN, E.; RADFORD, S. E.; DAWSON, K. A. Nucleation of protein fibrillation by nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 21, p. 8691-8696, May 2007.
- 83 McNEIL, S. E. Nanoparticle therapeutics: a personal perspective. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 1, n. 3, p. 264-271, Jan. 2009.
- 84 MORTENSEN, L. J.; OBERDORSTER, G.; PENTLAND, A. P.; DELOUISE, L. A. *In vivo* skin penetration of quantum dot nanoparticles in the murine model: the effect of UVR. **Nano Letters**, v. 8, n. 9, p. 2779-2787, Sept. 2008.
- 85 GOODMAN, C. M.; McCUSKER, C. D.; YILMAZ, T.; ROTELLO, V. M. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. **Bioconjugate Chemistry**, v. 15, n. 4, p. 897-900, July 2004.
- 86 HOET, P. H. M.; GILISSEN, L.; NEMERY, B. Polyanions protect against the *in vitro* pulmonary toxicity of polycationic paint components associated with the ardistil syndrome. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 175, n. 2, p. 184-190, Sept. 2001.
- 87 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, Aug. 1997.
- 88 HUNTER, R. J. **Introduction to modern colloid science**. 3rd ed. Oxford: Clarendon Press, 1993. 344 p.
- 89 MALVERN INSTRUMENTS. **Zetasizer nano series user manual**. Worcestershire, 2005. 1 CD-ROM.
- 90 LANGFORD, J. I.; WILSON, A. J. C. Scherrer after 60 years: survey and some new results in determination of crystallite size. **Journal of Applied Crystallography**, v. 11, n. 4, p. 102-113, Mar. 1978.
- 91 HOLLAND, T. J. B.; REDFERN, S. A. T. Unit cell refinement from powder diffraction data: the use of regression diagnostics. **Mineralogical Magazine**, v. 61, n. 1, p. 65-77, Feb. 1997.

- 92 INTERNATIONAL CENTRE FOR DIFFRACTION DATA. **Joint Committee for Powder Diffraction Studies**: PDF-2. Newton Square, 2005. 1 CD-ROM.
- 93 WEISSLER, A. Formation of hydrogen peroxide by ultrasonic waves: free radicals. **Journal of the American Chemical Society**, v. 81, n. 5, p. 1077-1081, May 1959.
- 94 WAKEFORD, C. A.; BLACKBURN, R.; LICKISS, P. D. Effect of ionic strength on the acoustic generation of nitrite, nitrate and hydrogen peroxide. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 6, n. 3, p. 141-148, June 1999.
- 95 PROZOROV, T.; PROZOROV, R.; SUSLICK, K. S. High velocity interparticle collisions driven by ultrasound. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 43, p. 13890-13891, Nov. 2004.
- 96 WALDRON, R. D. Infrared spectra of ferrites. **Physical Review**, v. 99, n. 6, p. 1727-1735, Apr. 1955.
- 97 YAMAURA, M.; CAMILO, R. L.; SAMPAIO, L. C.; MACEDO, M. A.; NAKAMURA, M.; TOMA, H. E. Preparation and characterization of (3-aminopropyl) triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 279, n. 2-3, p. 210-217, Aug. 2004.
- 98 WHITE, L. D.; TRIPP, C. P. Reaction of (3-aminopropyl)dimethylethoxysilane with amine catalysts on silica surfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 232, n. 2, p. 400-407, Dec. 2000.
- 99 MA, M.; ZHANG, Y.; YU, W.; SHEN, H. Y.; ZHANG, H. Q.; GU, N. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 212, n. 2-3, p. 219-226, Jan. 2003.
- 100 WATTS, B.; THOMSEN, L.; FABIEN, J. R.; DASTOOR, P. C. Understanding the conformational dynamics of organosilanes: gamma-APS on zinc oxide surfaces. **Langmuir**, v. 18, n. 1, p. 148-154, Jan. 2002.
- 101 QUINTON, J. S.; DASTOOR, P. C. Conformational dynamics of gamma-APS on the iron oxide surface: an adsorption kinetic study using XPS and ToF-SIMS. **Surface and Interface Analysis**, v. 30, n. 1, p. 21-24, Aug. 2000.

102 GOYA, G. F.; GRAZU, V.; IBARRA, M. R. Magnetic nanoparticles for cancer therapy. **Current Nanoscience**, v. 4, n. 1, p. 1-16, Feb. 2008.

103 GAMARRA, L. F.; PONTUSCHKA, W. M.; MAMANI, J. B.; CORNEJO, D. R.; OLIVEIRA, T. R.; VIEIRA, E. D.; COSTA FILHO, A. J.; AMARO, E. Magnetic characterization by SQUID and FMR of a biocompatible ferrofluid based on Fe₃O₄. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 21, n. 11, p. 155104, Mar. 2009.

104 KUSIGERSKI, V.; TADIC, M.; SPASOJEVIC, V.; ANTIC, B.; MARKOVIC, D.; BOSKOVIC, S.; MATOVIC, B. High coercivity of gamma-Fe₂O₃ nanoparticles obtained by a mechanochemically activated solid-state displacement reaction. **Scripta Materialia**, v. 56, n. 10, p. 883-886, May 2007.

105 SUN, Z. X.; SU, F. W.; FORSLING, W.; SAMSKOG, P. O. Surface characteristics of magnetite in aqueous suspension. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 197, n. 1, p. 151-159, Jan. 1998.

106 VERWEY, E. J. **Theory of the stability of lyophobic colloids**. 3rd ed. Minelo: Dover, 1999. 205 p.

107 ARAKAKI, L. N. H.; AIROLDI, C. Two independent routes to synthesize identical silicas by grafting ethylenimine or 2-aminoethanethiol, their cation adsorbing abilities, and thermodynamic data. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 249, n. 1, p. 1-7, May 2002.

108 VIOTA, J. L.; DE VICENTE, J.; DURAN, J. D. G.; DELGADO, A. Stabilization of magnetorheological suspensions by polyacrylic acid polymers. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 284, n. 2, p. 527-541, Apr. 2005.

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

110 MESZAROS, R.; THOMPSON, L.; BOS, M.; DE GROOT, P. Adsorption and electrokinetic properties of polyethylenimine on silica surfaces. **Langmuir**, v. 18, n. 16, p. 6164-6169, Aug. 2002.

111 ILLES, E.; TOMBACZ, E. The effect of humic acid adsorption on pH-dependent surface charging and aggregation of magnetite nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 295, n. 1, p. 115-123, Mar. 2006.

112 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, Sept. 2005.

113 SUDIMACK, J.; LEE, R. J. Targeted drug delivery via the folate receptor. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 41, n. 2, p. 147-162, Mar. 2000.

114 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, Mar. 1999.

115 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, Nov. 2000.

116 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, Apr. 1998.

117 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, Jan. 1997.

118 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, Dec. 2000.

- 119 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, Apr. 2001.
- 120 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, Apr. 2002.
- 121 MONTALBETTI, C. A. G. N.; FALQUE, V. Amide bond formation and peptide coupling. **Tetrahedron**, v. 61, n. 46, p. 10827-10852, Nov. 2005.
- 122 ZHANG, Y.; ZHANG, J. Surface modification of monodisperse magnetite nanoparticles for improved intracellular uptake to breast cancer cells. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 283, n. 2, p. 352-357, Mar. 2005.
- 123 CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. **Organic chemistry**. 2nd ed. New York: Oxford, 2001. 1512 p.
- 124 SILVERSTEIN, R. M. **Spectrometric identification of organic compounds**. 3rd ed. New York: John Wiley, 1998. 482 p.
- 125 GOTARDO, M. A.; GIGANTE, A. C.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Determination of furosemide in pharmaceutical formulations by diffuse reflectance spectroscopy. **Talanta**, v. 64, n. 2, p. 361-365, Oct. 2004.
- 126 ELSHERIF, Z. A.; WALASH, M. I.; ELTARRAS, M. F.; OSMAN, A. O. Colorimetric determination of two nonsteroidal anti-inflammatory drugs using p-dimethylaminocinnamaldehyde. **Analytical Letters**, v. 30, n. 10, p. 1881-1896, May 1997.
- 127 ESTEVEROMERO, J. S.; PONS, L. M.; GARCIAALVAREZCOQUE, M. C.; RAMISRAMOS, G. Determination of pyrrole derivatives and hydroxyproline with 4-(dimethylamino)benzaldehyde in a micellar medium. **Analytical Letters**, v. 27, n. 8, p. 1557-1567, June 1994.

128 ESTEVEROMERO, J. S.; MONFERRERONS, L.; RAMISRAMOS, G.; GARCIAALVAREZCOQUE, M. C. Enhanced spectrophotometric determination of nicotinic-acid in a sodium dodecyl-sulfate micellar medium. **Talanta**, v. 42, n. 5, p. 737-745, May 1995.

129 ESTEVEROMERO, J. S.; SIMOALFONSO, E. F.; GARCIAALVAREZCOQUE, M. C.; RAMISRAMOS, G. Micellar-enhanced spectrophotometric determination of organic species. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v. 14, n. 1, p. 29-37, Jan. 1995.

130 DAS, M.; MISHRA, D.; MAITI, T. K.; BASAK, A.; PRAMANIK, P. Biofunctionalization of magnetite nanoparticles using an aminophosphonic acid coupling agent: new, ultradispersed, iron-oxide folate nanoconjugates for cancer-specific targeting. **Nanotechnology**, v. 19, n. 41, p. 1-14, Oct. 2008.