JAIME RICARDO VEGA CHACON

Poliaspartamidas responsivas e nanoestruturas de sílica com óxido de ferro ou albumina

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Jafelicci Júnior

Araraquara

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Vega Chacón, Jaime Ricardo
V422p Poliaspartamidas responsivas e nanoestruturas de sílica com óxido de ferro ou albumina / Jaime Ricardo Vega Chacón. – Araraquara: [s.n.], 2019
122 f.: il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Miguel Jafelicci Jr.

1. Nanopartículas. 2. Óxido de ferro. 3. Polímeros. 4. Sílica. 5. Albumina. I. Título

Elaboração: Seção Técnica de Tratamento da Informação
Biblioteca do Instituto de Química, Unesp, câmpus de Araraquara

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Poliaspartamidas responsivas e nanoestruturas de sílica com óxido de ferro ou albumina"

AUTOR: JAIME RICARDO VEGA CHACÓN
ORIENTADOR: MIGUEL JAFELICCI JUNIOR

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MIGUEL JAFELICCI JUNIOR
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Profª. Drª. SANDRA HELENA PULCINELLI
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. FERNANDO LUCAS PRIMO
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. VALTENCIR ZUCOLOTTO
Departamento de Física e Ciência dos Materiais / Instituto de Física - USP - São Carlos

Prof. Dr. CAIO MARCIO PARANHOS DA SILVA
Departamento de Química / Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia - UFSCar - São Carlos

Araraquara, 04 de abril de 2019

Súmula curricular

Dados Pessoais

Nome	Jaime Ricardo Vega Chacón
Nascimento	Lima – Peru
Nome em citações bibliográficas	Jaime Vega-Chacón, J. Vega
Endereço Profissional	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Físico-Química Rua Professor Francisco Degni nº55 Quitandinha – Araraquara 14800-900, SP - Brasil Telefone: 16 33019776
Endereço eletrônico	jvegachacon@gmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

2015 Doutorado em Química.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.
Com periodo sanduiche no Laboratoire d'Automatique et de Génie des procédés (LAGEP), Université Claude Bernard - Lyon 1, França (Orientador: Dr. Abdelhamid Elaissari).
Título: Poliaspartamidas responsivas e nanoestructuras de sílica com óxido ferro ou albumina
Orientador: Dr. Miguel Jafelicci Junior.
Bolsista da: Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nivel superior.

2013 - 2015 Mestrado em Química.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

Título: Modificação superficial de nanopartículas de óxido de ferro por poli(ácido aspártico) reticulado.

Orientador: Dr. Miguel Jafelicci Junior.

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

2006 - 2011 Graduação em Química Bacharelado.

Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Perú.

Título: Influencia de las variables experimentales de preparación en la obtención de nanopartículas de magnetita por el método poliol.

Orientador: Dr. Gino Picasso Escobar.

Produção bibliográfica

- João Victor Brandt, Rodolfo Debone Piazza, Caio Carvalho dos Santos, **Jaime Vega-Chacón**, Bruno Estevam Amantéa, Gabriel Cardoso Pinto, Marina Magnani, Henrique Luís Piva, Antonio Claudio Tedesco, Fernando Lucas Primo, Miguel Jafelicci Junior, Rodrigo Fernando Costa Marques, Synthesis and colloidal characterization of folic acid-modified PEG-b-PCL Micelles for methotrexate delivery, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 177, 228–234, 2019.

-**Jaime Vega-Chacón**, Rodolfo Debone Piazza, Rodrigo Fernando Costa Marques, Abdelhamid Elaissari, Miguel Jafelicci Jr, The influence of pH, hydrolysis and degree of substitution on the temperature-sensitive properties of polyaspartamides, **Polymer International** 68**,** 88-93, 2019.

-Elsa Maria Materóna, Reinaldo Marchetto, Angela Regina Araujo, **Jaime Vega-Chacón,** Maria I. Pividori, Miguel Jafelicci Jr., Flavio M. Shimizu, Osvaldo N. Oliveira Jr., Maria Valnice Boldrin Zanoni, A simple electrochemical method to monitor an azo dye reaction with a liver protein, **Analytical Biochemistry** 553, 46–53, 2018.

-Ahmad Bitar, **Jaime Vega-Chacón**, Zineb Lgourna, Hatem Fessi, Miguel Jafelicci Jr, Abdelhamid Elaissari, Submicron silica shell–magnetic core preparation and characterization, **Colloids and Surfaces A** 537, 318–324, 2018.

- Jaime Vega-Chacón, María Isabel Amaya Arbeláez, Janaina Habib Jorge, Rodrigo Fernando C. Marques, Miguel Jafelicci Jr.; Multifunctional poly(aspartic acid) hydrogel-coated magnetite nanoparticles for biomedical applications, **Materials Science and Engineering C** 77, 366–373, 2017.

-Jaime Vega-Chacón, Gino Picasso, Luis Avilés-Félix, Miguel Jafelicci Jr.; Influence of synthesis experimental parameters on the formation of magnetite nanoparticles prepared by polyol method, **Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.** 7, 015014, 2016.

-F. G. Torres, O. P. Troncoso, **J. Vega**, M. Wong; Influence of Botanic origin on the morphology and size of starch nanoparticles from andean native starch sources, **Polymers from renewable resources** 6, 3, 91-103, 2015.

-J. Vega; G. Picasso; L. Avilés-Félix; A. López; Influencia de las variables experimentales de preparación en la obtención de nanopartículas de magnetita por el método de descomposición térmica, **Rev. Soc. Quím. Perú** 79, 4, 331-347, 2013.

-G. Picasso; **J. Vega**; R. Uzuriaga; G. P. Ruiz; Preparación de nanopartículas de magnetita por los métodos sol-gel y precipitación: estudio de la composición química y estructura, **Rev. Soc. Quím. Perú** 78, 3, 170-182, 2012.

.

Trabalhos ou Resumos apresentados em Eventos Científicos

Jaime Vega-Chacón, Mohamad Tarhini, Hatem Fessi, Miguel Jafelicci Jr, Abdelhamid Elaissari, Synthesis and characterization of albumin-silica hybrid nanoparticles, São Paulo School of Advanced Science on Colloids, Campinas, 2018

J. Vega-Chacón, R. D. Piazza, R. F. C. Marques, M. Jafelicci Jr, Effect of pH on the thermoresponse of polyaspartamides, Fifth International symposium frontiers in polymer science, Sevilha, 2017.

J. Vega-Chacón, A. C. T. Tognolo, R. F. C. Marques, M. Jafelicci Jr; pH- and temperature-responsive polymers derived from Polysuccinimide, 5th International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, Lisboa, 2017.

A.C.T. Tognolo, **J.R.Vega**, J.C. Freitas, M. G. N. Campos, M. Jafelicci Jr., R.F.C. Marques; Magnetic nanoparticles surface modified with thermoresponsive p(NipAAm-co-DMAAm) copolymers for methotrexate delivery, XV Brazilian MRS Meeting, Campinas, 2016.

Juliana Freitas; **Jaime Vega Chacón**; Anna C. Telatin Tognolo; Maria G. Campos; Rodrigo F. Marques; Miguel Jafelicci Jr; Magnetic nanoparticles surface modified with thermoresponsive P(NIPAAm-co-DMAAm) copolymers for Doxorubicin Delivery (poster), MMM-Intermag Conference, San Diego – California, 2016.

J. Vega; Aplicaciones médicas de las nanopartículas magnéticas (presentación oral), Minicurso – Nanotecnología aplicada a la salud: Enfoques innovadores - Hamutay, Lima, 2016

J. Vega; Aplicaciones médicas de las nanopartículas magnéticas (presentación oral), Encuentro científico internacional – ECI, Lima, 2016.

J. Vega; Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas modificadas superficialmente con hidrogeles sensibles a estímulos (presentación oral), Mini-symposium Bioinorganic: Metal overload in medicine and environment – Biomet, Lima, 2015.

J.R.Vega; Magnetic nanoparticles surface modified with pH-sensitive polymer (presentación oral), Workshop Australia-UNESP "Building a task force on Materials for Life", Araraquara, 2015.

J.R. Vega, R.F. Marques, M. Jafelicci Jr.; Magnetic nanoparticles surface modified with pH-sensitive polymer (poster), Fourth International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, Barcelona, 2015.

J. Vega; Síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro modificadas superficialmente con hidrogel pH-sensible (presentación oral), Mini-symposium Bioinorganic: Metal overload in medicine and environment – Biomet, Lima, 2014.

J. Vega; Aspectos culturales de Perú (presentación oral), Lablin cultural, Botucatu, 2014.

J. Vega, L. Aviles-Félix, G. Picasso, M. Jafelicci Jr; Influence of experimental conditions on obtention of superparamagnetic iron oxide nanoparticles by polyol method (presentación oral), XIII Encontro da SBPMat, João Pessoa, 2014.

E.S. Nunes, **J. Vega**, M. Jafelicci Jr.; The role of PEG grafting on the thermoresponsive behavior of poly(n-isoproprylacrylamide)-based magnetic nanogels (poster), XIII Encontro da SBPMat, João Pessoa, 2014.

N. Ferreira, T. Perez, **J. Vega**, M. Germião; Hidrogéis de alginato para liberação de proteínas: determinação do peso molecular e perfil de intumescimento (poster), IV Congresso Farmacêutico da UNESP, Araraquara, 2014.

J. Vega, R.F.C Marques.; M. Jafelicci Jr.; Nanopartícula magnética funcionalizada com polímero termossensível (poster), 37ª Reunião Anual da SBQ, Natal, 2014.

J. Vega, G. Picasso; Obtención de nanopartículas de magnetita mediante el método sol-gel, XXVI Congreso Peruano de Química, Arequipa-Perú (poster), 2012.

Agradecimentos

A meus pais e minha irmã, pelo carinho, por confiar em mim e pela paciência em todos estes anos.

A meu orientador Prof. Dr. Miguel Jafelicci Júnior pela sua orientação e pela confiança no meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques pelas suas sugestões e apoio durante todo o tempo que estive trabalhando no grupo.

Aos colegas do Laboratório de Materiais Magnéticos e Coloides, pelas conversas, pelas discussões, pelo aprendizado e pelas brincadeiras.

Ao Prof. Dr. Abdelhamid Elaissari por ter me aceitado no seu grupo de pesquisa (LAGEP) para realizar o estagio de doutorado sanduíche.

Aos colegas do Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés (LAGEP) pelo apoio durante o estagio de doutorado sanduiche.

Aos técnicos e servidores do IQ Unesp/CAr que colaboraram com o desenvolvimento do presente trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

Lista de abreviaturas

^{1}H-NMR: Espectroscopia por ressonância magnética nuclear de hidrogênio

ASP: Ácido L-aspártico

BSA: Albumina de soro bovina

DMF: N, N-dimetilformamida

DH: Grau de hidrólise

Dh: diâmetro hidrodinâmico médio

DS: Grau de substituição

FTIR: Espectroscopia no infravermelho

HSA: Albumina de soro humano

LCST: Temperatura crítica inferior de solução

m/v: Massa/volume

ME: Agregados de SPION

PAA: Poli(ácido aspártico)

PIE: Ponto isoelétrico

PSI: Polissuccinimida

PNIPAAm: Poli(N-isopropilacrilamida)

PVP: Polivinilpirrolidona

SPION: Nanopartícula superparamagnética de óxido de ferro

Si-MN: Agregados de SPION modificados com sílica na superfície

TEOS: Ortossilicato de tetraetila

TEM: Microscopia Eletrônica de Transmissão

Lista de Figuras

Figura 1. Classificação dos estímulos aos quais respondem alguns polímeros. 23
Figura 2. Representação do comportamento responsivo ao pH de um polímero com grupos carboxila. 24
Figura 3. Representação do comportamento responsivo à temperatura de um polímero que apresenta LCST. 26
Figura 4. Síntese do PAA através da hidrólise da PSI. 28
Figura 5. Síntese de poliaspartamida através da aminólise da PSI. 30
Figura 6. Semelhança entre a PNIPAAm e a estrutura produzida pela aminólise da PSI (N-isopropilaspartamida). 31
Figura 7. Rota Sintética da PSI e seus derivados. Ácido L-aspártico (ASP), polissuccinimida (PSI), polissuccinimida responsiva à temperatura (PSI-TS), poli(ácido aspártico) responsivo à temperatura (PAA-TS) e poli(ácido aspártico) (PAA). 34
Figura 8. Cromatograma de permeação em gel da amostra PAA. 37
Figura 9. Espectros FTIR das amostras PAA, PAA-TS, PSI, PSI-TS. 39
Figura 10. Espectro ^{1}H-NMR de a) PSI e b) PSI-TS em DMSO-d_6 e c) PAA e d) PAA-TS em D_2O. 42
Figura 11. a) Transmitância em função da temperatura das soluções aquosas de PAA-TS e PSI-TS (0,5% m/v) a pH 3,4. b) Influência do pH na LCST de soluções aquosas de PAA-TS e PSI-TS (0,5% m/v). 44
Figura 12. Grau de substituição das poliaspartamidas em função do tempo de reação. 47
Figura 13. a) Transmitância em função da temperatura das soluções aquosas de amostras de PAA-TS com distintos graus de substituição (0,5% m/v) a pH 3,4. b) Efeito do grau de substituição (DS) no polímero PAA-TS na LCST a pH 3,4. 49
Figura 14. a) Suspensão de nanopartículas de magnetita atraídas por um imã. b) Estrutura cristalina da magnetita. 55
Figura 15. a) SPION empregadas como sistemas de liberação controlada. b) SPION empregadas na terapia por hipertermia magnética. 58
Figura 16. Esquema de separação magnética de peptídeos. 59
Figura 17. Representação de um SPION com a superfície modificada. 60
Figura 18. Esquema da modificação da superfície de SPION com sílica empregando um alcoxisilano. 63
Figura 19. Espectros FTIR de ácido oleico, SPION com ácido oleico na superfície (OAN), agregados de SPION (ME) e agregados de SPION modificados com sílica na superfície (Si-MN5). 69
Figura 20. Potencial zeta em função do pH de agregados de SPION (ME) e de agregados de SPION modificados com sílica na superfície (Si-MN5). 70
Figura 21. Espectros FTIR dos agregados de SPION modificados com sílica na superfície: Si-MN1, Si-MN2, Si-MN3, Si-MN4 e Si-MN5. 72
Figura 22. Diâmetro hidrodinâmico (Dh) das amostras Si-MN: Si-MN1, Si-MN2, Si-MN3, Si-MN4 e Si-MN5 de acordo com a incorporação de TEOS durante a síntese (Tabela 3). 72
Figura 23. Imagens TEM de: a) OAN e b) ME. 73
Figura 24. Esquema da modificação da superfície de SPION com ácido oleico. 75
Figura 25. Formação dos agregados de SPION. 76
Figura 26. Imagens TEM de: a) Si-MN1, b)Si-MN2 e c)Si-MN3. 77

Figura 27. Imagens TEM: a) Si-MN4 e b) Si-MN5. 79
Figura 28. Formação da casca de sílica ao redor do agregado de SPION. 80
Figura 29. Representação esquemática do Abraxane®. 83
Figura 30. Síntese de nanopartículas de sílica através do método de Stöber. 87
Figura 31. Espectros FTIR: a) Amostras preparadas variando a concentração de TEOS: BS1, BS2, BS3 e BSA-NP. b) Amostras preparadas variando a concentração de hidróxido de amônio: BS4, BS3, BS5 e BSA-NP. 94
Figura 32. Curvas termogravimétricas (TGA): a) Amostras preparadas variando a concentração de TEOS: BS1, BS2, BS3 e BSA-NP. b) Amostras preparadas variando a concentração de hidróxido de amônio: BS4, BS3, BS5 e BSA-NP. 97
Figura 33. Potencial zeta em função do pH: a) Amostras preparadas variando a concentração de TEOS: BS1, BS2, BS3 e BSA-NP. b) Amostras preparadas variando a concentração de hidróxido de amônio: BS4, BS3, BS5 e BSA-NP. 100
Figura 34. Imagens TEM e distribuição de tamanhos das nanopartículas: a) BSA-NP e b) BS1. 102
Figura 35. Imagens TEM e distribuição de tamanhos das nanopartículas: a) BS2 e b) BS3. ... 103
Figura 36. Imagens TEM e distribuição de tamanhos das nanopartículas: a) BS4 e b) BS5. ... 104
Figura 37. Derivadas dos gráficos TGA: a) BSA-NP e b) BS1. 109
Figura 38. Derivadas dos gráficos TGA: a) BS2 e b) BS3. 110
Figura 39. Derivadas dos gráficos TGA: a) BS4 e b) BS5. 111

Lista de Tabelas

Tabela 1. Atribuições das bandas características de amostras analisadas por espectroscopia infravermelho (FTIR) referentes aos grupos funcionais de polímeros PAA, PAA-TS, PSI, PSI-TS. 38
Tabela 2. Grau de substituição (DS) das amostras de PAA-TS em função do tempo de reação. 46
Tabela 3. Volumes de TEOS e de etanol utilizados para preparar amostras Si-MN. 66
Tabela 4. Quantidade de hidróxido de amônio e solução de TEOS usada para preparar as amostras. 91
Tabela 5. Características das nanopartículas de albumina (BSA-NP) e das nanopartículas híbridas (BS): tamanho médio, ponto isoelétrico e conteúdo de sílica. 96

Lista de Equações

Equação 1 62
Equação 2 62
Equação 3 74
Equação 4 86
Equação 5 86

Resumo

Biomateriais poliméricos e nanoestruturados foram preparados, caracterizados e suas propriedades foram investigadas visando avaliar o potencial de aplicação de biomateriais multifuncionais como sistemas de liberação de fármacos e agentes de separação magnética. As poliaspartamidas responsivas à temperatura obtidas pela reação de aminólise da polissuccinimida com a isopropilamina têm sido propostas como materiais promissores para aplicações biomédicas. Devido a que são susceptíveis à hidrólise, a temperatura crítica inferior de solução (LCST) das poliaspartamidas depende do pH. Um conjunto de amostras de poliaspartamidas com diferentes graus de hidrólise (DH) e grau de substituição (DS) foram preparadas. A influência do DH, do DS e do pH na LCST foi investigada. Os resultados sugerem que a LCST pode ser ajustada em função do DS, do DH e do pH permitindo o uso de poliaspartamidas responsivas em diferentes aplicações biomédicas. Agregados de nanopartículas magnéticas tem sido propostos como materiais adequados para processos de separação magnética. A síntese de agregados de nanopartículas óxido de ferro com uma casca de sílica na superfície foi realizada em três etapas. Primeiro, um ferrofluido orgânico foi preparado. Em seguida, o ferrofluido foi usado para preparar a emulsão magnética e posteriormente obteve-se agregados de nanopartículas de óxido de ferro com tamanhos similares. Finalmente, os agregados foram recobertos com uma casca de sílica usando o processo sol-gel e o TEOS como precursor. Foi investigado o processo de formação da casca de sílica em função do teor de TEOS. Determinou-se aproximadamente a quantidade mínima de TEOS necessária para induzir a formação da casca de sílica ao redor dos agregados de nanopartículas de óxido de ferro. A deposição de sílica começa nos interstícios dos agregados e depois forma a casca na superfície dos agregados. A espessura da casca de sílica depende da concentração de TEOS utilizada durante a síntese. As nanopartículas híbridas podem combinar as funções de diagnóstico e terapia de seus componentes em um único sistema nanoestruturado e, portanto, podem ser ajustadas de acordo com as aplicações almejadas. Nanopartículas hibridas de sílica tem recebido grande interesse na área biomédica pela capacidade de combinar em um único sistema as propriedades da sílica com as funcionalidades oferecidas pelos componentes orgânicos e biológicos. A albumina, uma proteína natural, possui a habilidade de formar ligações com uma ampla variedade de moléculas. Portanto, pode servir como um excelente transportador de fármacos e outras biomoléculas. Nanopartículas híbridas de

sílica e albumina foram sintetizadas através da deposição de sílica em molde nas nanopartículas de albumina. Foi investigado o efeito da concentração de TEOS e de hidróxido de amônio nas características das nanopartículas híbridas. Foram obtidas nanopartículas esféricas com tamanhos homogêneos. Os resultados sugerem que o tamanho das partículas, o ponto isoelétrico e o conteúdo de sílica das nanopartículas dependem da concentração de TEOS e hidróxido de amônio usado na síntese. A distribuição de sílica nas nanopartículas de albumina não foi uniforme, aparentemente variou com as condições de síntese. Os biomateriais preparados apresentaram características preliminares adequadas para as aplicações previstas nos capítulos da tese. Porém, é necessário continuar os trabalhos com ensaios de biocompatibilidade e testes de aplicação tecnológica.

Abstract

Polymeric and nanostructured biomaterials were prepared, characterized and their properties were investigated in order to evaluate the potential of application of multifunctional biomaterials as drug release systems and magnetic separation agents. The temperature-responsive polyaspartamides obtained by the aminolysis reaction of polysuccinimide with isopropylamine have been proposed as promising materials for biomedical applications. Because they are susceptible to hydrolysis, the lower critical solution temperature (LCST) of the polyaspartamides is pH dependent. A set of polyaspartamide samples with different degrees of hydrolysis (DH) and degree of substitution (DS) were prepared. The influence of DH, DS and pH on LCST was investigated. The results suggest that LCST can be adjusted as a function of DS, DH and pH allowing the use of responsive polyaspartamides in different biomedical applications. Magnetic nanoparticle aggregates have been proposed as suitable materials for magnetic separation processes. The synthesis of aggregates of iron oxide nanoparticles with a surface silica shell was performed in three steps. First, an organic ferrofluid was prepared. Thereafter, the ferrofluid was used to prepare the magnetic emulsion and subsequently aggregates of iron oxide nanoparticles with similar sizes were obtained. Finally, the aggregates were coated with a silica shell using the sol-gel process and TEOS as precursor. The process of formation of silica shell was investigated according to the content of TEOS. The minimum amount of TEOS required to induce the formation of the silica shell around the iron oxide nanoparticle aggregates was determined. Silica deposition begins at the interstices of the aggregates and then forms the shell on the surface of the aggregates. Hybrid nanoparticles can combine the diagnostic and therapeutic functions of their components into a single nanostructured system and therefore can be adjusted according to the intended applications. Hybrid silica and albumin nanoparticles were synthesized by deposition of silica in template onto albumin nanoparticles. The effect of TEOS and ammonium hydroxide on the characteristics of hybrid nanoparticles was investigated. Spherical nanoparticles with homogeneous sizes were obtained. The results suggest that the particle size, isoelectric point and silica content of the nanoparticles depend on the concentration of TEOS and ammonium hydroxide used in the synthesis. The prepared biomaterials presented adequate preliminary characteristics for the applications intended in the thesis chapters.

Sumario

Motivação 19

Prefácio 20

Objetivo Geral da Tese 21

Capítulo 1: Poliaspartamida responsiva à temperatura e ao pH 22

1. Introdução 22

1.1. Polímeros responsivos a estímulos 22

1.2. Polímeros responsivos ao pH 23

1.3. Polímeros responsivos à temperatura 25

1.4. Polímeros responsivos ao pH e à temperatura 26

1.5. Polímeros biocompatíveis e biodegradáveis 27

1.6. Polissuccinimida, poli(ácido aspártico) e poliaspartamidas 27

2. Objetivos 32

3. Experimental 32

3.1. Materiais e reagentes 32

3.2. Síntese da polissuccinimida (PSI) 32

3.3. Síntese de polissuccinimida responsiva à temperatura (PSI-TS) 32

3.4. Síntese de poli (ácido aspártico) responsivo à temperatura (PAA-TS) e poli (ácido aspártico) (PAA) 33

3.5. Síntese de poli (ácido aspártico) responsivo à temperatura com diferentes graus de substituição (PAA-TS) 33

3.6. Caracterização das amostras 34

3.6.1. Espectroscopia no infravermelho (FTIR) 34

3.6.2. Espectroscopia por ressonância magnética nuclear (^{1}H-NMR) 35

3.6.3. Cromatografia de permeação em gel (GPC) 35

3.6.4. Determinação da LCST 35

4. Resultados e discussão 36

4.1. Caracterização dos polímeros produzidos 36

4.1.1. Cromatografia de permeação em gel (GPC) 36

4.1.2. Espectroscopia no infravermelho (FTIR) 37

4.1.3. Espectroscopia por ressonância magnética nuclear (^{1}H-NMR) 40

4.2. Determinação da LCST 43

4.2.1. A influência do pH e do grau de hidrólise na LCST 43

4.2.2. A influência do grau de substituição na LCST 46

5. Conclusões 50
6. Sugestões para trabalhos futuros 50
Capitulo 2: Preparação e caracterização de agregados de óxido de ferro recobertos com uma casca de sílica 51
1. Introdução 51
1.1. Nanomateriais 51
1.2. Nanopartículas de óxido de ferro 53
1.3. Modificação da superfície de nanopartículas de óxido de ferro 59
1.4. Modificação da superfície de nanopartículas de óxido de ferro com sílica 61
2. Objetivos 65
3. Experimental 65
3.1. Materiais e reagentes 65
3.2. Preparação do ferrofluido orgânico 65
3.3. Preparação de agregados de SPION (ME) 66
3.4. Preparação de agregados de SPION modificados com sílica na superfície (Si-MN) 66
3.5. Caracterização das amostras 67
3.5.1. Medidas de diâmetro hidrodinâmico (Dh) 67
3.5.2. Medidas de Potencial Zeta 67
3.5.3. Espectroscopia no infravermelho (FTIR) 67
3.5.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) 67
4. Resultados e discussão 68
4.1. Caracterização das nanopartículas e nanoestruturas 68
4.1.1. Espectroscopia no infravermelho (FTIR) 68
4.1.2. Curvas de potencial zeta 69
4.2. Influencia da quantidade do TEOS nas propriedades das amostras Si-MN 71
4.2.1. Espectroscopia no infravermelho (FTIR) 71
4.2.2. Medidas de diâmetro hidrodinâmico (Dh) 71
4.2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) 73
5. Conclusões 81
6. Sugestões para trabalhos futuros 81
Capítulo 3: Síntese e caracterização de nanopartículas híbridas de sílica e albumina 82
1. Introdução 82
1.1. Albumina 82
1.2. Nanopartículas híbridas 84

1.3. Nanopartículas de sílica e nanopartículas híbridas de sílica 86
2. Objetivos 90
3. Experimental 90
3.1. Materiais e reagentes 90
3.2. Nanopartículas de BSA (BSA-NP) 90
3.3. Preparação de nanopartículas híbridas BSA-sílica (BS) 91
3.4. Caracterização de amostras 92
3.4.1. Espectroscopia no infravermelho (FTIR) 92
3.4.2. Medidas de potencial zeta 92
3.4.3. Análise termogravimétrica (TGA) 92
3.4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) 92
4. Resultados e discussão 93
4.1. Caracterização das nanopartículas produzidas 93
4.1.1. Espectroscopia no infravermelho (FTIR) 93
4.1.2. Análise termogravimétrica (TGA) 95
4.1.3. Medidas de potencial zeta 98
4.1.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) 101
5. Conclusões 107
6. Sugestões para trabalhos futuros 107
Conclusão Geral da Tese 108
Anexo 1 109
Referências 112

Motivação

Os biomaterias são materiais destinado a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, incrementar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo. Assim os biomateriais melhoram a qualidade de vida dos seres humanos e de outros animais. O desenvolvimento de novos biomateriais é um campo multidisciplinar em continuo crescimento o qual recebe aportes da física, química, biologia, engenharia de materiais e biomedicina. Particular interesse tem recebido os polímeros responsivos a estímulos e as nanoestruturas pelas propriedades únicas que introduzem novas funcionalidades e a versatilidade para atuar em distintos ambientes biológicos. Esta tese apresenta contribuições na elaboração de biomateriais poliméricos e nanoestruturados que representam um avanço na engenharia de materiais. Atualmente procura-se um substituto ao PNIPAAm que possua as mesmas características, porém que apresente uma maior biocompatibilidade, assim o primeiro biomaterial preparado é a poliaspartamida que poderia ser o candidato a substituto de PNIPAAm.

A técnica de separação magnética pode ser empregada na separação de ácidos nucleicos. Para diminuir o tempo de separação é necessário utilizar materiais que respondam rapidamente à presença de um campo magnético. Os agregados de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPION) são separadas rapidamente de uma suspensão aquosa em presença de um campo magnético externo, o segundo biomaterial preparado são agregados de SPION recobertos com sílica os quais poderiam ser utilizados na técnica de separação magnética de ácidos nucleicos.

A albumina forma parte da formulação de sistemas de liberação controlada de fármacos por sua capacidade de interagir com biomoléculas. O Abraxane® é um sistema de liberação controlada baseado em nanopartículas de albumina disponível no mercado. Atualmente existe um interesse em aprimorar as capacidades destes sistemas. A introdução de sílica nas nanopartículas de albumina fornece ao sistema novas funcionalidades. O terceiro biomaterial preparado neste trabalho são nanopartículas híbridas de albumina e sílica, as quais poderiam ser utilizadas como sistemas de liberação controlada de fármacos.

Prefácio

Esta tese de doutorado foi elaborada de maneira que o leitor possa compreender isoladamente as amostras dos materiais preparados. Cada capítulo foi dividido da seguinte forma: introdução com uma revisão dos principais conceitos necessários para compreender o capitulo, objetivos, materiais e métodos, resultados e discussão e as conclusões.

No Capítulo 1 descreve-se a síntese e caracterização de uma série de poliaspartamidas responsivas à temperatura e ao pH. Avalia-se a influência do grau de hidrólise, do grau de substituição e do pH na temperatura crítica inferior de solução (LCST) das poliaspartamidas.

No Capítulo 2 descreve-se a elaboração de agregados de nanopartículas de óxido de ferro de tamanhos homogêneos envolvidos por uma casca de sílica. As condições necessárias para a formação da casca de sílica na superfície são estudadas.

No Capítulo 3 descreve-se a preparação de nanopartículas híbridas compostas por albumina de soro bovino e sílica através do método de deposição em molde. Foi estudada a influência da quantidade do precursor de sílica e do catalisador nas propriedades das nanopartículas híbridas preparadas.

Objetivo Geral da Tese

Esta tese de doutorado tem por objetivos gerais as preparações de três tipos de biomateriais visando a:

1. Contribuir para a preparação de poliaspartamida responsiva à temperatura com propriedades físico-químicas adequadas como candidata à substituição de PNIPAAm.

2. Obter partículas homogêneas formadas por agregados de nanopartículas de óxidos de ferro recobertos por uma casca de sílica para atuar como adsorventes no processo de separação magnética de ácidos nucleicos.

3. Desenvolver nanopartículas híbridas de albumina e sílica e propor como um potencial sistema de liberação controlada de fármacos.

Capítulo 1: Poliaspartamida responsiva à temperatura e ao pH

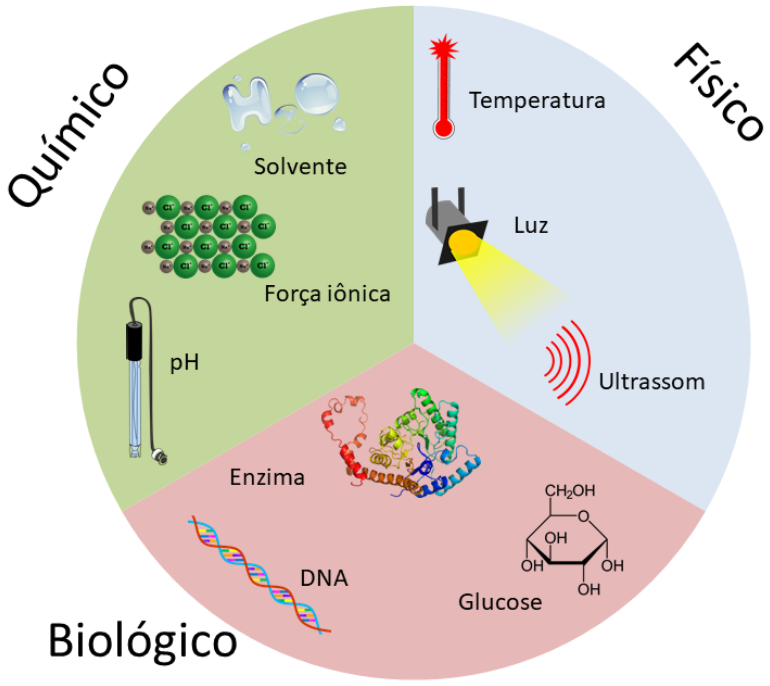
1. Introdução

1.1. Polímeros responsivos a estímulos

Polímeros responsivos a estímulos sofrem mudanças físicas e químicas abruptas em resposta a um estímulo (mudanças no ambiente). Em nível macromolecular as cadeias poliméricas podem ser alteradas de diferentes maneiras, incluindo mudanças no equilíbrio entre regiões hidrofílicas e hidrofóbicas, conformação macromolecular, grau de associação intermolecular, solubilidade, degradação e clivagem de ligações, e estas causarão mudanças físico-químicas detectáveis [1]. Uma característica importante deste tipo de material é a reversibilidade, isto é, a capacidade do polímero para retornar ao seu estado inicial quando as condições iniciais são restauradas. Os estímulos são comumente classificados em três categorias: físico, químico ou biológico. Estímulos físicos (luz, temperatura, ultrassom, campo magnético, campo elétrico) geralmente modificam a dinâmica da cadeia, ou seja, a energia do sistema polímero/solvente, enquanto estímulos químicos (solvente, força iônica, potencial redox, pH) modulam interações moleculares entre moléculas de polímero e solvente, ou entre as cadeias poliméricas. Estímulos biológicos (enzimas e outras biomoléculas) relacionam-se com o funcionalidade real das moléculas: reações enzimáticas e reconhecimento de receptor de moléculas [1]. Além disso, existem os polímeros que respondem simultaneamente a mais de um estímulo [2]. Uma ilustração com as três categorias de estímulos está esquematizada na Figura 1.

Nos últimos anos, os polímeros responsivos a estímulos receberam grande interesse devido às suas destacadas propriedades para o campo tecnológico, principalmente em múltiplas aplicações biomédicas, tais como em sistemas de transporte e liberação controlada (fármaco, genes, etc.), engenharia de tecidos, bioanálise, geração de imagens, etc.. Polímeros estruturados responsivos a estímulos, tais como dendrímeros, micelas, vesículas, nanopartículas e superfícies responsivas mostraram resultados favoráveis no diagnóstico e tratamento de doenças, o que os torna uma ferramenta comumente utilizada em biomedicina [3, 4].

Figura 1. Classificação dos estímulos aos quais respondem alguns polímeros.



Elaborado pelo autor.

1.2. Polímeros responsivos ao pH

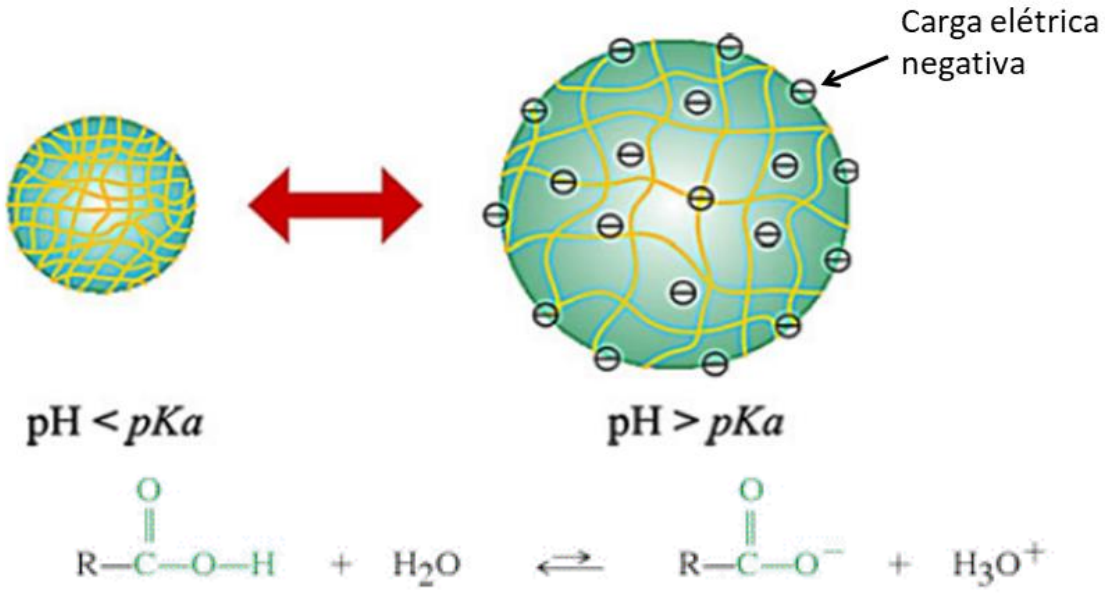
Polímeros responsivos ao pH normalmente contêm grupos fracamente ácidos (grupo carboxila) ou grupos fracamente básicos (grupo amina), estes liberam prótons ou aceitam prótons, respectivamente, em resposta ao pH do ambiente. Sob certos valores de pH, os grupos funcionais apresentados ao longo da cadeia principal e das cadeias laterais do polímero podem ser dissociados, o que leva a uma mudança conformacional, resultando na sua expansão ou dissolução [1]. Em um polímero com grupos carboxila, um aumento no pH (acima do pK_a) gera um aumento no grau de ionização, ou seja uma maior quantidade de grupos carboxila (-COOH) transforma-se em grupos carboxilato ($-COO^-$), resultando em maior repulsão eletrostática entre as cadeias e em um aumento na afinidade do polímero pela água. Assim, estes polímeros experimentam uma transição de fase hidrofílica/hidrofóbica induzida por mudanças no pH. A Figura 2 ilustra este comportamento. A transição de fase acontece perto do valor de pKa associado ao grupo carboxila do polímero. O estado de dissociação nestes materiais é facilmente revertido pelo restabelecimento do pH da solução, assim, o comportamento de comutação de materiais responsivos ao pH é reversível. Um comportamento similar acontece em polímeros com seções básicas como o grupo amina, porém o grau de dissociação

aumenta ao diminuir o pH. Por outra parte, ligações lábeis responsivas ao pH, tais como hidrazona, imina, acetal, etc. são estáveis no pH fisiológico, porém, são hidrolisadas quando são transportados para ambientes com outro valor de pH [5].

O pH é um parâmetro ambiental importante para aplicações biomédicas porque ocorrem mudanças de pH em muitos compartimentos específicos ou tecidos patológicos. O valor do pH é de aproximadamente 7,4 na circulação sanguínea e nos tecidos saudáveis, enquanto que o pH dos sítios extracelulares do tumor e dos tecidos inflamados é aproximadamente 6,5. O valor do pH pode até diminuir no citoplasma intracelular ou nas organelas celulares, tais como os endossomas (pH ~ 5-6), os lisossomas (pH ~ 4-5) e o aparelho de Golgi (pH ~ 6,4) [4, 5]. Os gradientes significativos de pH no trato gastrointestinal que passam de um intervalo de pH 1-3 no estômago para um intervalo de pH 5-8 no intestino, fornecem boas condições para a para administração oral de fármacos [6].

Os polímeros responsivos ao pH sofrem alterações de conformação ou clivagem de ligações em valores de pH específicos [5]. Os polímeros responsivos ao pH mais utilizados são: quitosana, poli(ácido acrílico), polietilenoimina, polilisina, poli(ácido metacrílico), poli(ácido glutâmico), polivinilpirrolidona, polihistidina, entre outros [1, 5].

Figura 2. Representação do comportamento responsivo ao pH de um polímero com grupos carboxila.



Adaptado de S. Huang et al. [136]

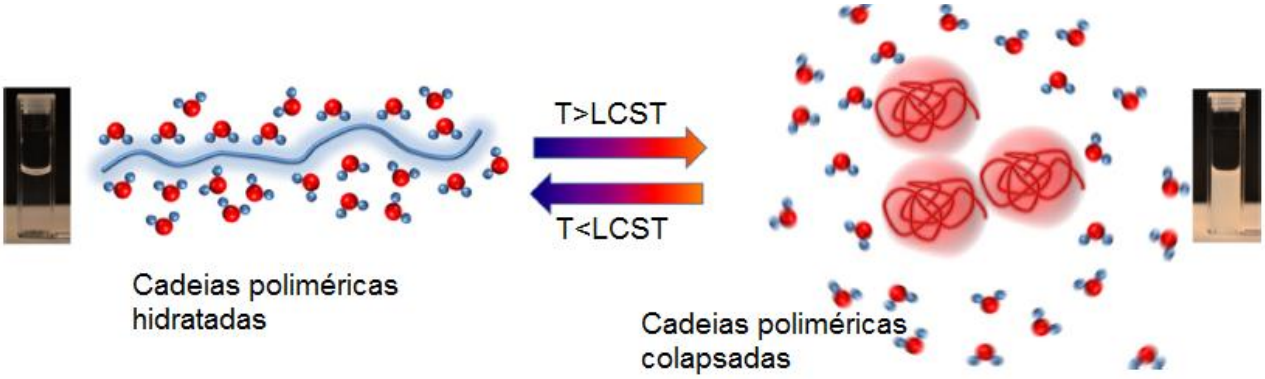
1.3. Polímeros responsivos à temperatura

Os polímeros responsivos à temperatura, conhecidos também como polímeros termorresponsivos exibem uma transição de fase a certa temperatura em torno da qual as interações hidrofóbicas e hidrofílicas entre as cadeias poliméricas e o meio aquoso mudam abruptamente dentro de uma pequena faixa de temperatura. Isto pode ser visto como uma mudança na solubilidade do polímero causada pelas alterações na configuração da cadeia polimérica. Os polímeros termorresponsivos que se tornam insolúveis após aquecimento têm uma temperatura crítica inferior de solução (LCST). Por outra parte, polímeros termorresponsivos que se tornam solúveis após o aquecimento têm uma temperatura crítica superior de solução (UCST) [7]. Num polímero com LCST a eficiência das interações solvente-polímero diminui com o aumento da temperatura, ocorrendo um aumento na associação de ligações hidrofóbicas, enquanto as ligações de hidrogênio entre o polímero e a água enfraquecem, resultando na separação de fases acima da LCST. O valor de LCST define, portanto, a temperatura na qual o polímero transita de uma formação de cadeias poliméricas hidratadas e solúveis em água para um estado de glóbulo colapsado e insolúvel, o qual pode ser observado macroscopicamente como uma transição de uma solução translucida para uma suspensão turva [8]. Uma representação esquemática desse fenômeno é ilustrada na Figura 3. A LCST (ou UCST) pode ser finamente ajustada alterando a composição química e a massa molar do polímero. Pela incorporação de monômeros que apresentam domínios hidrofílicos ou domínios hidrofóbicos, a LCST do copolímero resultante aumenta ou diminui, respectivamente. Alternativamente, os polímeros podem ser reticulados para formar hidrogéis, nesse caso, a temperatura de transição é conhecida como temperatura de transição de fase volumétrica (VPTT) [9].

O polímero termorresponsivo mais estudado e usado como modelo em sistemas com possíveis aplicações biomédicas é a poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), devido ao valor de LCST ser próximo da temperatura do corpo humano, à síntese não complicada, à transição de fase nítida e à copolimerização fácil com outros monômeros. Outros polímeros também utilizados são poli(N,N-dietilacrilamida), poli(N-vinilcaprolactama) (PNVCL), poli(2-isopropil-2-oxazolina), poli(metilvinileter), polímeros derivados da agarose ou celulose, etc [7, 8]. A maioria das aplicações biomédicas desses polímeros baseia-se na mudança de temperatura, como por exemplo da temperatura ambiente para a temperatura do corpo, a qual induz alterações nas

propriedades físico-químicas do polímero. Por exemplo, o processo de gelificação é empregado especialmente em aplicações tópicas e em *scaffolds* biodegradáveis injetáveis. Aplicações em cultura de células utilizam os polímeros termorresponsivos como substratos para regular a adesão das células à superfície. Sistemas de transporte e liberação controlada são elaborados a partir de polímeros termorresponsivos para armazenar moléculas com atividade biológica e liberá-las especificamente no tecido desejado quando se produz uma mudança de temperatura [6, 8].

Figura 3. Representação do comportamento responsivo à temperatura de um polímero que apresenta LCST.



Adaptado de V. De La Rosa et al. [137]

1.4. Polímeros responsivos ao pH e à temperatura

Em um esforço para aumentar a eficácia terapêutica dos sistemas responsivos a estímulos, polímeros sofisticados que respondem a estímulos duplos ou múltiplos foram desenvolvidos. Os polímeros responsivos ao pH e à temperatura estão entre os sistemas de dupla responsividade mais estudados. Muitos são concebidos e preparados incorporando componentes sensíveis ao pH (ácidos fracos ou bases fracas), em polímeros termorresponsivos, o que confere aos copolímeros resultantes uma LCST dependente do pH. A combinação de propriedades responsivas ao pH e à temperatura em uma plataforma única permite alterações físico-químicas no polímero em meios biológicos, como a variação na estrutura conformacional e na solubilidade, resultando em um sistema adequado de administração de fármacos para administração oral, uma vez que o ambiente do trato gastrointestinal pode controlar as propriedades do polímero multiresponsivo [2].

1.5. Polímeros biocompatíveis e biodegradáveis

Um biomaterial pode ser definido como um material destinado a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar, incrementar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo [10]. O pré-requisito essencial para qualificar um material como um biomaterial é a biocompatibilidade, que é a capacidade de um material para atuar em uma aplicação específica com uma resposta apropriada do hospedeiro. Em geral, elevado grau de biocompatibilidade é conseguido quando o material interage com o corpo sem induzir resposta tóxica, imunogênica, ou cancerígena. Geralmente, a depuração dos polímeros em aplicações biomédicas é muitas vezes um objetivo desejável após a sua introdução no corpo e o desempenho de sua função [11].

Polímeros biodegradáveis, ou seja, aqueles que são degradados internamente e posteriormente eliminados do organismo são preferidos muitas vezes mais do que polímeros não-biodegradáveis, porque eles não exigem remoção futura [11]. A biodegradação de polímeros envolve a clivagem das ligações no polímero em presença de água ou enzimas, o que produz a degradação do polímero. Polímeros sintéticos e de derivados biológicos (ou naturais) têm sido amplamente estudados como biomateriais poliméricos biodegradáveis.

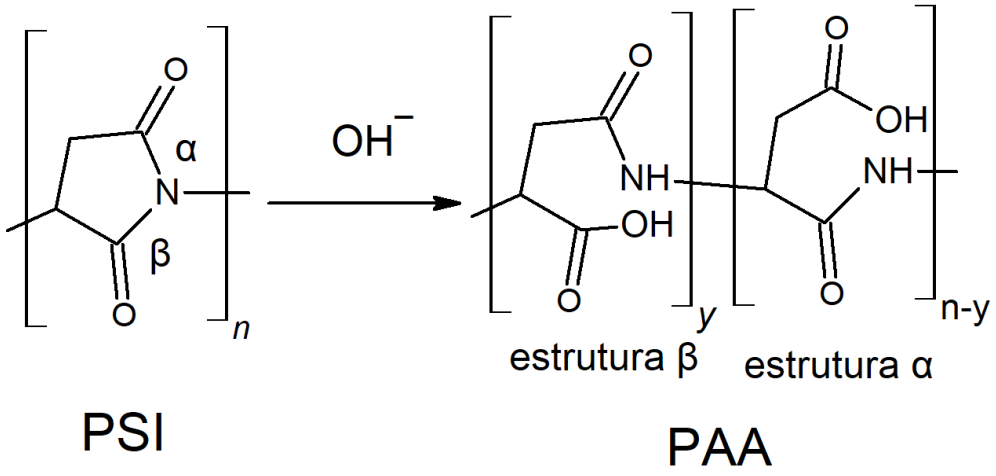
Os polímeros biodegradáveis e biocompatíveis mais utilizados são o poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli-ε-caprolactona (PCL), quitosana e gelatina [11]. Algumas das aplicações biomédicas atuais de materiais poliméricos biodegradáveis incluem: (a) grandes implantes, tais como parafusos dos ossos, placas ósseas e reservatórios contraceptivos, (b) pequenos implantes, tais como grampos, suturas e nano ou micro veículos de liberação controlada de fármacos, (c) membranas lisas e para a regeneração guiada de tecidos, e (d) malhas de multifilamentos ou estruturas porosas para a engenharia de tecidos [10].

1.6. Polissuccinimida, poli(ácido aspártico) e poliaspartamidas

A polissuccinimida (PSI) é um polímero biodegradável e biocompatível, cuja unidade monomérica é a succinimida, uma imida cíclica de 5 membros, representada na Figura 4. O carbono do grupo carbonila da unidade monomérica é susceptível a ataques nucleofílicos [12, 13]. Aproveitando esta característica foram produzidos muitos derivados poliméricos da PSI. O processo mais utilizado para sintetizar a

polissuccinimida é a policondensação térmica do ácido aspártico em uma atmosfera inerte, geralmente catalisada com ácido fosfórico, um método de síntese fácil e que não produz subprodutos tóxicos. A PSI também pode ser obtida pela reação de anidrido maleico e amônia, a limitação deste método é que produz polímeros com baixa massa molar (1000 – 3000 g/mol). PSI com maior massa molar (> 5000 g/mol) é usada principalmente como agente espessante, modificador de viscosidade e umectante ou em muitas aplicações biomédicas, tais como imobilização enzimática e entrega de drogas [12]. PSI, assim como seus copolímeros e polímeros derivados são aplicados como inibidores de corrosão, inibidores de incrustações minerais, aditivos para cosméticos e produtos de toucador e higiene pessoal, intensificadores de absorção de nutrientes para plantas, lubrificantes para correias transportadoras, agentes preventivos para o tártaro na preparação de dentífricos e hidrogéis para aplicações médicas [12].

Figura 4. Síntese do PAA através da hidrólise da PSI.



Elaborado pelo autor.

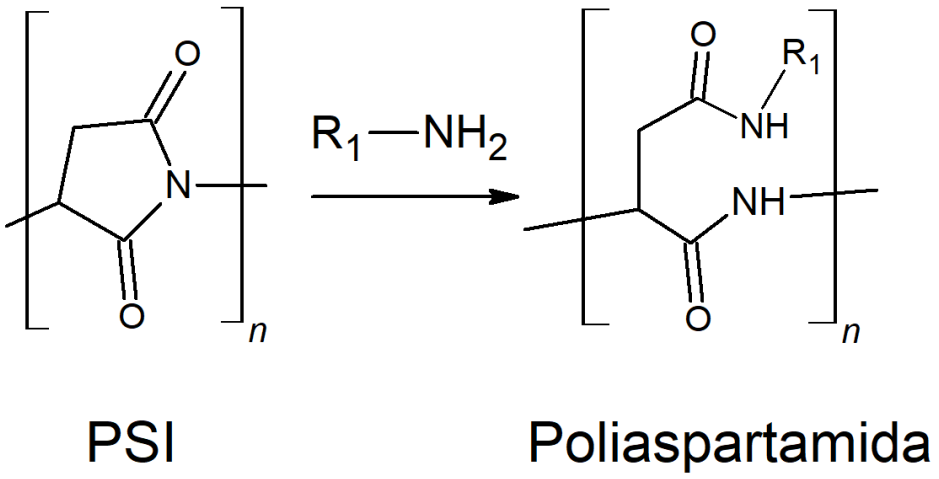
O poli(ácido aspártico) (PAA) é preparado pela hidrólise básica da PSI. Uma representação esquemática da hidrólise de PSI é mostrada na Figura 4. Devido a que PSI tem dois sítios reativos para a hidrólise, o PAA é um polímero formado por duas unidades monoméricas isoméricas conhecidas como estrutura α e estrutura β. A razão entre as unidades α e β no PAA pode ser alterada ajustando-se o pH do meio no qual a hidrólise ocorre. Quanto mais elevado o pH do meio, menor será proporção da estrutura

α no produto [12]. A proporção dessas unidades é quase não influenciada pela força iônica e temperatura. O PAA é um polímero com uma estrutura similar às proteínas, solúvel em água, biocompatível e biodegradável (os produtos da degradação não são tóxicos). Devido a estas caraterísticas é atrativo para aplicações em biomedicina, cosméticos e alimentos. Também é considerado como um produto químico sustentável e ecologicamente correto. Este polímero iônico é usado como material de troca de íons metálicos para remover resíduos metálicos de águas residuais, como um anti-incrustante, detergente, dispersante, fertilizante, como agente quelante e complexante, em cosméticos e em creme dental para evitar a formação de placa [12]. Hidrogéis de poli(ácido aspártico) sensíveis ao pH são formados por cadeias de poli(ácido aspártico) reticuladas quimicamente. Eles apresentam capacidade de absorver grandes quantidades de água, esta capacidade é depende do pH do meio ambiente, portanto ao variar o pH do ambiente, o hidrogel sofre intumescimento ou encolhimento [14, 15]. O PAA degrada rapidamente sob condições biológicas e fisiológicas. A biodegradabilidade do PAA pode ser influenciada pelas estruturas ramificadas e pelos grupos terminais irregulares. Foi reportado que o PAA preparado na presença de catalisador ácido foi significativamente mais biodegradável (100% de degradação) do que o PAA sintetizado via polimerização térmica sem catalisador ácido [12].

As poliaspartamidas, derivados da PSI que são produzidos por aminólise, têm sido amplamente propostas para aplicações biomédicas na entrega de fármacos, entrega de genes, *scaffolds* de gel entre outras. Estas poliamidas são formadas pelo ataque de uma molécula com um grupo amina (normalmente amina primaria) aos anéis da PSI, produzindo ligações amida através de ambos grupos carboxíla α e β nos anéis imida [12]. Uma representação desta síntese pode ser observada na Figura 5 e por simplicidade foi considerado só a formação de estruturas α. As poliaspartamidas são semelhantes às proteínas e pode-se pressupor que estes compostos são clivados e degradados no corpo em pequenos peptídeos. Essas pequenas frações não são tóxicas e são facilmente eliminadas. Usualmente a síntese de poliaspartamidas acontece em DMSO ou DMF devido a que conseguem dissolver a PSI e são solventes apróticos o que favorece a reação da amina com os anéis da PSI. Devido a fácil reação entre a PSI e as aminas primarias, muitas poliaspartamidas com distintas funcionalidades tem sido preparadas para aplicações em biomedicina. Destacam especialmente as poliaspartamidas responsivas a estímulos como temperatura (PSI + isopropilamina)

[16], pH (PSI + 3-(dietilamino)propilamina) [17], potencial redox (PSI + cistamina) [18], poliaspartamida multirresponsivas [19], etc.

Figura 5. Síntese de poliaspartamida através da aminólise da PSI.

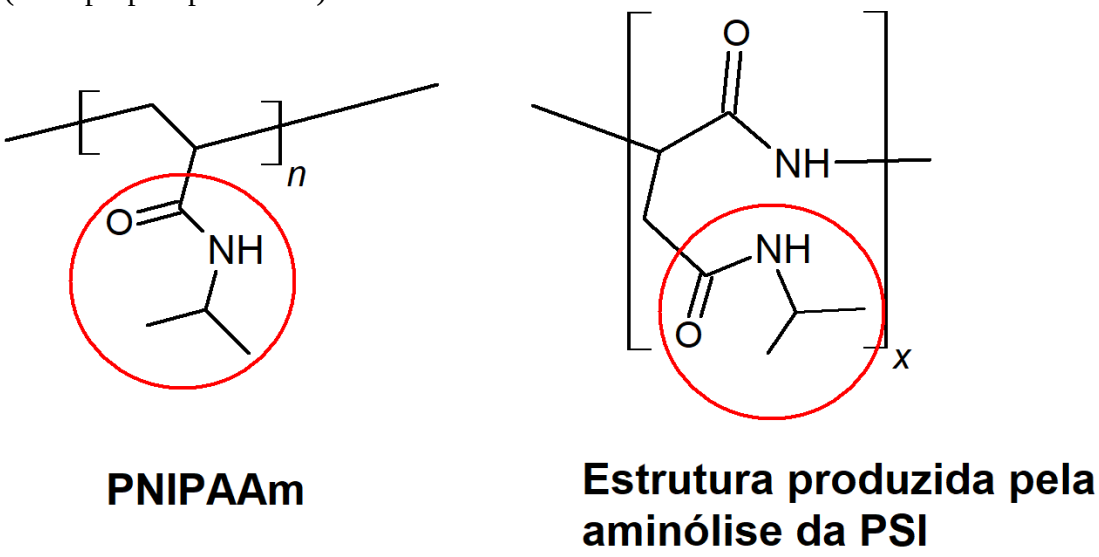


Elaborado pelo autor.

A reação da PSI com isopropilamina produz uma poliaspartamida com uma unidade de repetição (unidade N-isopropilaspartamida) semelhante à PNIPAAm (Figura 6). Devido à esta semelhança, a poliaspartamida possui um comportamento responsivo à temperatura, e portanto torna a poliaspartamida um substituto importante da PNIPAAm. No entanto, nem todas as succininimidas da PSI reagem com a isopropilamina devido ao impedimento estereoquímico do volumoso grupo isopropila da isopropilamina. Portanto, esta molécula sofre impedimento estérico para reagir com grupos succinimida que estejam perto de unidades N-isopropilaspartamida, pois estas unidades também possuem o grupo isopropila volumoso. Artigos científicos tem reportado que no máximo somente 80% das succinimidas na PSI reagem com a isopropilamina [16]. Gu et al. [16] estudaram o efeito dos grupos pendentes no comportamento sensível à temperatura, substituindo os grupos succinimida remanescentes usando aminas lineares que reagem eficientemente, porque não apresentam impedimento estérico. Tanimoto et al. [20] propuseram a reação de PSI com isopropilamina e reconheceram as succinimidas remanescentes. No entanto, eles não consideraram que a hidrólise da

succinimida remanescente acontece mesmo em pH 7 produzindo grupos carboxila responsivos ao pH, pelo qual a LCST das poliaspartamidas dependem do pH da solução [21, 22]. Portanto, a proposta deste capitulo é avaliar a influência do pH, o grau de hidrólise e o grau de substituição na LCST de poliaspartamidas.

Figura 6. Semelhança entre a PNIPAAm e a estrutura produzida pela aminólise da PSI (N-isopropilaspartamida).



Elaborado pelo autor.

2. Objetivos

-Preparar poliaspartamidas responsivas ao pH e à temperatura a partir da polissuccinimida, como possíveis substitutos à PNIPAAm.

-Caracterizar as propriedades físico-químicas dos polímeros preparados através das técnicas GPC, FTIR, ^{1}H-NMR e medidas de transmitância UV-Vis em função da temperatura para determinar a LCST.

-Avaliar a influencia do pH, do grau de hidrólise e do grau de substituição na LCST dos polímeros obtidos.

3. Experimental

3.1. Materiais e reagentes

N, N-dimetilformamida (DMF, 99,8%), ácido L-aspártico (ASP, 98%), isopropilamina (99,5%) e membrana de celulose para dialise (MWCO 14 kDa) foram adquiridos de Sigma-Aldrich. Hidróxido de sódio (NaOH, 97,0%) e ácido fosfórico (H_3PO_4, 85%) foram obtidos da Synth. Éter etílico (98,0%) foi adquirido à Quemis.

3.2. Síntese da polissuccinimida (PSI)

A PSI foi sintetizada a partir do ácido L-aspártico (ASP) pelo método de policondensação térmica de acordo com JC Yeh et al [23]. Uma mistura de ASP e ácido fosfórico 10:1 (massa) foi introduzida num balão de vidro de fundo redondo equipado com condensador e armadilha Dean-Stark e aquecido a 200°C sob fluxo de argônio durante 24 horas. O polímero obtido foi lavado com metanol e água deionizada 7 vezes e depois a amostra foi seca a 60 °C em uma estufa por 24 horas.

3.3. Síntese de polissuccinimida responsiva à temperatura (PSI-TS)

PSI (0,2 g) foi dissolvida em 2,4 mL de DMF a 70 °C durante 3 horas. Após resfriar a solução até 30 °C, adicionou-se 1,4 mL de isopropilamina à solução e manteve-se sob agitação magnética durante 36 horas. Éter etílico frio (5 °C) foi

adicionado à solução para promover a precipitação do polímero. O precipitado foi lavado quatro vezes com éter etílico frio e seco a 50 °C durante 24 horas.

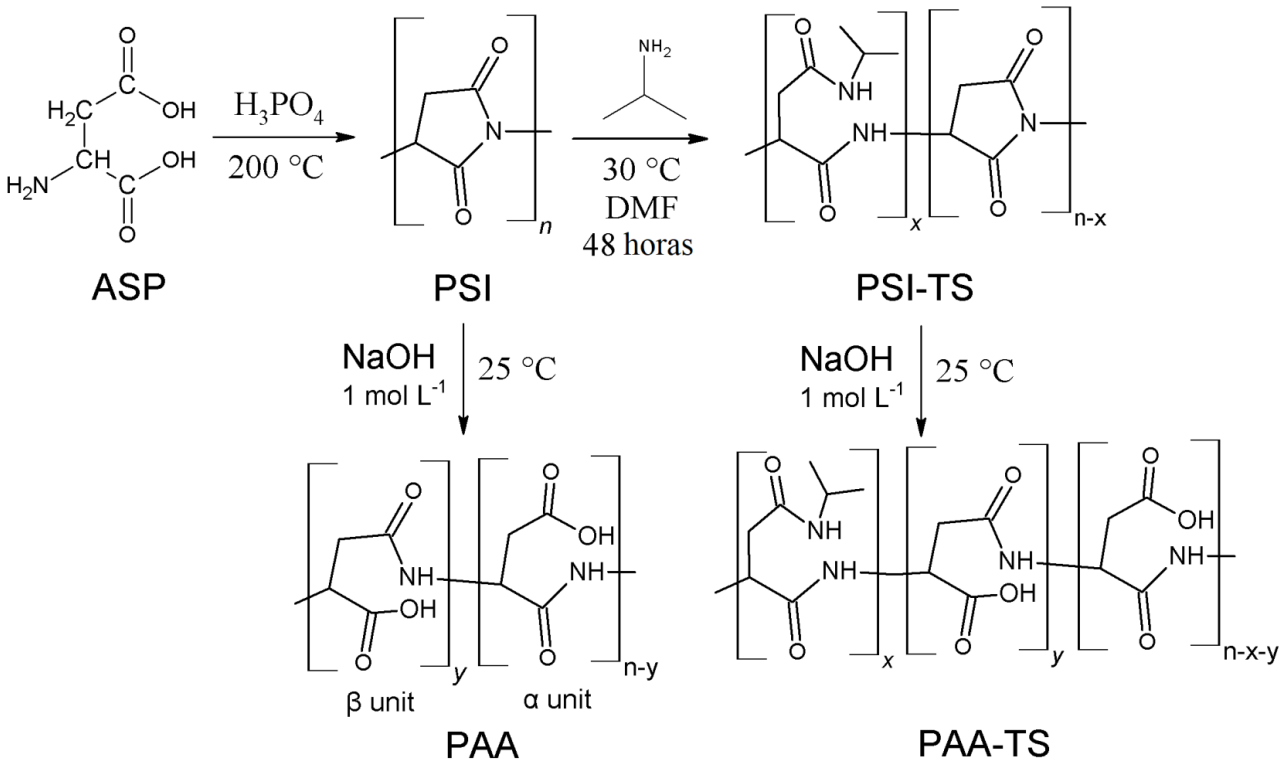
3.4. Síntese de poli (ácido aspártico) responsivo à temperatura (PAA-TS) e poli (ácido aspártico) (PAA)

Dissolveu-se PSI-TS numa solução aquosa de NaOH 1 $mol.L^{-1}$ e agitou-se durante 3 horas à temperatura ambiente para obter a amostra de PAA-TS. Em seguida, a solução foi dialisada em água deionizada por 24 horas. O polímero seco foi obtido por liofilização. O mesmo procedimento foi realizado para obter PAA a partir do polímero PSI.

3.5. Síntese de poli (ácido aspártico) responsivo à temperatura com diferentes graus de substituição (PAA-TS)

Foram preparadas amostras de PAA-TS com diferentes graus de substituição. Dissolveu-se PSI (1,75 g) em DMF (21 mL) a 70 °C durante 3 horas. Após resfriamento até 30 °C, isopropilamina (12,25 mL) foi adicionada à solução e mantida sob agitação magnética. Foram tomadas alíquotas de 5 mL da solução de reação em 10, 12, 16, 20, 26, 34 e 48 horas. Foram adicionados 2 mL de solução NaOH 1 $mol.L^{-1}$ a cada alíquota e agitados magneticamente durante 3 horas à temperatura ambiente. Em seguida, cada solução foi dialisada em água deionizada durante 24 horas. O polímero seco foi obtido por liofilização. Cada amostra foi denominada PAA-TS seguida pelo número de horas nas quais a alíquota foi retirada da síntese. Uma rota sintética esquemática para a PSI e seus derivados está na Figura 7.

Figura 7. Rota Sintética da PSI e seus derivados. Ácido L-aspártico (ASP), polissuccinimida (PSI), polissuccinimida responsiva à temperatura (PSI-TS), poli(ácido aspártico) responsivo à temperatura (PAA-TS) e poli(ácido aspártico) (PAA).



Elaborado pelo autor.

3.6. Caracterização das amostras

3.6.1. Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

Os espectros no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foram registrados em um espectrômetro PerkinElmer Frontier Dual Range FT-IR. Amostras secas foram moídas com KBr e as misturas foram comprimidas em discos. Os espectros foram registrados na faixa de 4000 - 400 cm^{-1} com resolução nominal de 4,0 cm^{-1} e 64 varreduras. Esta técnica foi empregada para determinar a presença de grupos orgânicos funcionais característicos de cada polímero e assim confirmar a modificação dos polímeros.

3.6.2. Espectroscopia por ressonância magnética nuclear (^{1}H-NMR)

Os espectros ^{1}H-NMR foram registados num espectrômetro Bruker Fourier 300. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente. As amostras secas PSI e PSI-TS foram dissolvidas em DMSO-d_6 (Dimetilsulfóxido deuterado). As outras amostras secas foram dissolvidas em D_2O (óxido de deutério). O Tetrametilsilano (TMS) foi usado como agente de referencia nas medidas em DMSO-d_6 e o pico da água foi ajustado em 4,79 ppm nas medidas em D_2O. Os espectros foram analisados empregando o programa MestReNova.

3.6.3. Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A massa molar e a distribuição de massa molar do polímero PAA foram avaliadas por cromatografia de permeação em gel (GPC) usando um cromatógrafo Viscotek RImax (Malvern Instruments) equipado com três colunas termostatizadas (35 °C) Shodex SB-806 HQ (SHOWA Denko, Tokyo, Japão). Uma solução de $NaNO_3$ 0,1 mol L^{-1} desgaseificada foi utilizada como fase móvel, com uma taxa de fluxo de 1 mL min^{-1}. O volume de injeção foi de 100 µL de soluções estoque. Os polímeros foram caracterizados pelo tempo de eluição relativo dos padrões de PEO (óxido de polietileno) na faixa de 224000 - 195 Da (Varian Palo Alto, CA) usando a curva de calibração adquirida antes das medidas.

3.6.4. Determinação da LCST

O comportamento responsivo à temperatura das soluções aquosas dos polímeros (0,5% m/v) foi estimado por medição da turbidez a 500 nm utilizando o espectrofotômetro UV/Vis Lambda 465 equipado com uma célula com controle de temperatura. A transmitância foi medida a diferentes temperaturas e as amostras foram equilibradas durante 4 min antes de cada medida. A temperatura critica inferior de solução (LCST) do polímero é definida como a temperatura correspondente a uma redução do 50% da transmitância da solução a 20 ºC [24]. Determinou-se a LCST das amostras PSI-TS e PAA-TS variando o pH entre 3,2 e 3,8. Os polímeros foram primeiro dissolvidos em água com pH 3,2. Após as medidas, o pH foi aumentado com NaOH 0,1 mol.L^{-1}. A LCST das amostras de PAA-TS com diferentes graus de substituição foi medida em pH 3,4.

4. Resultados e discussão

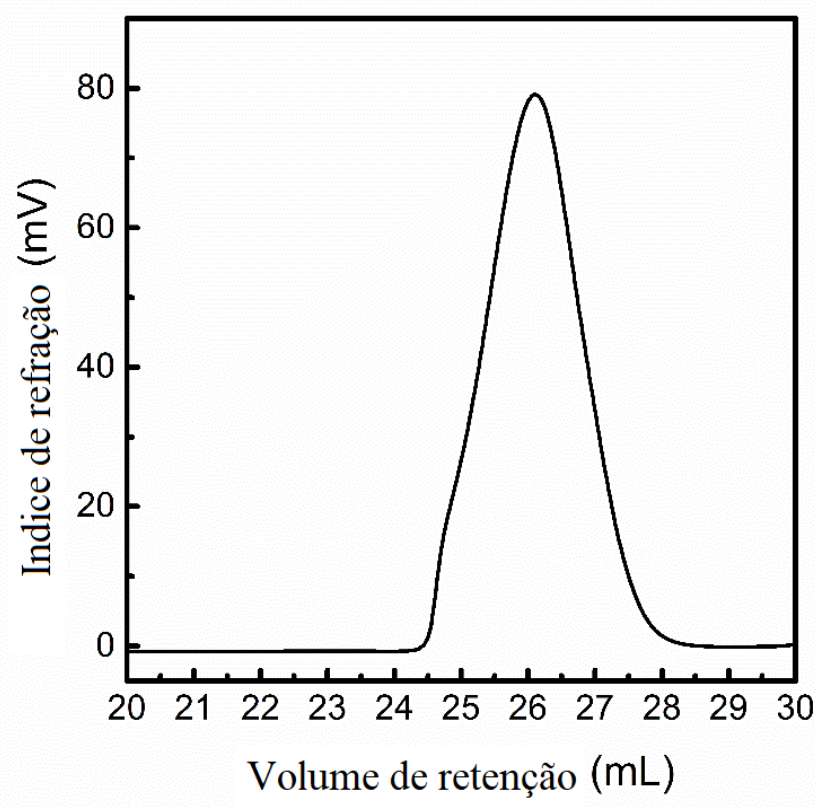
4.1. Caracterização dos polímeros produzidos

4.1.1. Cromatografia de permeação em gel (GPC)

Devido à síntese da PSI ocorrer sem agitação e livre de solvente foi esperado obter polímeros com uma distribuição de massa molar heterogênea. Para diminuir a heterogeneidade o ácido fosfórico e o ácido aspártico foram misturados em um almofariz durante um tempo prolongado para assegurar uma mistura homogênea. O tempo de reação, a temperatura de reação e a porcentagem de catalisador influenciam significativamente na massa molar, assim um aumento na temperatura ou no tempo de reação produz um aumento da massa molar da PSI. Devido à elevada temperatura de síntese é necessário trabalhar numa atmosfera inerte para evitar a degradação da PSI [12, 25, 26].

O resultado da análise por GPC mostrou que a massa molar do poli(ácido aspártico) (PAA) era 40000 g/mol para a massa molar média numérica (Mn) e 52400 g/mol para a massa molar média mássica (Mw). A distribuição da massa molar mostrou o valor médio para o comportamento de polidispersão (PDI = 1,31), como pode ser observado na Figura 8. O valor de PDI é similar ao valor reportado em artigos científicos [16, 27]. Usando esses valores foi calculada a massa molar da PSI em 33700 g/mol 44200 g/mol para a Mn e a Mw, respectivamente. A determinação da massa molar da PSI é importante porque a massa molar influencia no valor da LCST dos polímeros responsivos à temperatura [28].

Figura 8. Cromatograma de permeação em gel da amostra PAA.



Elaborado pelo autor.

4.1.2. Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

A Figura 9 mostra os espectros FTIR das amostras PSI, PSI-TS, PAA e PAA-TS. A Tabela 1 apresenta as principais bandas avaliadas. No espectro da PSI, as bandas centradas em 1796 e 1712 cm^{-1} estão relacionadas aos modos de estiramento simétrico e assimétrico dos grupos carbonila na imida cíclica de cinco membros (succinimida), respectivamente. Isto confirmou a presença da unidade repetitiva succinimida na polissuccinimida [29, 30].

O espectro FTIR do PAA apresenta uma banda larga a 1580 cm^{-1} atribuída à superposição das bandas amida I (principalmente estiramento da ligação C=O), amida II (combinação da flexão da ligação N-H e do estiramento da ligação C-N), o modo de vibração de estiramento da carboxila e do modo de vibração de estiramento assimétrico do carboxilato. A banda a 1396 cm^{-1} é atribuída ao modo de vibração de estiramento

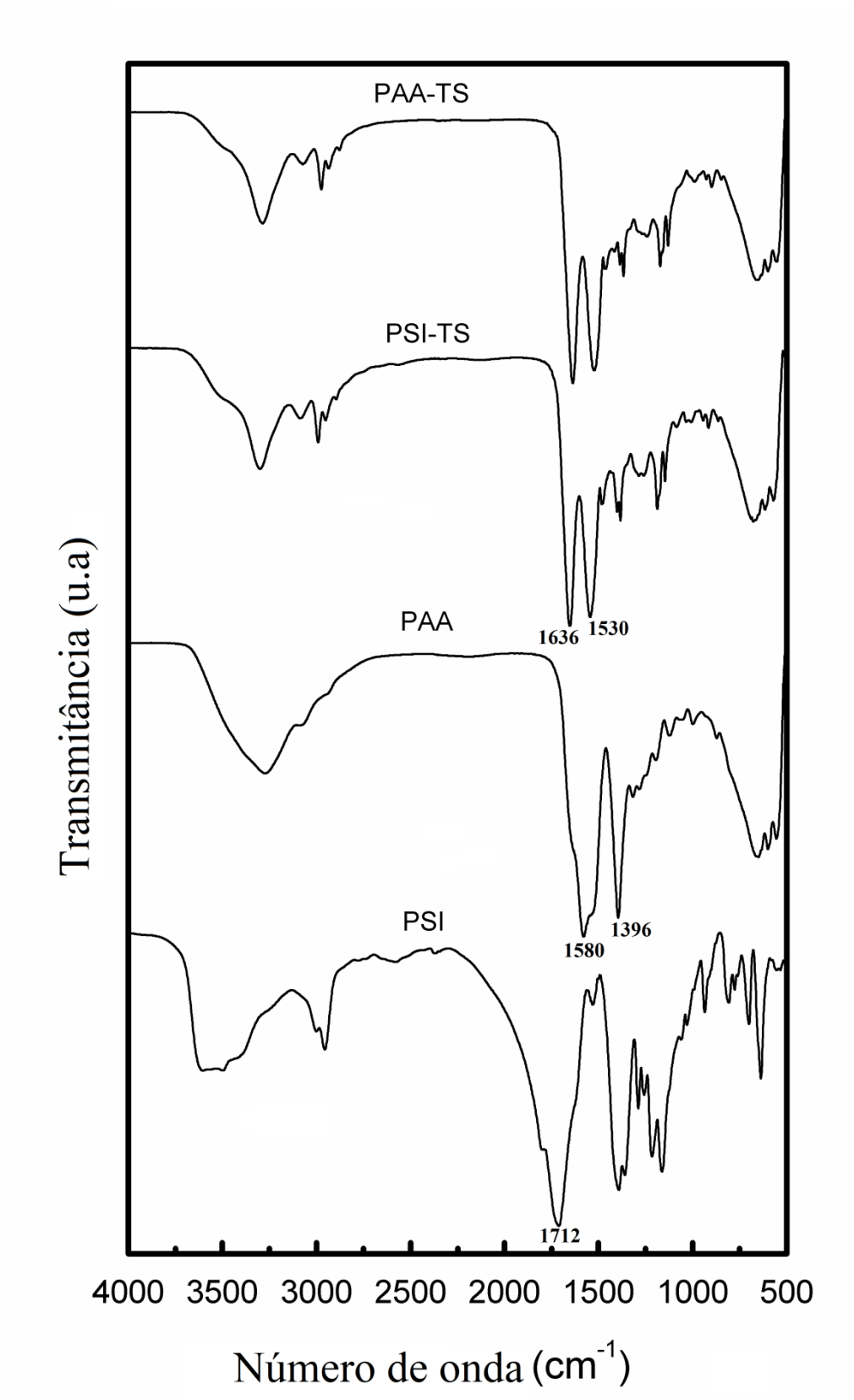
simétrico de carboxilato. Após a hidrólise alcalina da PSI, a conversão total das unidades de repetição (succinimida) foi confirmada pela ausência das bandas típicas da PSI e a presença das bandas relacionadas aos grupos amida e carboxila na amostra PAA como era esperado segundo a estrutura do PAA (Figura 7) [31–33].

O espectro FTIR da PSI-TS apresenta bandas em 1636 e 1530 cm^{-1}, as quais são atribuídas aos modos de vibração amida I e amida II, respectivamente. Os grupos amida foram formados como produto da reação entre uma das carbonilas da succinimida com a isopropilamina. Além disso, o espectro da PSI-TS não mostrou as bandas atribuídas ao grupo succinimida indicando que a maioria das succinimidas reagiu com a isopropilamina [32, 34]. Os espectros FTIR do PAA-TS e PSI-TS são muito semelhantes, o que indica que ambos os polímeros estão compostos por quase as mesmas unidades repetitivas. As diferenças nas suas estruturas são melhor avaliadas por espectroscopia ^{1}H-NMR.

Tabela 1. Atribuições das bandas características de amostras analisadas por espectroscopia infravermelho (FTIR) referentes aos grupos funcionais de polímeros PAA, PAA-TS, PSI, PSI-TS.

Número de onda (cm^{-1})	Modo de vibração
1796	Estiramento simétrico C=O na succinimida
1712	Estiramento assimétrico C=O na succinimida
1396	Estiramento simétrico COO^{-}
1636	Amida I
1530	Amida II

Figura 9. Espectros FTIR das amostras PAA, PAA-TS, PSI, PSI-TS.



Elaborado pelo autor.

4.1.3. Espectroscopia por ressonância magnética nuclear (^{1}H-NMR)

A Figura 10 mostra os espectros ^{1}H-NMR de PSI, PSI-TS, PAA e PAA-TS com as respectivas estruturas químicas de cada polímero marcadas com as letras que relacionam os picos com o tipo de átomos de hidrogênio na estrutura química.

A Figura 10.a mostra o espectro e a estrutura química da PSI. A PSI é um polímero cuja unidade monomérica é uma imida cíclica de 5 membros conhecida como succinimida. O pico em 5,3 ppm é atribuído ao próton do metino (-CH-), os sinais em 3,2 ppm e 2,7 ppm são atribuídos aos prótons do metileno (-CH_2-), e o pico em 2,5 ppm é atribuído ao sinal do solvente DMSO [35–37]. O espectro apresenta também outros picos de intensidade tão baixa que não são observadas na figura, estes picos são atribuídos aos grupos finais da cadeia polimérica. Este resultado confirma que a PSI foi sintetizada com sucesso.

Nem todas as succinimidas da PSI reagem com a isopropilamina, portanto a PSI-TS é um copolímero formado majoritariamente por duas estruturas: a unidade responsiva à temperatura produzida pela reação entre a succinimida e a isopropilamina e a succinimida pura. O espectro da PSI-TS (Figura 10.b) apresenta um pico em 3,2 ppm o qual é atribuído aos prótons do metileno na succinimida, este pico indica a presença de succinimidas que não reagiram com moléculas de isopropilamina. O pico largo em 2.1-2.3 ppm é atribuído aos prótons do metileno da unidade responsiva à temperatura. O pico largo em 4,3-4,6 ppm é atribuído à superposição dos prótons dos metinos que formam ligação entre duas estruturas destacada pela letra “a” na Figura 10.b. O sinal em 3,8 ppm corresponde ao próton do metino no grupo isopropilo. O pico em 1,02 ppm é atribuído aos seis prótons dos radicais metila (-CH_3) no grupo isopropilo. A presença de picos em 1,12 ppm e 1,14 ppm está relacionada à isopropilamina que não reagiu com polímero [16, 31, 38, 39].

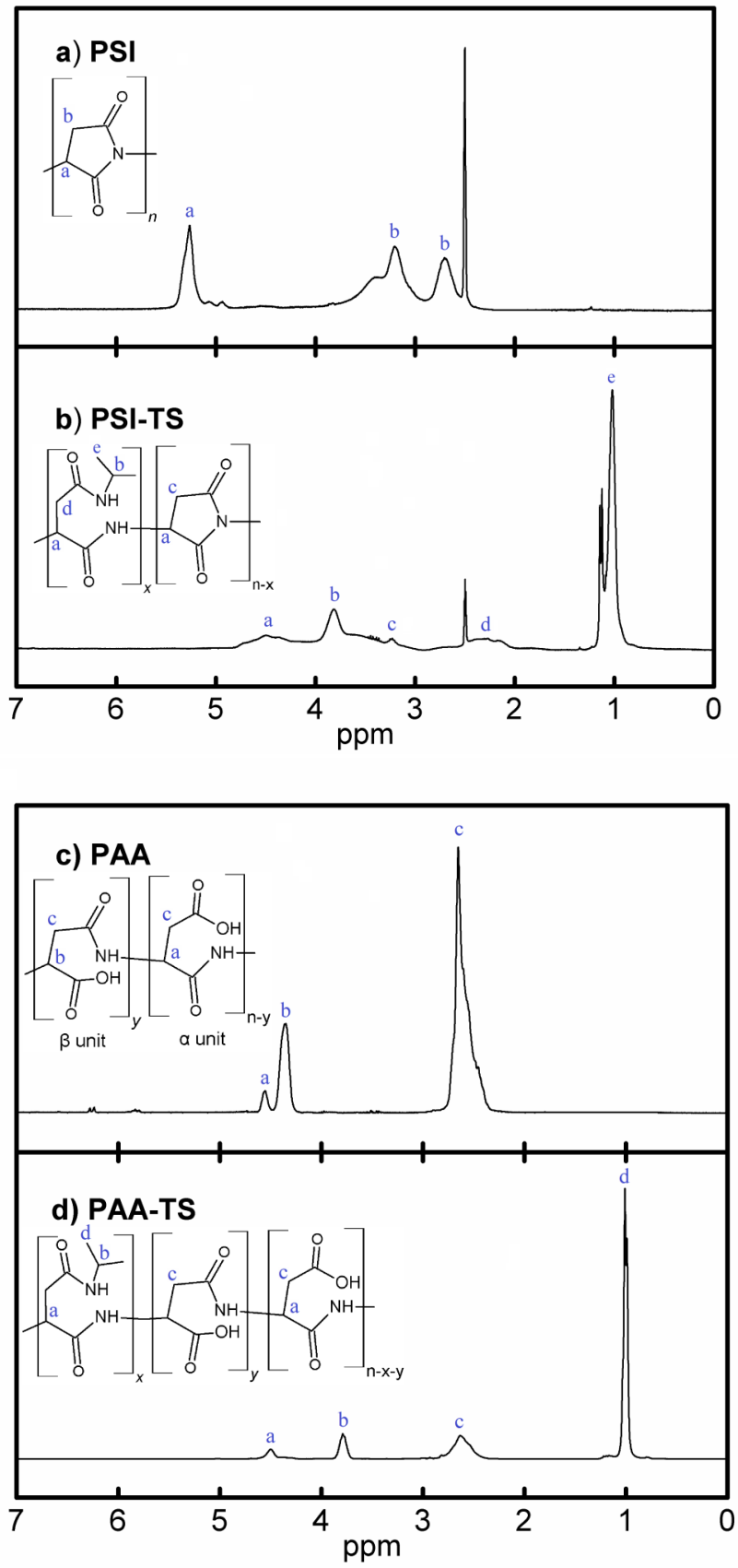
O óxido de deutério foi usado como solvente para obter os espectros do PAA e do PAA-TS e o sinal da água foi suprimido nos espectros. O PAA é um copolímero formado por duas estruturas isoméricas usualmente denominadas estrutura α e β. Durante a hidrólise da PSI para produzir o PAA o ataque nucleofilico da água pode acontecer em uma das duas carbonilas presentes na PSI, dependendo da carbonila atacada pode ser formada a estrutura α ou β. O espectro do PAA (Figura 10.c) mostra sinais em 4.7 ppm e 4.5 ppm que estão relacionados com os prótons do metino resultado

da hidrólise por abertura α e β, respectivamente. A relação entre as áreas expressa a proporção molar entre os isômeros, a razão molar β/α foi 3, e concorda com os valores reportados em artigos científicos [40, 41]. O sinal largo em 2,6-2,8 ppm é atribuído aos prótons do metileno das estruturas isoméricas [40]. Não foi observado qualquer pico associado com a PSI, portanto a hidrólise da PSI foi total.

Devido à hidrólise alcalina das succinimidas presentes na estrutura química da PSI-TS, o PAA-TS é formado pelas estruturas responsivas à temperatura e as estruturas α e β da hidrólise da succinimida. O espectro do PAA-TS (Figura 10.d) mostra um sinal em 4,6 ppm e um sinal muito pequeno e largo, difícil de observar no espectro em 4,5 ppm, ambos atribuídos aos prótons dos metinos de todas as unidades monoméricas (exceto os metinos do grupo isopropilo) que formam o copolímero. Por analogia com o espectro do PAA, considerou-se que o sinal em 4,6 está relacionado com as estruturas resultantes de ataques nucleofilicos na posição α, e o pequeno pico em 4,5 com as estruturas resultantes de ataques nucleofilicos na posição β. Aparentemente, a aminólise aconteceu preferencialmente via abertura α. Este resultado contrasta com o resultado obtido no espectro do PAA no qual a hidrólise aconteceu em 75% das unidades monoméricas via abertura β. O pico em 3,9 ppm é atribuído ao próton do metino no grupo isopropilo. O pico largo entre 2,9 ppm e 2,5 ppm é atribuído aos prótons do metileno de todas as unidades monoméricas, enquanto o sinal em 1,1 ppm é atribuído aos prótons do metilo no grupo isopropilo [16, 23]. Embora os sinais correspondentes às estruturas produzidas pela hidrólise não sejam diferentes dos sinais correspondentes às unidades responsivas à temperatura no espectro do PAA-TS, a ausência de sinais relacionados à PSI no espectro do PAA-TS permite confirmar que as succinimidas presentes na PSI-TS foram completamente hidrolisadas e que a estrutura da PAA-TS é formada pelas unidades responsivas à temperatura e as estruturas α e β da hidrólise da succinimida. Se a amostra PAA-TS fosse formada exclusivamente por estruturas responsivas à temperatura então o grau de substituição seria aproximadamente 100%, mas como é mostrado na Tabela 2 esse valor é menor do que 100%.

Devido às diferenças entre as estruturas químicas da PSI-TS e do PAA-TS, esperava-se distintos valores de LCST das soluções aquosas destes polímeros.

Figura 10. Espectro ^{1}H-NMR de a) PSI e b) PSI-TS em DMSO-d_6 e c) PAA e d) PAA-TS em D_2O.



Elaborado pelo autor.

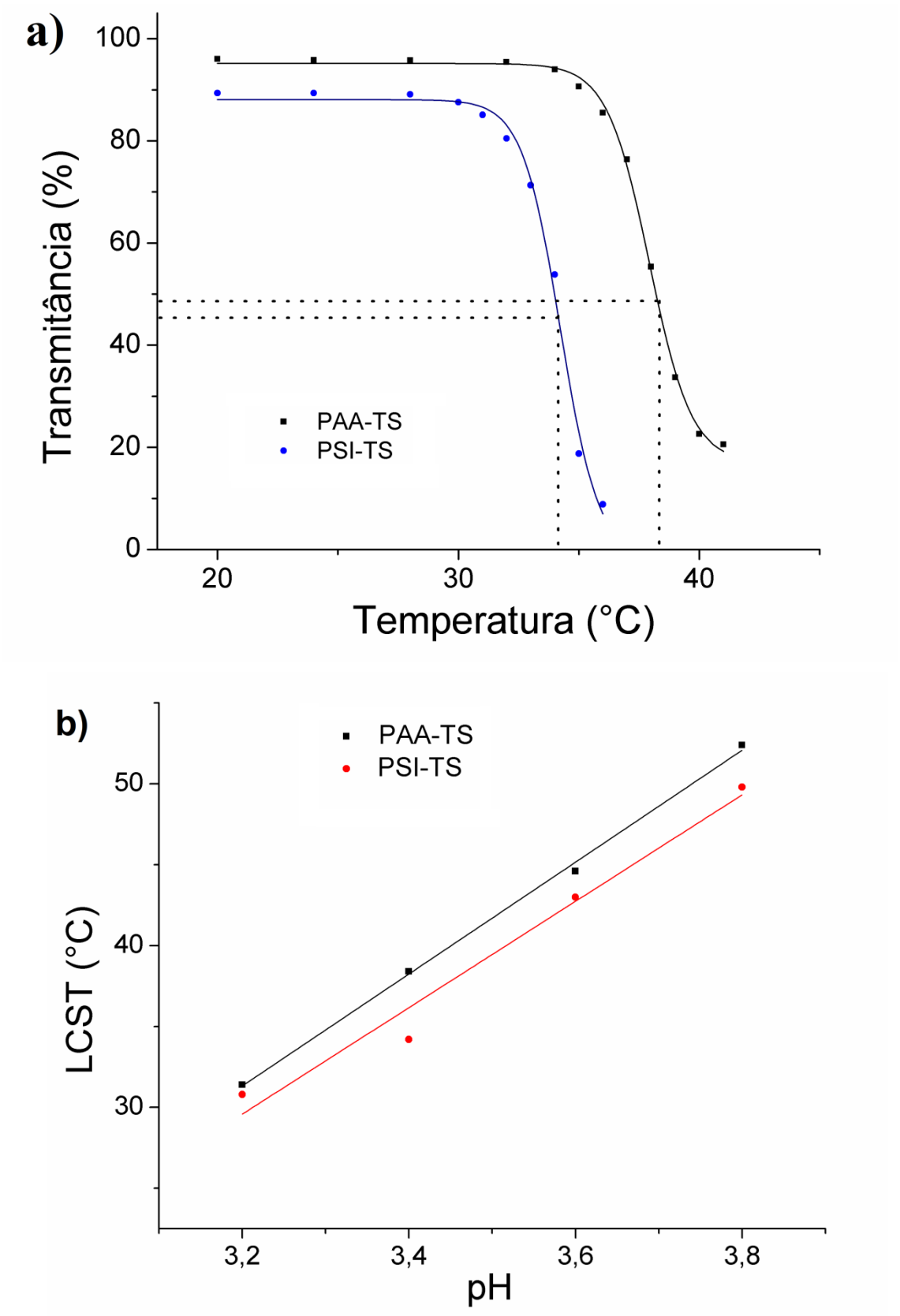
4.2. Determinação da LCST

4.2.1. A influência do pH e do grau de hidrólise na LCST

O comportamento responsivo à temperatura das soluções aquosas de PSI-TS e PAA-TS foi avaliado por medidas de transmitância em função da temperatura (Figura 11.a). Observa-se uma diminuição na transmitância quando a temperatura da solução aumenta pois a medida que aumenta a temperatura a solução torna-se mais turva. Este fenômeno é resultado da formação de aglomerados que espalham a luz. Um aumento da temperatura favorece a formação de mais aglomerados, portanto aumenta a turbidez da solução (Figura 3).

Embora ambas as amostras apresentem curvas semelhantes, a diminuição abrupta da transmitância no PAA-TS ocorre em temperaturas mais altas em comparação com a PSI-TS. A LCST da PSI-TS e do PAA-TS é de 34,2 ºC e 38,4 ºC, respectivamente. A diferença no valor da LCST entre o PAA-TS e a PSI-TS deve-se a maior presença de grupos carboxila no polímero PAA-TS (Figura 7). A incorporação de domínios com maior afinidade pela água na estrutura química produz um aumento na LCST do polímero original. As estruturas produzidas pela hidrólise da succinimida, presentes no PAA-TS, tem uma maior afinidade pela água do que as succinimidas presentes na PSI-TS (Figura 7). Por isso o PAA formado por estruturas de hidrólise da succinimida tem alta solubilidade em água ,enquanto a PSI possui baixa solubilidade em agua. Assim, o PAA-TS tem maior afinidade pela água do que a PSI-TS, por isso a LCST do PAA-TS é maior do que a LCST da PSI-TS [21]. Na presença de água, o grupo carboxila é susceptível à dissociação para produzir os aníons carboxilato. Como a fração dos grupos carboxilato aumenta com o aumento do pH da solução, era esperado que o comportamento responsivo à temperatura do polímero PAA-TS seja influenciado pelo pH da solução. Também foi considerado que o copolímero PSI-TS contenha alguns grupos carboxila na sua estrutura química, pois normalmente estes grupos estão presentes nos extremos das cadeias poliméricas da PSI ou poderia ter ocorrido a hidrólise parcial das succinimidas, porém a quantidade destes grupos é menor em PSI-TS do que em PAA-TS [42].

Figura 11. a) Transmitância em função da temperatura das soluções aquosas de PAA-TS e PSI-TS (0,5% m/v) a pH 3,4. b) Influência do pH na LCST de soluções aquosas de PAA-TS e PSI-TS (0,5% m/v).



Elaborado pelo autor.

A Figura 11.b mostra a LCST dos polímeros PSI-TS e PAA-TS em uma faixa de pH entre 3,2 e 3,8. Abaixo do pH 3,0 a LCST das amostras é menor do que a temperatura ambiente e acima do pH 4,0 a LCST é superior a 50 °C, o que é inadequado para aplicações biomédicas. A LCST do PAA-TS é maior do que a LCST da PSI-TS em todos os valores de pH medidos. Observa-se uma relação aproximadamente linear entre a LCST e o pH em ambas soluções de polímeros, um incremento no pH aumenta a LCST. Quando o pH da solução aumenta, a proporção de grupos carboxilato aumenta nos copolímeros, e devido ao grupo carboxilato ser mais fortemente solvatado pela água do que o grupo carboxila (ou seja, o grupo carboxilato tem maior afinidade pela água do que o grupo carboxila), a afinidade dos copolímeros pela água também aumenta e produz o aumento na LCST dos copolímeros. Este comportamento também é explicado considerando que o ânion carboxilato gera repulsão eletrostática entre as cadeias dos copolímeros, de forma que é necessário mais energia térmica para superar a repulsão eletrostática quando a proporção de grupos carboxilato aumenta [32, 43]. Como a LCST da PSI-TS é influenciada também pelo pH, confirma-se a presença de grupos carboxila na estrutura química da PSI-TS. No entanto, como foi mencionado anteriormente, o PAA-TS apresenta uma maior concentração de grupos carboxila devido à hidrólise total dos grupos succinimida. Embora a PSI-TS tenha sido primeiramente dissolvida em uma solução aquosa a pH 3,2 para evitar a hidrólise da succinimida, os grupos carboxilato/carboxila estão presentes em uma quantidade muito baixa na estrutura da PSI como grupos terminais, como estruturas de anel aberto ou como produto da hidrólise de algumas succinimidas durante a lavagem do polímero, ou seja produto de uma hidrólise parcial. Estes resultados demonstram a influência do grau de hidrólise (DH) ou seja a quantidade de grupos succinimida que foram hidrolisadas no comportamento sensível à temperatura das poliaspartamidas [22, 26, 38, 44].

Considerando a faixa de trabalho do pH (3,2-3,8), esses polímeros podem ser usados em sistemas de liberação oral de fármacos para transportar e liberar fármacos no intestino, evitando a degradação do fármaco pelo fluido gástrico do estômago. No ambiente ácido do estômago, o polímero estaria no estado colapsado protegendo o fármaco, enquanto no pH neutro intestinal o polímero se dissolveria e liberaria o fármaco [35, 45, 46]. Além disso, os sais dissolvidos nos fluidos fisiológicos poderiam interagir com as cargas negativas dos grupos carboxila, levando a uma diminuição na

repulsão eletrostática, o que poderia aumentar a faixa de trabalho do pH acima de 3,8 [47].

4.2.2. A influência do grau de substituição na LCST

O grau de substituição (DS) é definido como a razão molar entre as unidades N-isopropilaspartamida e as unidades de succinimida iniciais na PSI [48]. O grau de substituição foi determinado a partir do espectro ^{1}H-NMR de cada amostra através da comparação das áreas do pico em 3,9 ppm (grupo isopropilo) e do pico em 2,9-2,5 ppm (esqueleto de polímero). O grau de substituição das amostras PAA-TS é mostrado na Tabela 2.

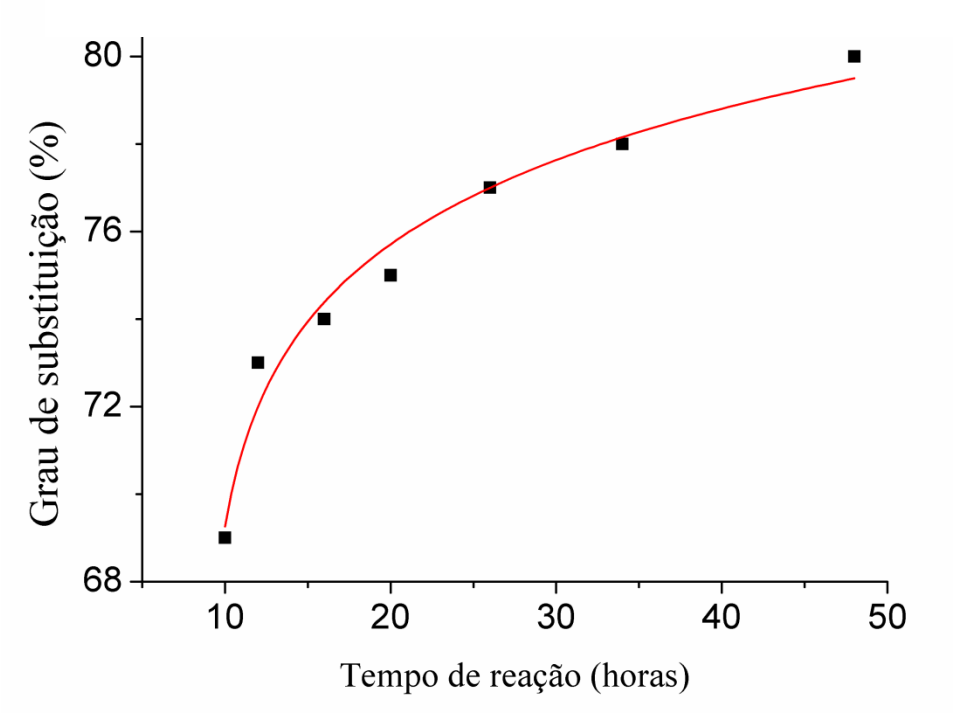
Tabela 2. Grau de substituição (DS) das amostras de PAA-TS em função do tempo de reação.

Amostra	Tempo de reação (horas)	DS (%)
PAA-TS10	10	69
PAA-TS12	12	73
PAA-TS16	16	74
PAA-TS20	20	75
PAA-TS26	26	77
PAA-TS34	34	78
PAA-TS48	48	80

Com os valores da Tabela 2 foi obtida a Figura 12, a qual mostra a influencia do tempo de reação no grau de substituição das poliaspartamidas. A função logarítmica foi a que melhor se ajustou com os dados. Inicialmente a substituição aconteceu rapidamente por isso nas primeiras 10 horas de reação o grau de substituição foi de 69%, porém nas 10 horas seguintes o grau de substituição aumentou apenas em 6%. Depois de mais 14 horas de reação o grau de substituição só aumentou 3%. Portanto, o tempo de reação torna-se cada vez maior para aumentar o grau de substituição até o valor máximo. A unidade N-isopropilaspartamida possui um grupo isopropilo volumoso

que dificulta a reação entre a succinimida vizinha e a isopropilamina. No começo da reação nenhuma unidade N-isopropilaspartamida está presente no polímero e as moléculas isopropilamina podem reagir sem dificuldade com as succinimidas. No entanto, com o avanço da reação, mais unidades N-isopropilaspartamida são formadas, consequentemente aumenta a dificuldade para que as succinimidas remanentes possam reagir com a isopropilamina.

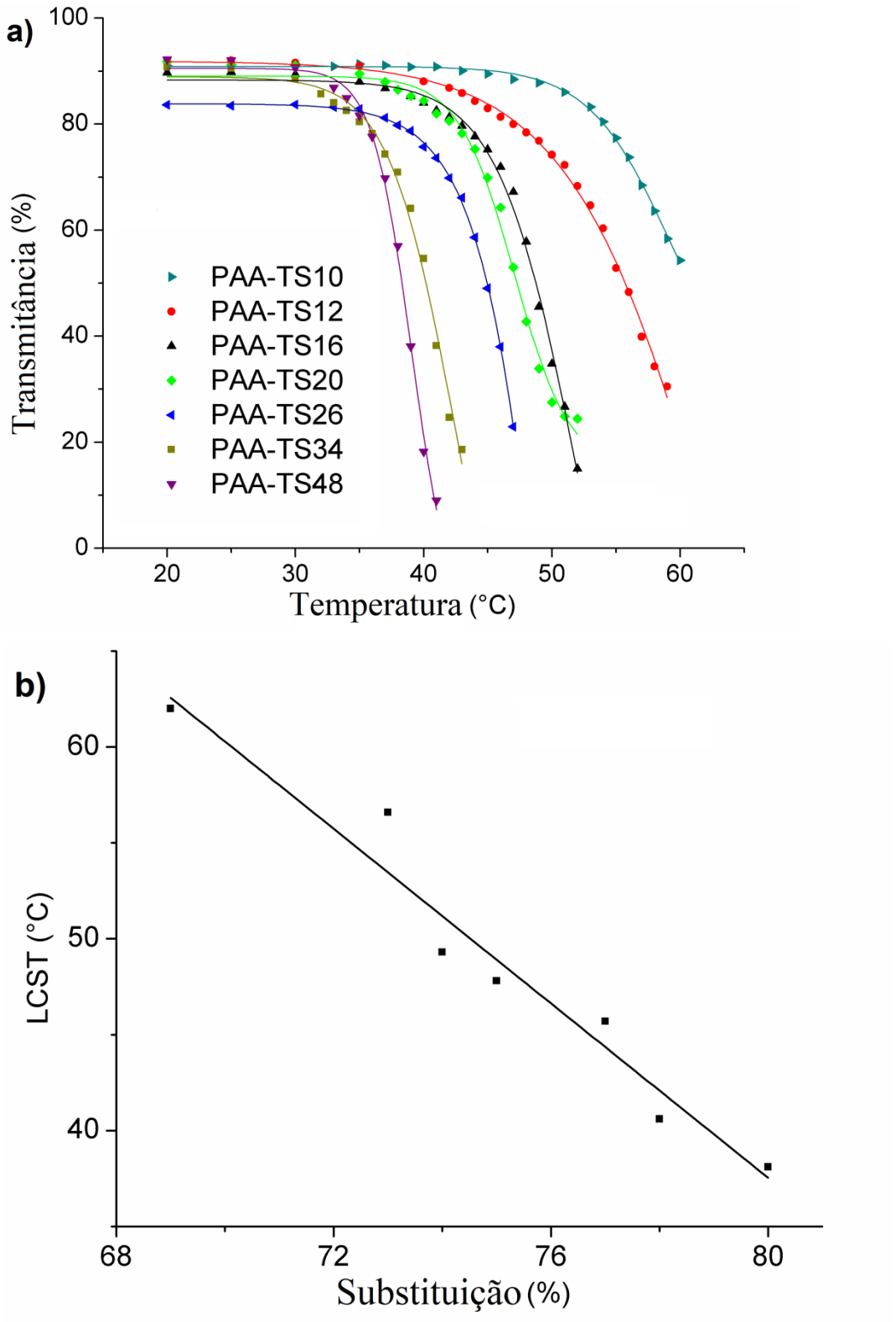
Figura 12. Grau de substituição das poliaspartamidas em função do tempo de reação.



Elaborado pelo autor.

Como as amostras PAA-TS apresentam diferentes graus de substituição (DS) era esperado que também apresentassem diferentes valores de LCST. A Figura 13.a mostra a transmitância em função da temperatura de cada solução aquosa de polímeros PAA-TS em pH 3,4. A LCST de cada amostra foi obtida da Figura 13.a e foi correlacionada com o DS (Tabela 2). A Figura 13.b mostra a influência do DS dos polímeros PAA-TS na LCST a pH 3,4. Observa-se que um incremento no DS resulta numa diminuição do valor da LCST. A relação entre o DS e a LCST é aproximadamente linear. Após a aminólise, as unidades repetitivas não substituídas (succinimidas) produziram grupos carboxila devido à hidrólise alcalina. Assim, copolímeros PAA-TS com menor DS também possuem a maior concentração de grupos carboxila. Como foi explicado anteriormente, um incremento na concentração dos grupos carboxila aumenta a LCST do copolímero. Por isso os copolímeros com menores DS exibem maiores valores de LCST.

Figura 13. a) Transmitância em função da temperatura das soluções aquosas de amostras de PAA-TS com distintos graus de substituição (0,5% m/v) a pH 3,4. b) Efeito do grau de substituição (DS) no polímero PAA-TS na LCST a pH 3,4.



Elaborado pelo autor.

5. Conclusões

Poliaspartamidas responsivas à temperatura e ao pH com diferentes graus de hidrólise e graus de substituição foram sintetizadas com sucesso. Devido à presença de grupos carboxilato na cadeia, a LCST das poliaspartamidas aumenta quando o pH da solução também aumenta. No mesmo valor de pH, a LCST do PAA-TS é maior do que a LCST da PSI-TS. Estas diferenças surgem dos distintos graus de hidrólise dos polímeros. Além disso, a um valor de pH constante, a LCST dos polímeros PAA-TS é maior nos polímeros com menor grau de substituição. Um incremento no pH ou no grau de hidrólise aumenta a quantidade de grupos carboxilato nos polímeros. Os grupos carboxilato têm uma alta afinidade pelas moléculas de água e um incremento desses grupos nos polímeros responsivos à temperatura aumenta a LCST. Os resultados obtidos confirmam que a LCST das poliaspartartamidas produzidas pode ser ajustada fixando-se apropriadamente o pH, o grau de hidrólise e o grau de substituição. Embora não tenha sido avaliada a biocompatibilidade e a biodegradabilidade, os polímeros são derivados da polissuccinimida e, portanto, pressupõe-se que sejam biodegradáveis e biocompatíveis, os quais junto com a capacidade de ajustar finamente a LCST, os converte em substitutos potenciais da PNIPAAm.

6. Sugestões para trabalhos futuros

Os resultados indicaram que as poliaspartamidas responsivas poderiam ser materiais adequados para a construção de sistemas de administração oral para transportar e liberar fármacos preferencialmente no intestino, evitando a degradação do fármaco pelo fluido gástrico no estômago. Portanto, as perspectivas deste trabalho direcionam para a investigação de carga e liberação de fármacos em sistemas de poliaspartamidas em valores de pH e de força iônica similares aos das soluções do estomago e do intestino. Também é necessário avaliar a biocompatibilidade e biodegradabilidade das poliaspartamidas através de ensaios adequados.

Capitulo 2: Preparação e caracterização de agregados de óxido de ferro recobertos com uma casca de sílica

1. Introdução

1.1. Nanomateriais

Um nanômetro (nm) representa 10^{-9} metros de comprimento. Embora não exista uma definição amplamente aceita, em princípio os nanomateriais são descritos como materiais com comprimento de 1–100 nm em pelo menos uma dimensão [49]. A Comissão Europeia define nanomaterial como "um material natural, incidental ou manufaturado contendo partículas, em um estado não ligado ou como um agregado ou como um aglomerado e onde, para 50% ou mais das partículas na distribuição de tamanho numérico, uma ou mais dimensões externas estão na faixa de tamanho 1 nm - 100 nm" [50]. A *US Food and Drug Administration* (USFDA) define nanomaterial como "material que tem pelo menos uma dimensão no intervalo de aproximadamente 1-100 nm e exibe fenômenos dependentes do tamanho" [49, 51]. Os nanomateriais têm recebido destaque nos avanços tecnológicos devido às suas características físico-químicas únicas, as quais são geralmente diferentes daquelas presentes no material de mesma composição química e com dimensões maiores (*bulk*), tais como ponto de fusão, condutividade elétrica e térmica, magnetização, atividade catalítica, absorção e espalhamento de luz, etc. Estas propriedades únicas dependem das dimensões, formas e extensão da superfície dos nanomateriais e são produzidas pela elevada relação área/volume (energia de Gibbs de superfície), defeitos superficiais e efeitos quânticos presentes nos nanomateriais. Nanoparticulas apresentam uma elevada fração de seus átomos na superfície da partícula e uma grande área da superfície unidade de volume. Estas características aumentam em magnitude quando o tamanho de partícula diminui. Diversos exemplos de propriedades e aplicações são descritos na literatura e mencionados a seguir [52]. Efeitos quânticos são exibidos em algumas nanopartículas o que permite aplicações tecnológicas interessantes. Pontos quânticos são nanopartículas com níveis eletrônicos discretos; frequentemente, eles são compostos por semicondutores típicos. Algumas nanopartículas exibem propriedades ópticas atípicas já que os comprimentos de onda de absorção e de emissão o tamanho de partícula e da funcionalização da superfície. A natureza química e o tamanho das nanopartículas

controlam o potencial iónico ou de afinidade de elétrons e deste modo, as propriedades de transporte de elétrons. Em metais, a diminuição do tamanho das nanopartículas produz a diminuição das temperaturas de sinterização e de fusão. Nanopartículas com alta condutividade térmica são incorporadas numa matriz sólida para proporcionar melhor condução térmica. A atividade catalítica é aumentada pela elevada área de superfície por unidade de volume das nanopartículas. Elevadas áreas de superfície resultam em fortes interações entre as nanopartículas e a matriz sólida em que eles podem ser incorporados. Para alguns metais e óxidos metálicos, a diminuição dos tamanhos das partículas resulta no melhoramento do comportamento magnético. Nanopartículas magnéticas individuais podem apresentar um comportamento superparamagnético. Materiais nanocompósitos exibem diferentes níveis de propriedades mecânicas dependendo da natureza química das nanopartículas, da sua razão de aspecto, do grau de dispersão e das interações interfaciais com a matriz de polímero [52].

O estudo das propriedades que emergem da nanoescala é conhecido como nanociência. O termo nanotecnologia se relaciona com o uso do conhecimento científico para a fabricação de dispositivos funcionais com base na montagem controlada de objetos em nanoescala para aplicações tecnológicas específicas. A importância da nanociência e da nanotecnologia tem sido confirmada por uma série de iniciativas nacionais e internacionais para promover o seu estudo e alavancar a inovação [53].

Os nanomateriais podem ser compostos de qualquer substância, normalmente se classificam em 4 categorias [49]:

1. Nanomateriais compostos do carbono: Grafeno, fulereno, nanotubos de carbono, nanofibras de carbono.

2. Nanomateriais inorgânicos: Metais e óxidos de metais na escala nanométrica, incluem nanopartículas de Ag, Au, Fe, TiO_2, ZnO, SiO_2, etc.

3. Nanomateriais orgânicos: Dendrimeros, micelas, lipossomas, nanopartículas poliméricas, etc.

4. Nanomateriais compósitos: Materiais compostos por mais de uma fase, com uma das fases na escala nanométrica ou nanoestruturada. São preparadas com diferentes morfologias dependendo do tipo de aplicação.

As nanopartículas são preparadas por diferentes métodos que utilizam processos em fases gasosa, líquida ou solida. Os processos em fase solida incluem processos mecânicos de redução de tamanho, moagem e trituração. Processos em fase gasosa incluem pirólise, síntese em plasma, irradiação de micro-ondas, deposição química de vapor, entre outros. Métodos coloidais são baseados em processos de precipitação em soluções. Soluções de íons diferentes são misturadas em condições controladas de temperatura e pressão para formar precipitados insolúveis [52].

Desde há alguns anos os nanomaterais estão conquistando os diferentes mercados em produtos comerciais. Em 2003, a Samsung introduziu um assessório antibacteriano baseado em nanopartículas de prata com o nome comercial Silver Nano™ em suas máquinas de lavar roupa, condicionadores de ar, refrigeradores, purificadores de ar e aspiradores de pó. Também no mesmo ano, a Mercedes-Benz produziu um verniz transparente composta por nanopartículas visando a aumentar a resistência a riscos e melhorar o brilho. Em 2014, havia cerca de 1814 produtos de consumo baseados em nanotecnologia e a maioria está comercialmente disponíveis em mais de 20 países, o qual indica o impacto positivo da pesquisa em nanomateriais e materiais nanoestruturados para o avanço da tecnologia [49].

1.2. Nanopartículas de óxido de ferro

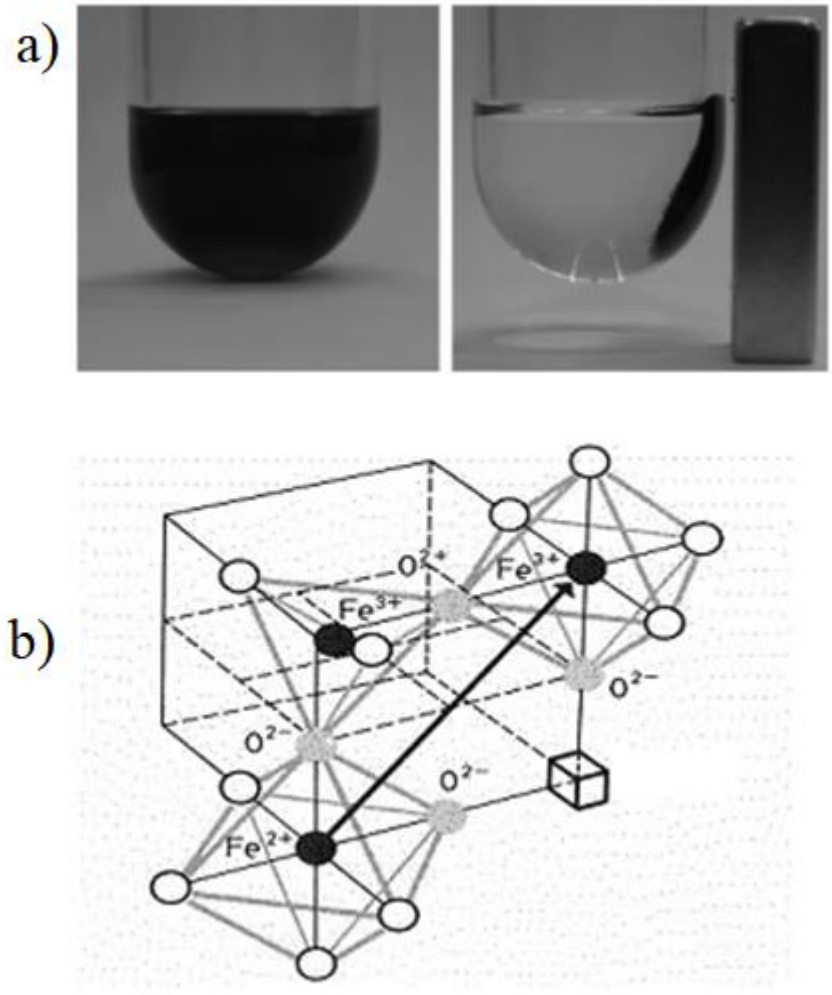
As nanopartículas magnéticas tem sido propostas para muitas aplicações na biomedicina devido ao fato de ser menores do que as células, o qual permite uma interação das mesmas em nível molecular e devido às suas propriedades magnéticas adequadas as quais podem ser aproveitadas de diversas maneiras. As nanopartículas magnéticas são compostas principalmente por ferro, níquel, cobalto e seus respetivos óxidos [54]. As nanopartículas magnéticas são facilmente manipuláveis utilizando um campo magnético externo pelo qual podem ser utilizadas em sistemas para transporte de fármacos, para a separação de moléculas e para a purificação de soluções. Aplicações biomédicas exigem que as partículas magnéticas sejam biocompatíveis e estáveis em água em pH aproximadamente 7. Além disso, para aplicações *in vivo*, as partículas magnéticas devem ser revestidas com um material biocompatível para evitar a formação de grandes agregados, alterações da composição e da estrutura original e a biodegradação quando expostos ao sistema biológico. Também é preferido o uso de

nanopartículas com comportamento superparamagnético à temperatura ambiente [54]. Materiais superparamagnéticos não apresentam magnetização remanescente nem histerese na curva de magnetização em função do campo magnético externo aplicado e apresentam uma alta susceptibilidade magnética. Em ausência de um campo magnético externo, as nanopartículas superparamagnéticas não apresentam magnetização resultante pois seus spins estão orientados aleatoriamente devido às flutuações térmica. Porém, quando um campo magnético externo é aplicado, um dipolo magnético é induzido. Quando o campo magnético é retirado as nanopartículas retornam para seu estado não-magnético. Esta ausência de comportamento magnético evita a atração entre as nanopartículas, a qual pode induzir processos de agregação que podem provocar obstruções dentro do corpo humano [54]. Não obstante, algumas nanopartículas magnéticas não atingiram resultados satisfatórios nos estudos clínicos, principalmente por causa da sua elevada toxicidade, tais como as nanopartículas de cobalto, níquel e ferro [55, 56].

As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro: magnetita (Fe_3O_4) e maghemita (γ-Fe_2O_3) com tamanhos entre 5–25nm, também conhecidas como SPION (*superparamagnetic iron oxide nanoparticles*) são dos poucos nanomateriais que podem ser injetados no corpo humano sem produzir reações tóxicas [55]. A Figura 14.a mostra uma suspensão de nanopartículas de magnetita interagindo com um campo magnético. A magnetita é um óxido misto de ferro (contem íons Fe^{3+} e Fe^{2+} em uma razão molar 2:1) preto que tem uma estrutura cúbica de espinélio inverso com o oxigênio formando um empacotamento compacto cúbico de face centrada, os cátions Fe^{2+} ocupam os sítios octaédricos, e a metade de cátions Fe^{3+} ocupam os sítios octaédricos e a outra metade ocupam os sítios tetraédricos (Figura 14.b) [57, 58]. A magnetita em *bulk* apresenta o comportamento ferrimagnético e devido à elevada magnetização de saturação é amplamente utilizada em midias magnéticas. O comportamento superparamagnético é observado em nanopartículas de magnetita com tamanhos inferiores a 30 nm [57]. A maghemita é um material ferrimagnético marrom avermelhado e possui uma estrutura similar à magnetita. É um importante pigmento magnético com propriedades semelhantes à magnetita. Geralmente é preparado a partir de magnetita por oxidação empregando peróxido de hidrogênio, nitrato férrico ou ar como agente oxidante. A maghemita possui uma maior estabilidade química do que a magnetita, por isso

frequentemente é indicada como mais adequada para aplicações biológicas. Porém, a magnetita possui melhores propriedades magnéticas do que a maghemita [57].

Figura 14. a) Suspensão de nanopartículas de magnetita atraídas por um imã. b) Estrutura cristalina da magnetita.



Adaptado de: a) L.M. Rossi et al [138] e b) E. Aquino et al. [139]

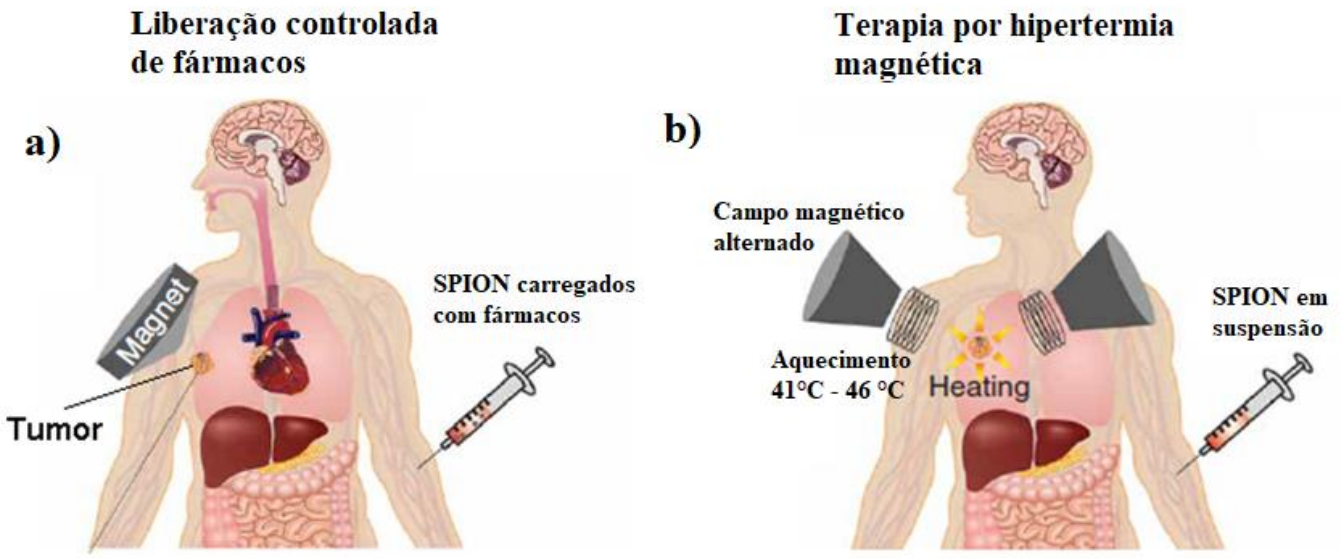
Muitos métodos estão disponíveis para obter SPION com tamanho, distribuição de tamanho e propriedades magnéticas adequadas, controlando os parâmetros de reação e de processo [54, 58, 59]. As rotas químicas são mais viáveis e mais eficientes, com controle apreciável sobre tamanho, composição química e até mesmo a forma das nanopartículas. O método mais usado para preparar nanopartículas de magnetita é a coprecipitação a partir de solução de sais de ferro usando uma base como agente de

precipitação. As características das nanopartículas dependem do tipo e da concentração dos sais de ferro e da base, também dependem da temperatura, da força iônica, da agitação, da taxa de adição da base, do pH, etc. Usualmente, emprega-se sais de $FeCl_3.6H_2O$ e $FeCl_2.4H_2O$ em uma proporção molar de 2:1 e hidróxido de amônio como base. O oxigênio na solução provoca a oxidação parcial das nanopartículas, portanto também é importante remover o oxigênio através do uso de gases inertes em caso de produzir magnetita. A temperatura de reação varia desde a temperatura ambiente até 90 ºC. Uma etapa posterior de oxidação das nanopartículas de magnetita utilizando sais de nitrato ou borbulhando oxigênio na suspensão sob aquecimento produz nanopartículas de maghemita. Através deste método consegue-se preparar grandes quantidades de SPION, porém as nanopartículas tendem a agregar e a distribuição de tamanhos é ligeiramente larga. Outro método usual é a decomposição térmica, no qual utiliza-se solventes orgânicos, sais orgânicos de ferro e surfactantes. A presença de surfactantes (ácidos graxos ou alquilaminas) controla o crescimento das nanopartículas e estabilizam as nanopartículas. Os precursores metálicos incluem acetilacetonatos, cupferronatos, etc. Este método oferece um bom controle do tamanho, forma e distribuição de tamanhos, porém exige o uso de altas temperaturas, reagentes caros e tóxicos, e produz baixa quantidade de nanopartículas. Outros métodos também usados são a síntese em microemulsão, síntese hidrotérmica, síntese sonoquímica, método poliol, método de eletrodeposição, método sol-gel, etc.

As vantagens da utilização de SPION estão relacionadas com a capacidade de: guiar o material para sítios específicos no organismo utilizando campo magnético externo, gerar contraste em imagens por ressonância magnética (MRI), fornecer calor mediante a aplicação de campo magnético alternado e degradação em produtos não tóxicos. As principais aplicações de SPION em biomedicina são: sistemas de entrega (fármacos, genes, proteínas), agentes de contraste em imagens por ressonância magnética, tratamento por hipertermia magnética, marcação e focalização celular, separação e purificação celular, bioanálise e imunoanálise. A entrega direcionada de fármacos antitumorais adsorvidos nos SPION é uma alternativa promissora de quimioterapia avançada (Figura 15.a). As nanopartículas carregadas com o fármaco são transportadas e concentradas no tecido alvo com o auxílio de um campo magnético externo e os fármacos são liberados de maneira controlada [55, 60–62].

Nanopartículas de óxido de ferro de distribuição comercial com tamanhos de núcleo de 3-6 nm e revestimento de dextrana (com tamanhos hidrodinâmicos de 20-150 nm) como Feridex®, Endorem®, Combidex® e Sinerem® foram aprovados para ressonância magnética em pacientes [56]. A hipertermia magnética é um conceito relativamente novo que encontra a sua aplicação no tratamento de diferentes tipos de câncer e se baseia na geração de calor no local do tumor. Isto resulta em alterações na fisiologia de células doentes e conduzem à apoptose. Os mecanismos de tratamento por hipertermia envolvem stress térmico intracelular no intervalo de temperatura de 41°C - 46 °C, resultando na ativação de diversos mecanismos de degradação intracelular e extracelular. Terapia por hipertermia magnética é baseada na geração de calor por SPION quando são expostas a campos magnéticos alternados (Figura 15.b). Quando SPION são injetadas no tumor e um campo magnético alternado é aplicado, a temperatura do tumor aumenta e resulta em apoptose de células tumorais [63–65]. Pesquisas científicas reportam que o tratamento de câncer por hipertermia magnética é mais efetivo quando é aplicado em combinação com outros tratamentos, tais como quimioterapia e radioterapia do que aplicando só um tipo de tratamento usando as mesmas concentrações de fármaco e temperatura de tratamento. Também outros estudos demonstraram que a atividade citotóxica dos fármacos anticancerígenos é maximizada às temperaturas utilizadas no tratamento por hipertermia magnética. Estes resultados indicam que a quantidade de drogas utilizadas em quimioterapia para o tratamento do câncer pode ser eficazmente reduzida pela combinação com tratamento por hipertermia [65, 66].

Figura 15. a) SPION empregadas como sistemas de liberação controlada. b) SPION empregadas na terapia por hipertermia magnética.



Adaptado de S. Laurent et al. [62]

Como as SPION são facilmente manipuláveis pela ação de um campo magnético externo, estas são empregadas como adsorventes magnéticos onde moléculas alvo interagem com as SPION e então o sistema é separado do meio de dispersão empregando-se o campo magnético externo. Esta técnica é conhecida por separação magnética e é muito utilizada em biotecnologia nos métodos de separação de células, proteínas, anticorpos e outras biomoléculas, em catalise para recuperar catalisador suportado na superfície das SPION e em remediação ambiental para remover metais pesados, pesticidas, etc. As vantagens desta técnica são a rapidez e o baixo custo em comparação com outras técnicas e evita processos de filtração ou centrifugação. Atualmente, vários sorventes magnéticos estão disponíveis comercialmente, tais como Sepharose®, Dynabeads® e Chemicell®, alguns contendo o reagente de ativação para imobilizar várias substâncias. Os requisitos principais para sorventes magnéticos são a grande quantidade de grupos funcionais que interajam com a molécula alvo por massa de material magnético e um apreciável valor de magnetização de saturação. As micropartículas poliméricas que contem SPION dispersas na matriz respondem mais

rapidamente que SPION livres, por isso são as mais empregadas [58, 60]. A Figura 16 mostra a separação magnética de um tipo de peptídeo de uma solução de peptídeos.

Figura 16. Esquema de separação magnética de peptídeos.



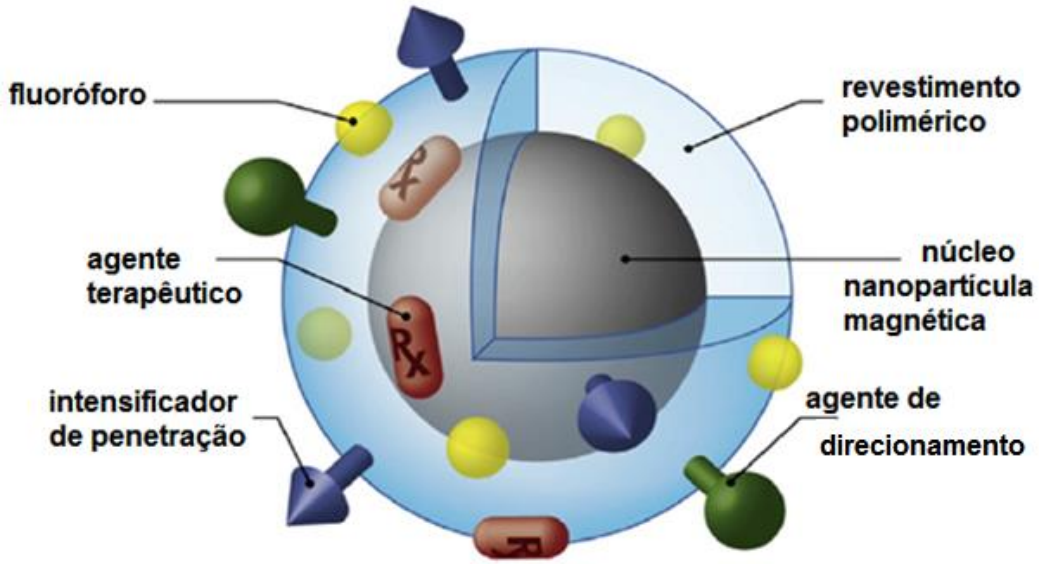
Adaptado de W. Zhou et al. [140]

1.3. Modificação da superfície de nanopartículas de óxido de ferro

Na preparação e armazenamento de nanopartículas, a estabilidade coloidal é de extrema relevância [67, 68]. Para a correta utilização nas aplicações biomédicas, as SPION devem possuir estabilidade coloidal nas condições de trabalho, normalmente em solução aquosa. Na ausência de qualquer revestimento de superfície, as nanopartículas de óxido de ferro magnético têm superfícies hidrofóbicas com elevado valor da relação área/volume [56, 68, 69]. Em geral, as partículas de tamanho nanométrico se agregam em suspensão devido às forças atrativas de van der Waals para minimizar a energia de superfície. A formação de agregados altera as propriedades superparamagnéticas e também reduz a área livre para conjugar moléculas na superfície das nanopartículas. A superfície das nanopartículas de óxido de ferro deve ser modificada para evitar a agregação das nanopartículas, alcançar a estabilidade cinética coloidal em água, obter biocompatibilidade, evitar a adsorção não específica em células, e permitir a formação

de ligações covalente ou adsorção de moléculas com atividade biológica (fármacos, genes, fluoróforos, etc.) [56, 68]. A Figura 17 mostra a representação de uma SPION com a superfície modificada, possui um revestimento polimérico e moléculas com atividade biológica como um agente terapêutico (fármaco), um intensificador de penetração em células (ácido fólico), etc.

Figura 17. Representação de um SPION com a superfície modificada.



Adaptado de C. Sun et al. [141]

Várias abordagens para a modificação da superfície de nanopartículas de óxido de ferro para aplicações em biomedicina foram desenvolvidas [70, 71]. Os métodos mais mencionados na literatura consistem na modificação da superfície com: (1) Pequenas moléculas com grupos carboxilato, fosfato, dióis, tióis, etc. os quais formam ligações com a superfície das nanopartículas, (2) Polímeros hidrofílicos (sintéticos ou de base biológica), os quais conferem estabilidade mecânica, coloidal e química. Além disso, permitem o encapsulamento de compostos terapêuticos e de agentes de imagem. Vários polímeros, tais como poli(etileno-co-vinil acetato), polivinilpirrolidona (PVP), poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) ou polietilenoglicol (PEG) têm sido utilizados como materiais de revestimento em suspensão aquosa . Polímeros naturais, incluindo a gelatina, dextrana, poli(ácido láctico), amido, albumina e quitosana têm sido

amplamente utilizados para a dispersão de nanopartículas de óxido de ferro em meio aquoso. A modificação da superfície com polímeros pode acontecer durante a síntese das nanopartículas ou em etapas posteriores. Assim também é possível modificar a superfície com polímeros previamente sintetizados ou gerar a polimerização dos monômeros *in situ* sobre a superfície das nanopartículas e (3) Sílica, descrita no item 1.4.

1.4. Modificação da superfície de nanopartículas de óxido de ferro com sílica

A funcionalização com óxido de silício (SiO_2), também conhecido como sílica, consiste na formação de uma casca de sílica ao redor das SPION obtendo nanopartículas com uma estrutura caroço-casca. O emprego da sílica apresenta algumas vantagens, tais como: (1) O revestimento confere a estabilidade coloidal das nanopartículas de óxido de ferro em suspensão e evita as interações entre as nanopartículas, impedindo a aglomeração. (2) O revestimento também protege a SPION contra a degradação química e biológica, a liberação de espécies reativas de oxigênio e a ativação do sistema imune [67]. (3) Possui elevada hidrofilicidade, biocompatibilidade e estabilidade química. (4) A tecnologia de preparação já é bem conhecida e a variação da espessura da casca é relativamente fácil de controlar. (5) Além disso, o revestimento de sílica com funções orgânicas (grupos metacrilato, amina, carboxila, etc) auxilia a ligação de moléculas com atividade biológica na superfície das nanopartículas, a qual é importante para várias aplicações em biomedicina [72]. Um tipo especial de sílica muito utilizado é a sílica mesoporosa, pois apresenta poros nos quais é possível armazenar moléculas de interesse, sendo mais eficiente esse tipo de sílica para armazenar moléculas em comparação com a sílica convencional. Usualmente, a sílica mesoporosa é sintetizada utilizando-se moléculas que se adsorvem na sílica durante a polimerização das espécies precursoras do óxido, uma etapa posterior é necessária para remover essas moléculas produzindo a sílica em estado mesoporoso [73].

A modificação de superfície de SPION com sílica é realizada através do método sol-gel, o qual consiste na hidrólise controlada de alcoxisilanos, tal como o ortossilicato de tetraetila (TEOS), em uma solução de álcool em água e empregando um catalisador (usualmente hidróxido de amônio) para formar silanóis (Equação 1). Os oligômeros são formados na solução pela condensação dos silanóis (Equação 2). Os oligômeros ou os

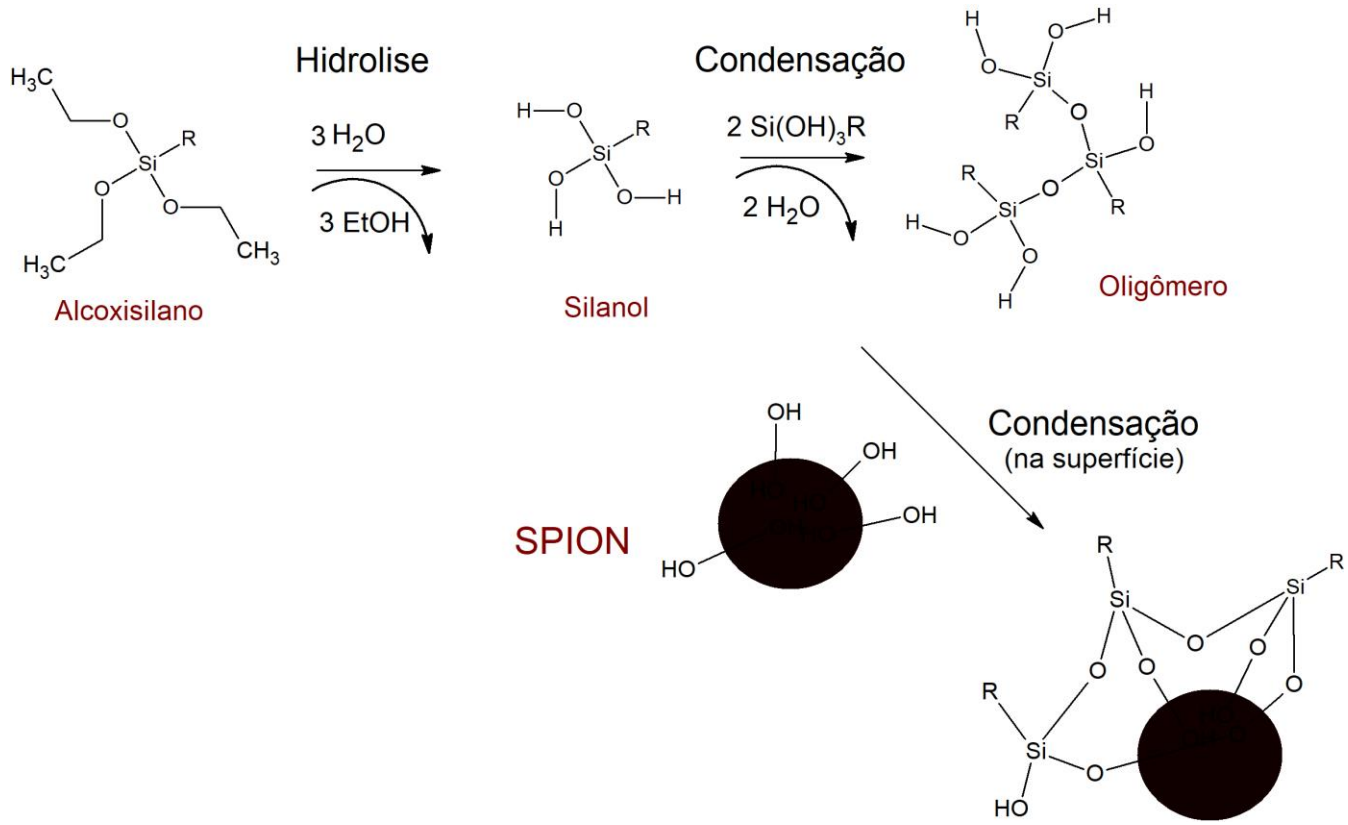
silanóis reagem com os grupos hidroxila presentes na superfície das SPION também por reações de condensação. Este processo permite inicialmente a formação de ligações covalentes entre a superfície das SPION e a cadeia siloxano, e depois o crescimento da casca de sílica [59, 73]. Um esquema deste processo é mostrado na Figura 18 (R pode ser qualquer grupo orgânico funcional).

Hidrólise: $Si\text{-}(OR)_4 + 4H_2O \rightleftarrows Si(OH)_4 + 4ROH$ Equação 1

Condensação: $\text{-Si-OH} + \text{HO-Si-} \rightarrow \text{−Si-O-Si-} + H_2O$ Equação 2

A incorporação de sílica na superfície das SPION produz um aumento no tamanho das nanopartículas o qual pode diminuir a estabilidade coloidal e se for usado para aplicações in vivo pode aumentar a probabilidade de captura pelas células do sistema imunológico. Também a incorporação de sílica afeta a interação entre as nanopartículas e um campo magnético externo, pois a magnetização de saturação é menor no sistema caroço-casca do que nas SPION sem modificação de superfície, o que pode ser prejudicial quando as aplicações envolvem separação magnética ou quando as nanopartículas são dirigidas utilizando um campo magnético externo. Por isso é importante controlar a quantidade de sílica depositada na superfície das SPION. A espessura da casca de sílica formada pelo método sol-gel é finamente ajustada através do controle da concentração do alcoxisilano (usualmente TEOS), a concentração do álcool ou a concentração do catalisador (usualmente hidróxido de amônio), o tempo de reação e a temperatura da solução. Controlando esses parâmetros de síntese tem sido possível formar cascas de sílica com espessuras de 20 até 100 nm. Outra forma de controlar a espessura da casca de sílica é utilizando o método sol-gel em microemulsão, porém esse método requer uma etapa de lavagem intensiva para eliminar os surfactantes [74].

Figura 18. Esquema da modificação da superfície de SPION com sílica empregando um alcoxisilano.



Elaborado pelo autor.

A introdução de grupos funcionais na superfície das SPION empregando alcoxisilanos acontece por duas vias: a modificação da superfície das SPION utilizando diretamente o alcoxisilano com o grupo funcional de interesse o qual produz a casca de sílica com os grupos funcionais livres na superfície das nanopartículas ou a formação previa de uma casca de sílica empregando TEOS para posteriormente modificar a superfície com o alcoxisilano que possui o grupo funcional de interesse [75]. O primeiro método é mais simples e consome menor quantidade de reagentes, porém alguns pesquisadores asseguram que o segundo método produz nanopartículas com melhores propriedades. Uma grande variedade de alcoxosilanos com grupos orgânicos funcionais encontra-se disponível comercialmente, o que facilita muito a introdução de grupos

funcionais na superfície das SPION. Os alcoxisilanos com grupos funcionais mais populares são (3-aminopropil)trietoxisilano (APTS, com grupo amina primária), (3-mercaptopropil)trietoxisilano (MPTMS, com grupo tiol), 3-(trimetoxisilil)propil metacrilato (MPS, com o grupo metacrilato) e (3-glicidiloxipropil)trimetoxisilano (com o grupo epóxido). A APTS é o alcoxisilano mais empregado pois reagindo com uma molécula adequada pode deixar um novo grupo funcional na superfície, por exemplo a reação entre a amina primaria e o anidrido succínico deixa grupos carboxila na superfície da nanopartículas [73, 76]. A presença de grupos amina gera uma carga elétrica positiva na superfície das nanopartículas a qual pode adsorver moléculas ou polímeros com carga negativa através da atração eletrostática. Também é muito empregada a reação entre o grupo amina primária e uma molécula com grupo carboxila, a qual é catalisada geralmente pela 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) [73].

A elevada carga negativa da casca de sílica em suspensões com pH>3 fornece repulsão entre as duplas camadas elétricas das nanopartículas, o qual aumenta a estabilidade coloidal. Em valores altos de pH (soluções alcalinas) a sílica perde estabilidade química, pois dissolve nessas condições. Porém, as condições comuns de trabalho estão dentro da faixa de pH onde a sílica apresenta estabilidade química e coloidal [59].

2. Objetivos

-Produzir agregados de SPION com tamanhos homogêneos.

-Estabelecer um método para formar uma casca de sílica na superfície dos agregados de SPION.

-Avaliar a influencia da concentração do TEOS na espessura da casca de sílica formada.

3. Experimental

3.1. Materiais e reagentes

Cloreto de ferro (III) hexahidratado ($FeCl_3.6H_2O$), cloreto de ferro (II) tetrahidratado ($FeCl_2.4H_2O$), ácido oleico e dodecilsulfato de sodio (SDS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich e utilizados sem purificação. Solução de hidróxido de amônio (NH_4OH, 25%) e etanol (96%) foram comprados da VWR Prolabo e usados como recebidos. Polivinilpirrolidona (PVP) e ortossilicato de tetraetila (TEOS) foram obtidos da Fluka. O octano foi obtido da Acros Organics e acetona da Laurylab. Água deionizada foi usada em todos os experimentos.

3.2. Preparação do ferrofluido orgânico

Em 80 mL de água foram dissolvidos 10,16 g de $FeCl_3.6H_2O$ e 3,7 g de $FeCl_2.4H_2O$ (razão molar Fe^{3+}/Fe^{2+} = 2) e vazados em um reator de vidro de 250 mL equipado com um agitador mecânico. A solução foi agitada a 500 rpm. Depois, 80 mL de hidróxido de amônio foram adicionados ao reator o qual produz a precipitação das SPION. A agitação continuou durante 2 horas para terminar a formação das nanopartículas. Ácido oleico (8 mL) foi adicionado gota a gota ao reator e a agitação continuou durante 15 minutos. As SPION com ácido oleico na superfície (OAN) foram separadas com um ímã e lavadas várias vezes com uma solução acetona-água (1:1). Finalmente, as nanopartículas foram secas e trituradas até obter um pó fino que se dispersou em octano, obtendo o ferrofluido orgânico [77].

3.3. Preparação de agregados de SPION (ME)

Uma emulsão magnética foi preparada através da emulsificação do ferrofluido, o qual foi utilizado como fase dispersa da emulsão direta (O/W) e a fase contínua foi uma solução aquosa de SDS (12% m/v). Solução de SDS (9,8 mL) e 0,25 mL de ferrofluido orgânico (9,6% m/v) foram colocados cuidadosamente em um frasco e emulsionados por ultrassom (Vibra -cell 75042, Bioblock Scientific, amplitude 60%) durante 3 minutos. A emulsão obtida foi mantida sob agitação rotativa durante uma noite. Depois, a emulsão foi aquecida até aproximadamente 95 ºC durante alguns dias para evaporar do octano. Durante este processo o volume foi mantido constante pela reposição da água.

3.4. Preparação de agregados de SPION modificados com sílica na superfície (Si-MN)

A modificação da superfície de agregados de SPION com sílica foi realizada pelo processo sol-gel, usando TEOS como precursor da sílica e hidróxido de amônio como catalisador. Os agregados do volume de 10 mL de suspensão de ME foram separados com um ímã, depois foram lavados com água deionizada, e então redispersos em 3 mL de solução de PVP (10% m/v). A suspensão preparada foi mantida em agitação durante 3 horas. Em seguida, 5 mL de NH_4OH foram adicionados à suspensão e a agitação continuou durante 15 min. Adicionou-se uma solução de TEOS (em etanol) à suspensão e manteve-se em agitação durante uma noite. As partículas Si-MN foram separadas por ímã e lavadas com água deionizada. Para avaliar o efeito do TEOS na espessura do revestimento de sílica foram preparadas cinco amostras diferentes, incorporando TEOS e etanol de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3. Volumes de TEOS e de etanol utilizados para preparar amostras Si-MN.

Amostra	TEOS (mL)	Etanol (mL)
Si-MN1	0.50	1.0
Si-MN2	0.75	1.0
Si-MN3	1.00	1.0
Si-MN4	1.25	1.0
Si-MN5	2.00	1.0

3.5. Caracterização das amostras

3.5.1. Medidas de diâmetro hidrodinâmico (Dh)

O diâmetro hidrodinâmico médio (Dh) das partículas em suspensão aquosa (pH 7) foi determinado no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern) pela técnica de Espalhamento de luz dinâmico (DLS) com um ângulo de dispersão fixo de 173° em relação à luz incidente usando um laser de He–Ne (λ = 632,8 nm) como fonte de luz. O Dh foi calculado tomando uma média de 3 medidas.

3.5.2. Medidas de Potencial Zeta

As medidas do potencial zeta das partículas foram realizadas utilizando o método de microelectroforese no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). O potencial zeta foi medido em função do pH dispersando as nanopartículas em uma solução aquosa NaCl $5x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$. O potencial zeta foi calculado com uma média de 4 medidas. O pH das suspensões foi variado no intervalo 2,5 - 10,5 utilizando soluções HCl 0,1 $mol.L^{-1}$ e NaOH 0,1 $mol.L^{-1}$.

3.5.3. Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas em um espectrofotômetro FTIR Nicolet iS50 FTIR (Thermo Scientific). As amostras foram secas antes da análise. Os espectros foram obtidos no intervalo 4000-500 cm^{-1} no modo ATR.

3.5.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foram obtidas com um microscópio eletrônico Phillips CM120. Uma gota de suspensão de partículas altamente diluída foi colocada em uma grade de cobre e seca à temperatura ambiente antes da análise. As análises foram realizadas a uma tensão elétrica de 100 kV.

4. Resultados e discussão

4.1. Caracterização das nanopartículas e nanoestruturas

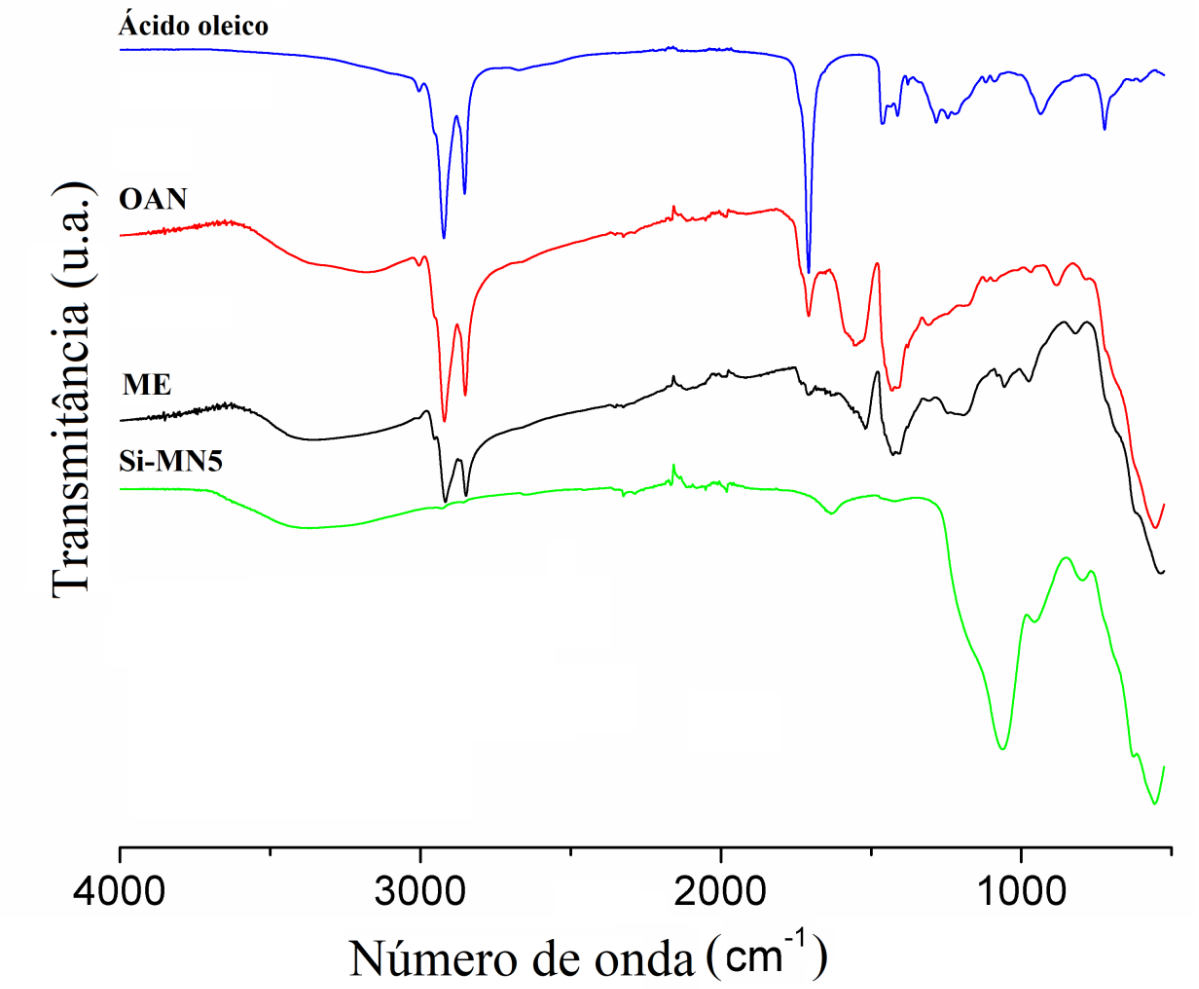
4.1.1. Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

A Figura 19 mostra os espectros FTIR do ácido oleico, SPION com ácido oleico na superfície (OAN), agregados de SPION (ME) e agregados de SPION modificados com sílica na superfície (Si-MN5). No espectro do ácido oleico, duas bandas características apareceram em 1710 e 1285 cm^{-1}, as quais foram atribuídas à vibração de estiramento das ligações C=O e C-O, respectivamente. O espectro da OAN exibe uma banda a 1710 cm^{-1} atribuída à vibração de estiramento do grupo carboxila do ácido oleico livre. Duas bandas largas estão presentes em 1560 cm^{-1} e 1420 cm^{-1} atribuídas ao estiramento assimétrico e ao estiramento simétrico do grupo carboxilato (COO^-), respectivamente, do ácido oleico imobilizado na superfície das nanopartículas. Além disso, uma banda intensa em 550 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento da ligação Fe-O. Esta banda também está presente no espectro infravermelho da ME e Si-ME, o que confirma a presença do óxido de ferro nas amostras [78–81].

O espectro infravermelho de ME é similar ao espectro de OAN, entretanto apresenta duas bandas adicionais pouco intensas, uma em 1248 cm^{-1} correspondente à vibração de estiramento assimétrico do sulfato, e a outra em 1060 cm^{-1} atribuídas à vibração por estiramento simétrico do sulfato [82]. Estes resultados confirmam a presença de SDS nos agregados de SPION (ME).

O espectro infravermelho do Si-MN5 apresenta três bandas centradas em 1065, 950 e 795 cm^{-1}, as quais correspondem ao estiramento assimétrico Si-O-Si, ao estiramento Si-OH e ao estiramento simétrico Si-O-Si, respectivamente. Estas bandas evidenciam a presença de sílica na amostra Si-MN5. Nenhuma banda atribuída a PVP foi observada no espectro infravermelho da Si-MN5, o qual indica um adequado processo de lavagem para eliminar PVP, que se adsorve facilmente na superfície da sílica. O espectro FTIR da Si-MN5 confirma que esta amostra esta composta principalmente por óxido de ferro e sílica [83–86].

Figura 19. Espectros FTIR de ácido oleico, SPION com ácido oleico na superfície (OAN), agregados de SPION (ME) e agregados de SPION modificados com sílica na superfície (Si-MN5).



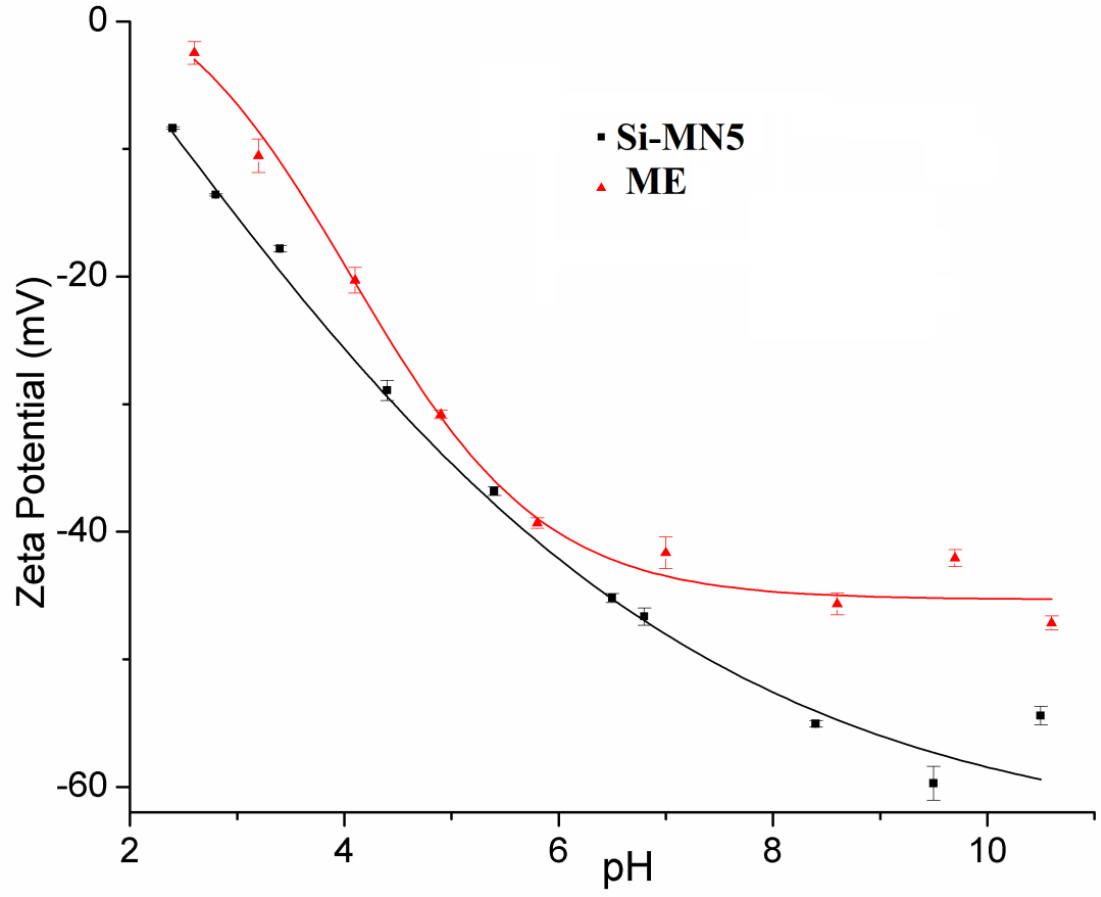
Elaborado pelo autor.

4.1.2. Curvas de potencial zeta

A mudança da carga de superfície das amostras resulta na mudança do potencial zeta. As medidas do potencial zeta foram, portanto realizadas para investigar a modificação da superfície dos agregados de SPION. A Figura 20 representa os valores de potencial zeta em função do pH das amostras ME e Si-MN5. A amostra ME apresenta valores negativos de potencial zeta devido à presença dos íons sulfato com carga negativa na superfície das nanopartículas. As moléculas de dodecilsulfato estão organizadas ao redor das nanopartículas de óxido de ferro de forma que as seções hidrofóbicas estão em contato com as nanopartículas hidrofóbicas e os grupos sulfato estão em contato com o meio aquoso, pois estes grupos tem uma alta afinidade pela água [87, 88].

A curva de potencial zeta da Si-MN5 é semelhante à curva do potencial zeta das nanopartículas de sílica. Este resultado foi o esperado, pois o potencial zeta depende das propriedades do material na superfície das nanopartículas. O ponto isoelétrico (PIE) é definido como o pH no qual o potencial zeta das nanopartículas é zero. O PIE da Si-MN5 é próximo de 2, que é o mesmo valor de PIE de nanopartículas de sílica reportado em artigos científicos [89, 90]. Os grupos silanol (-Si-OH) na superfície das nanopartículas de sílica tendem a dissociar-se para formar uma espécie carregada negativamente ($-Si-O^-$) quando pH> 2. A presença dessas espécies explica o valor negativo do potencial zeta quando pH> 2. Da curva do potencial zeta é confirmada a presença da casca de sílica na superfície dos agregados de SPION [91, 92].

Figura 20. Potencial zeta em função do pH de agregados de SPION (ME) e de agregados de SPION modificados com sílica na superfície (Si-MN5).



Elaborado pelo autor.

4.2. Influencia da quantidade do TEOS nas propriedades das amostras Si-MN

4.2.1. Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

A Figura 21 exibe os espectros FTIR dos agregados de SPION modificados superficialmente com sílica (Si-MN) as quais foram preparadas com diferentes quantidades de TEOS. Um incremento na quantidade de TEOS durante a síntese produz um aumento na intensidade da banda centrada em 1065 cm^{-1}. Esta banda está associada à sílica, isso sugere um aumento na quantidade de SiO_2 nas amostras quando se utiliza uma maior quantidade de TEOS na síntese. Ao ser o TEOS a fonte de sílica, o aumento na quantidade TEOS produz um aumento na quantidade de sílica produzida. Se a quantidade de óxido de ferro se mantem constante em todas as preparações, um aumento de TEOS produz uma maior quantidade de sílica disponível para ser incorporada na superfície das nanopartículas. Este efeito explica o incremento da sílica nas amostras ao aumentar a quantidade de TEOS.

4.2.2. Medidas de diâmetro hidrodinâmico (Dh)

O diâmetro hidrodinâmico médio (Dh) das amostras Si-MN1, Si-MN2, Si-MN3, Si-MN4 e Si-MN5 de acordo com a incorporação de TEOS (Tabela 3) é mostrado na Figura 22. O Dh das amostras não aumentou abruptamente durante as medidas. O Dh das 3 primeiras amostras é similar indicando que os nanosistemas tem uma casca de sílica com espessura similar ou que não se formou uma casca de sílica. No entanto, notou-se um incremento no Dh com o aumento da quantidade de TEOS nas amostras Si-MN4 e Si-MN5. As medidas de diâmetro hidrodinâmico consideram o tamanho do sistema formado pelas partículas em suspensão e as moléculas de água adsorvidas na superfície, por isso os valores de diâmetro hidrodinâmico são maiores do que o tamanho calculado ao analisar as micrografias TEM. O desvio padrão das medidas de Dh da amostra Si-MN5 é maior do que o desvio padrão das outras amostras, o que indicaria que as partículas Si-MN5 estariam ligeiramente aglomeradas em suspensão. Para interpretar melhor estes resultados foi realizada a análise por microscopia eletrônica de transmissão.

Figura 21. Espectros FTIR dos agregados de SPION modificados com sílica na superfície: Si-MN1, Si-MN2, Si-MN3, Si-MN4 e Si-MN5.

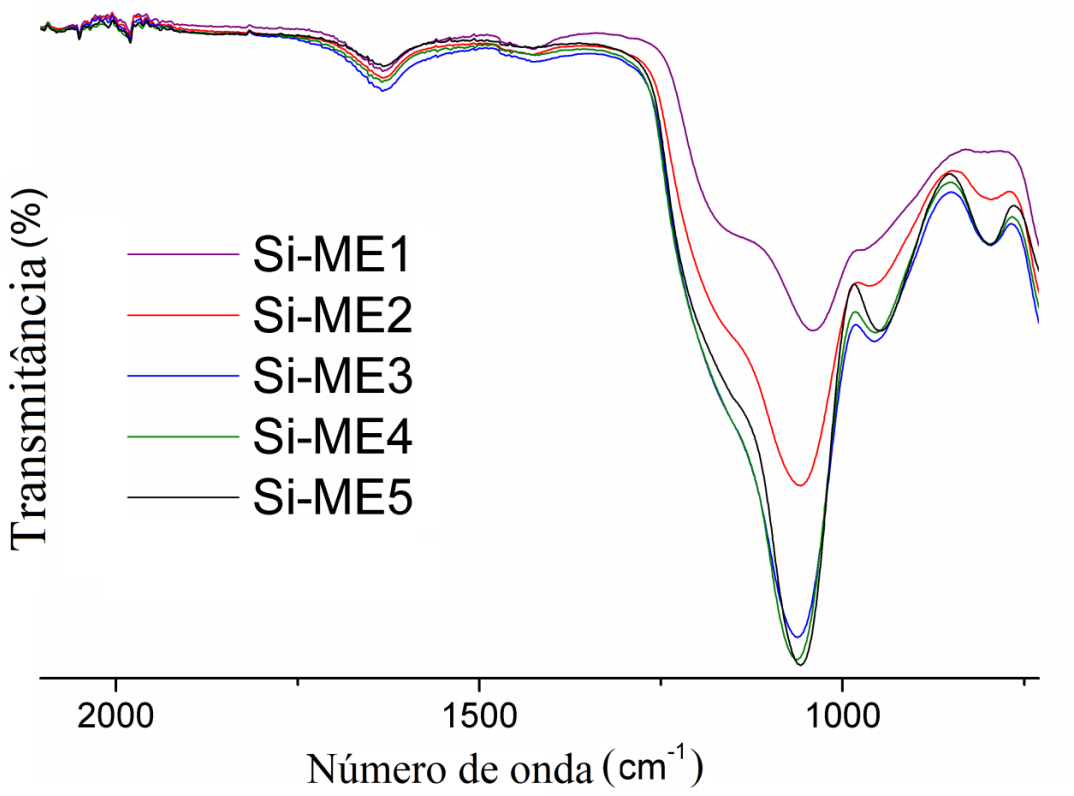
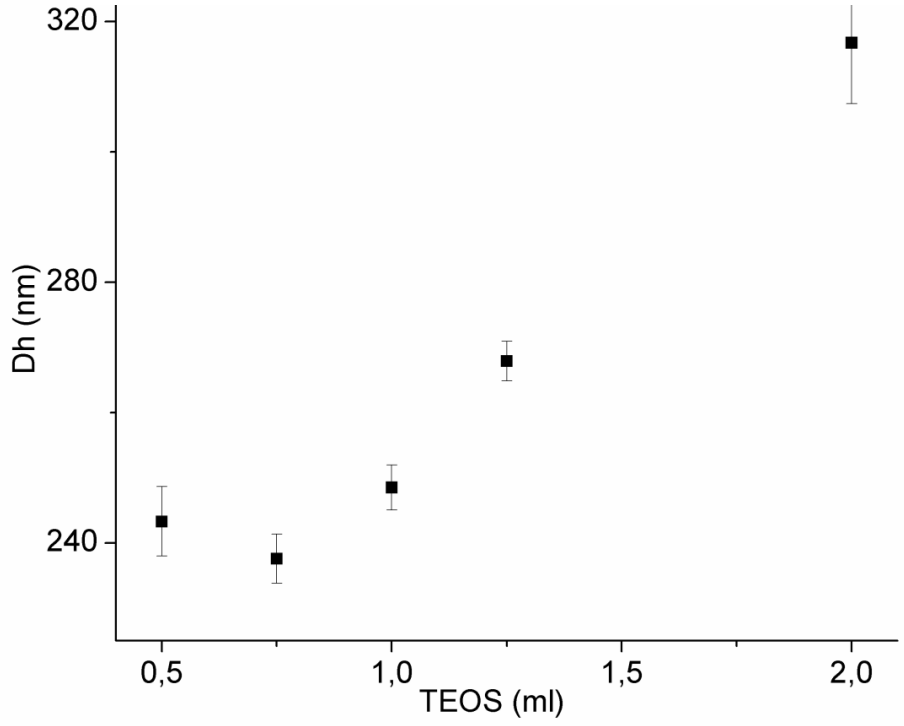


Figura 22. Diâmetro hidrodinâmico (Dh) das amostras Si-MN: Si-MN1, Si-MN2, Si-MN3, Si-MN4 e Si-MN5 de acordo com a incorporação de TEOS durante a síntese (Tabela 3).



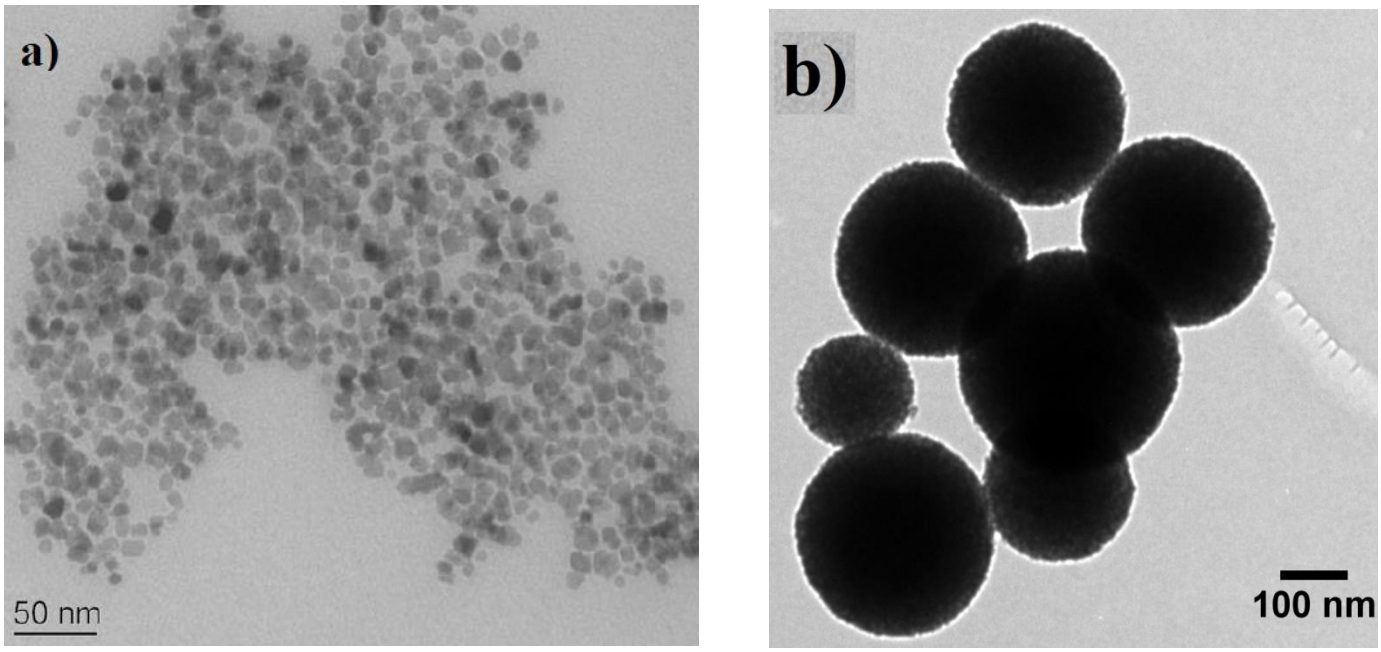
Elaborado pelo autor.

4.2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A micrografia TEM da amostra OAN (Figura 23.a) mostra nanopartículas aproximadamente esféricas e ligeiramente irregulares com um tamanho médio de 9±1 nm. Geralmente, as nanopartículas de óxido de ferro preparadas pelo método de coprecipitação exibem forma aproximadamente esférica com algumas irregularidades. Estas características foram observadas também nas nanopartículas preparadas. Nanopartículas de óxido de ferro com um tamanho menor do que 30 nm usualmente tem um comportamento superparamagnético à temperatura ambiente, portanto é muito provável que as nanopartículas obtidas sejam superparamagnéticas e por isso foram consideradas como SPION [57].

Na imagem TEM de ME (Figura 23.b) observa-se agregados esféricos com tamanhos similares, os quais estão formados por nanopartículas OAN. O tamanho médio dos agregados é 223±67 nm. A micrografia mostrou partículas e não gotículas o qual é o usual quando se analisa emulsões. Este resultado sugere que a etapa de aquecimento posterior à emulsificação removeu uma parte considerável do solvente orgânico do ferrofluido inicial induzindo a formação de agregados de SPION.

Figura 23. Imagens TEM de: a) OAN e b) ME.



Elaborado pelo autor.

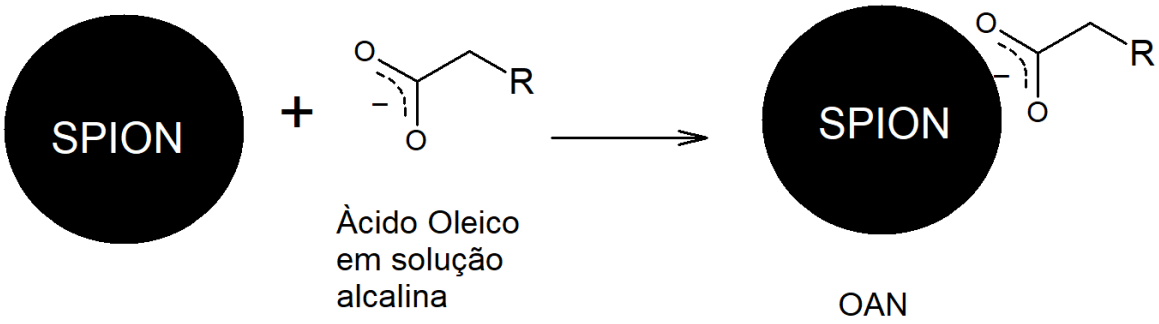
Quando a solução concentrada de hidróxido de amônio foi adicionada à solução de sais de ferro, o pH aumentou abruptamente. Em soluções com o pH alto, a solubilidade dos sais de ferro em água é baixíssima, portanto a adição de hidróxido de amônio resultou na formação de espécies de ferro precursoras de baixa solubilidade que precipitaram juntas formando nanopartículas de Fe_3O_4, resultando em uma suspensão preta similar a observada na Figura 14.a. Os cátions de ferro e os íons hidróxido reagiram segundo a seguinte equação:

$$2Fe^{3+}(aq) + Fe^{2+}(aq) + 8OH^{-}(aq) \rightarrow Fe_3O_4(s) + 4H_2O(l) \qquad \text{Equação 3}$$

Embora não tenha sido realizada a análise por difração de raios X para confirmar a estrutura de espinélio inverso da magnetita, os parâmetros de síntese que foram empregados normalmente produzem nanopartículas de magnetita. Além disso, as nanopartículas obtidas foram atraídas fortemente por um imã e de cor preta, características típicas da magnetita. O método de coprecipitação utilizado produziu nanopartículas de óxido de ferro sem nenhum adsorbato na superfície das nanopartículas que possa estabilizar coloidalmente as nanopartículas. Devido a pouca afinidade da superfície pela água, as nanopartículas produzidas formam agregados irregulares e de distintos tamanhos [93–95]. A estabilidade coloidal aumenta quando o pH da suspensão é muito alto, tipicamente acima de pH 9. Nessas condições são geradas espécies com carga elétrica negativa na superfície das nanopartículas que resultam em estabilidade eletrostática [57, 96].

A adição de ácido oleico às SPION modificou a superfície das nanopartículas. Quando o ácido oleico é adicionado a uma suspensão com um elevado pH o grupo carboxila (-COOH) do ácido oleico se dissocia liberando um íon hidroxônio para formar o grupo carboxilato ($-COO^-$). O grupo carboxilato possui uma alta afinidade pela superfície das nanopartículas de óxido de ferro, assim os grupos carboxilato e os ions ferro na superfície das nanopartículas formam uma ligação de coordenação deixando na superfície das nanopartículas uma monocamada de cadeias alifáticas [57, 97]. A Figura 24 mostra um esquema da modificação da superfície de SPION com ácido oleico onde o grupo R equivale a $-(CH_2)_6CH=CH-(CH_2)_7-CH_3$.

Figura 24. Esquema da modificação da superfície de SPION com ácido oleico.



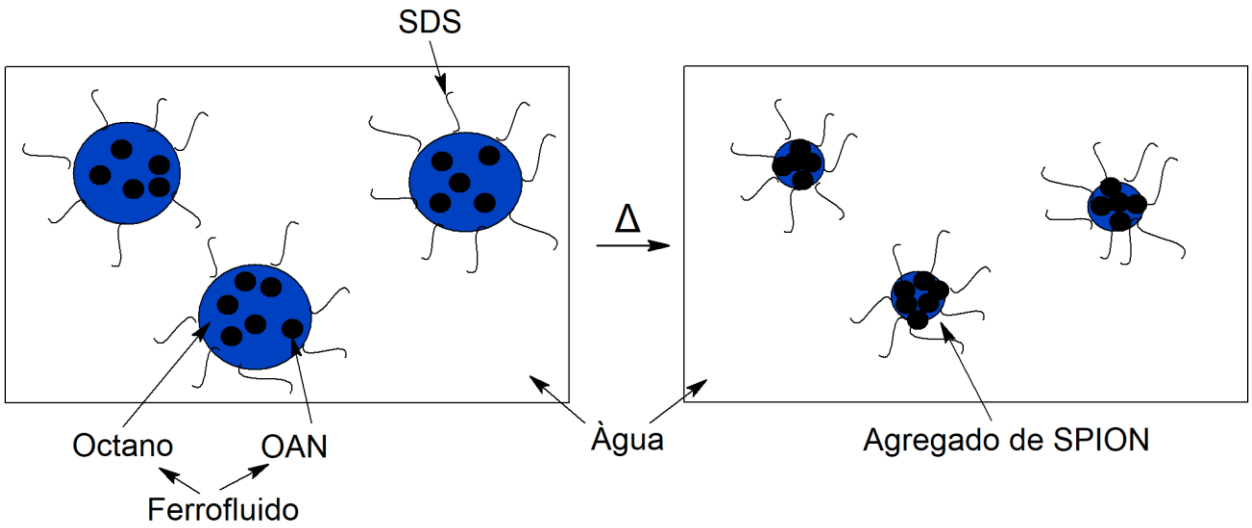
Elaborado pelo autor.

As SPION com ácido oleico na superfície (OAN) não formam uma suspensão estável em água pois as cadeias alifáticas presentes na superfície tem uma baixa afinidade pela água. Porém, possuem uma alta afinidade por solventes apolares, por isso ao dispersar as nanopartículas OAN em octano se formou uma suspensão estável. Neste caso a estabilidade da suspensão foi produto da estabilidade estérica. O ácido oleico na superfície atua como uma barreira física que impede o contato entre as nanopartículas em suspensão evitando que as mesmas aglomerem. Este tipo de suspensões com alta estabilidade coloidal é conhecido como ferrofluido orgânico. A formação de uma emulsão O/W dispersando o ferrofluido em água é conseguida com o surfactante SDS como estabilizante. Uma emulsão é um sistema produzido pela mistura de dois líquidos imiscíveis através da dispersão de gotículas de um dos líquidos no outro liquido. Devido a que os dois líquidos são imiscíveis é necessária a introdução de um surfactante como o SDS. A molécula de SDS possui uma estrutura similar ao ácido oleico, ou seja uma cadeia alifática longa com um grupo iônico na extremidade, neste caso o grupo sulfato. Na emulsão magnética, as gotícula de ferrofluido dispersas em água possuem estabilidade coloidal devido à organização das moléculas de SDS ao redor das gotículas de ferrofluido. A cadeia alifática do SDS tem alta afinidade pela fase orgânica apolar por isso esta parte da molécula está em contato com o ferrofluido deixando exposto na parte exterior os grupos sulfato, os quais tem afinidade pela fase aquosa polar. As moléculas de SDS organizadas na interface evitam a coalescência das gotículas, pois o SDS atua como barreira física (estabilidade estérica) e também a carga elétrica dos grupos sulfatos, confirmada pelas medidas de potencial zeta, geram repulsão eletrostática entre as gotículas (estabilidade eletrostática) [98, 99]. O tamanho das

gotículas dispersas na emulsão é controlado pela concentração da fase orgânica, a concentração da fase aquosa e a concentração do surfactante, normalmente a emulsificação produz gotículas com tamanhos similares [100].

Devido a que as gotículas do ferrofluido na emulsão tinham tamanhos similares e o ferrofluido foi uma suspensão muito estável, a remoção lenta do octano presente na fase dispersa produziu agregados de SPION com tamanhos similares. A Figura 25 mostra um esquema deste processo. Apesar da remoção de uma parte considerável do octano, os agregados mantiveram a estabilidade coloidal, pois o SDS mantinha a interação hidrofóbica com o acido oleico presente na superfície das SPION e a interação hidrofílica com a solução.

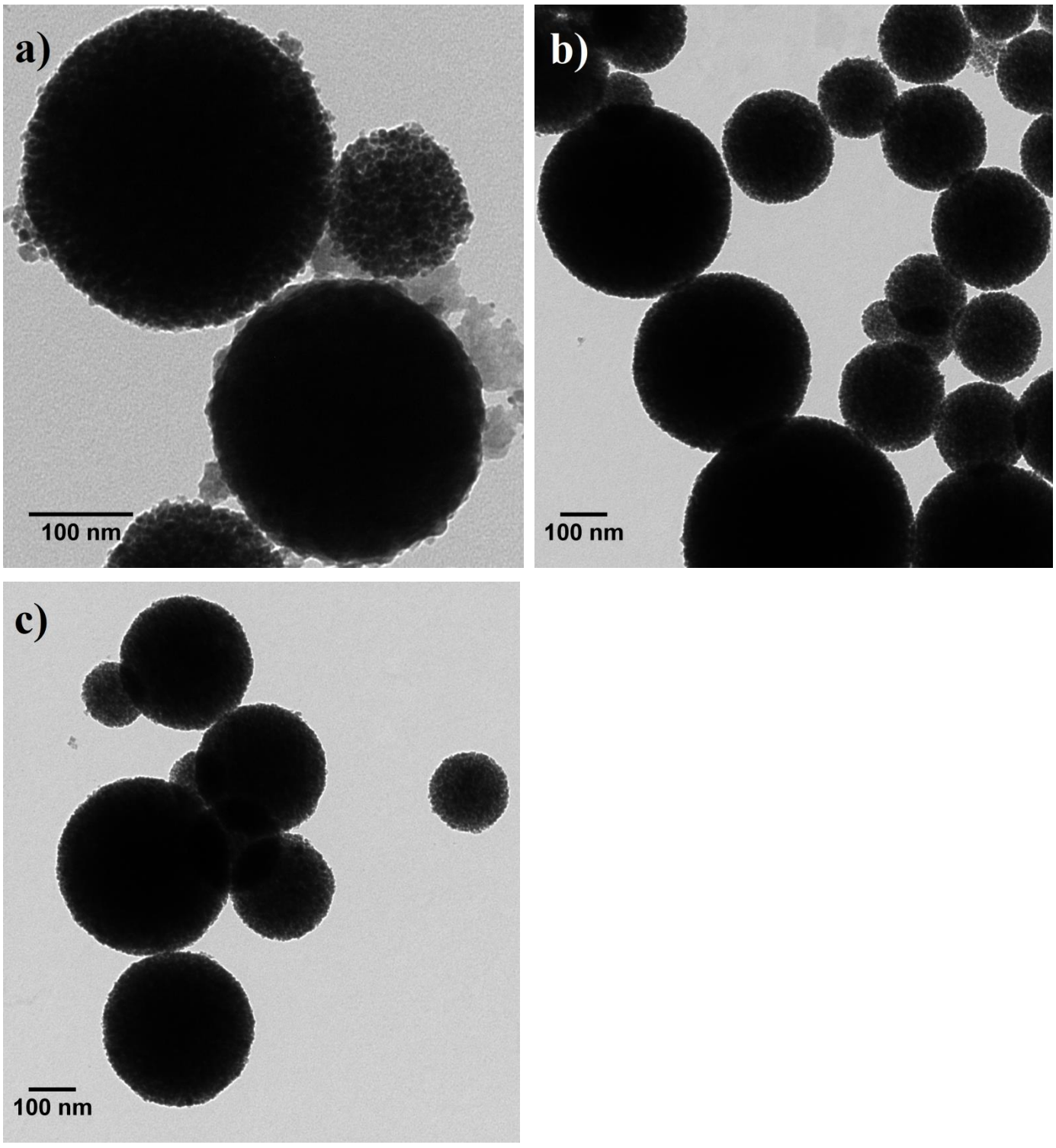
Figura 25. Formação dos agregados de SPION.



Elaborado pelo autor.

As imagens TEM das amostras Si-MN1, Si-MN2 e Si-MN3 (Figura 26) exibem agregados de nanopartículas com ausência de uma casca de sílica similar às partículas mostradas na microscopia TEM da amostra ME (Figura 23.b). Este resultado indica que não foi formada a casca de sílica nas condições de preparação, por isso estas amostras apresentaram um diâmetro hidrodinâmico similar (Figura 22).

Figura 26. Imagens TEM de: a) Si-MN1, b)Si-MN2 e c)Si-MN3.

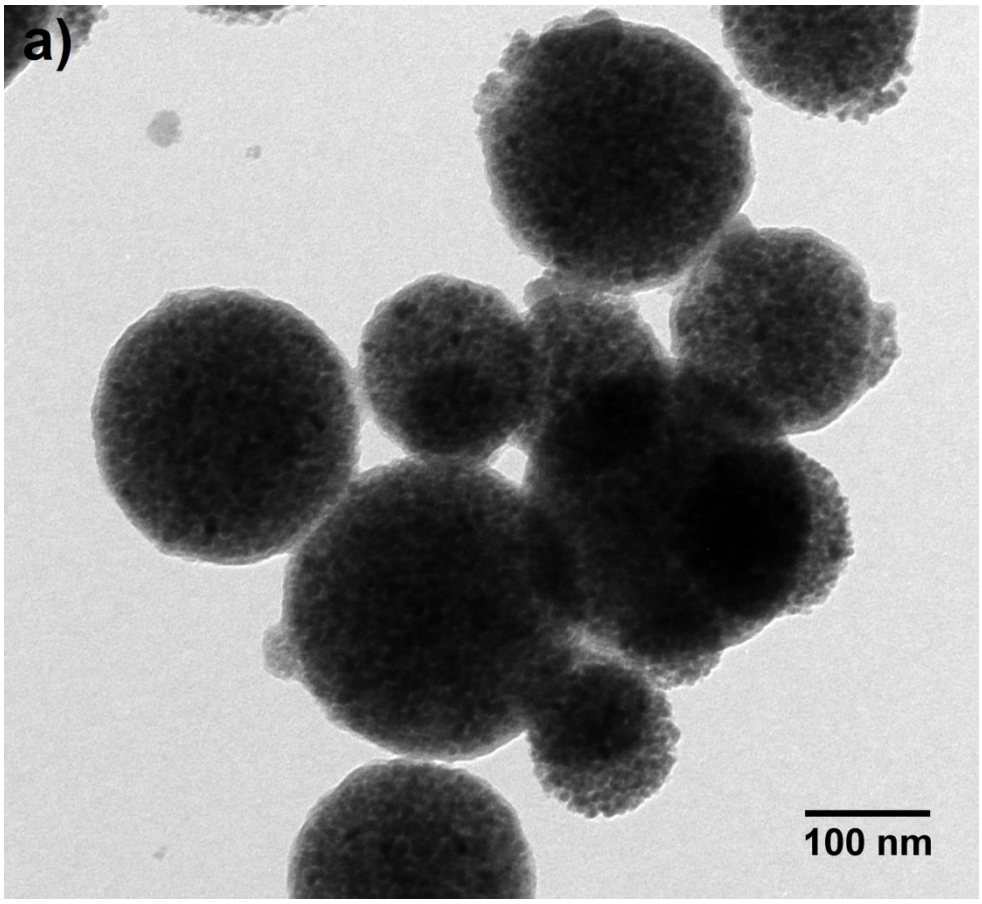


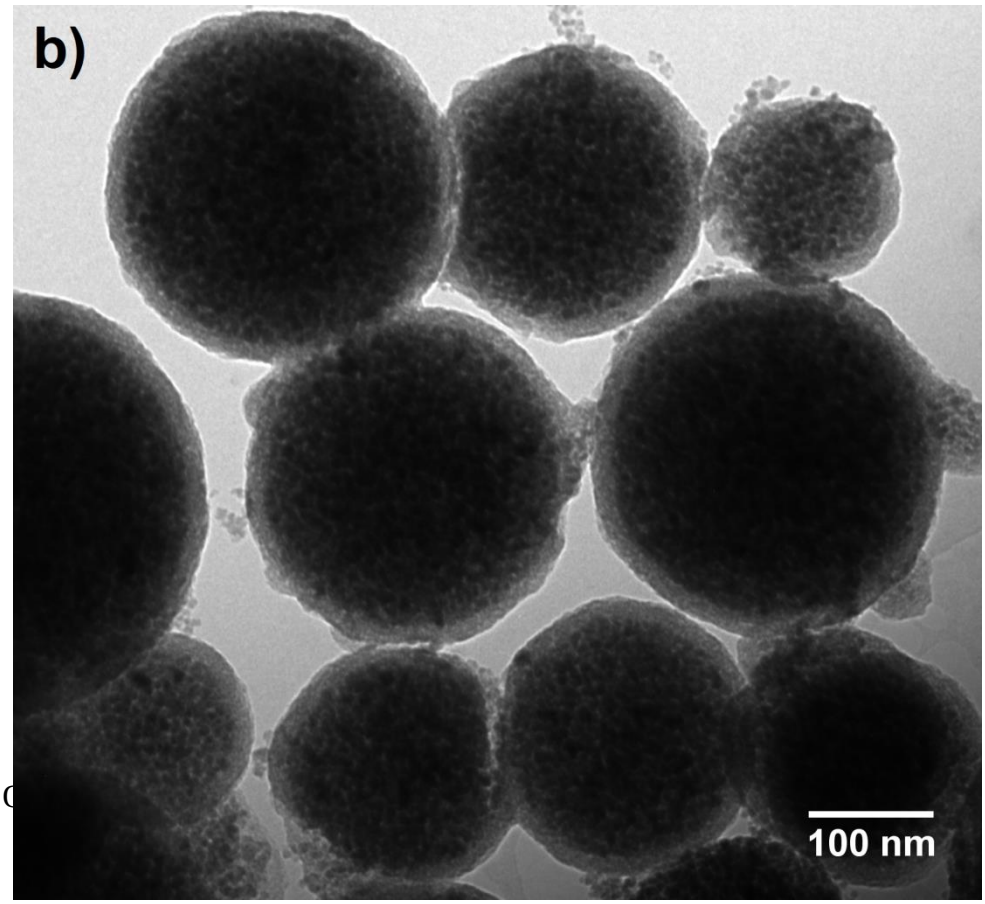
Elaborado pelo autor.

As imagens TEM das amostras Si-MN4 e Si-MN5 (Figura 27) mostram partículas esféricas formadas pelos agregados de SPION recobertos com uma casca de outro material, o qual é identificado como sílica de acordo com os resultados prévios de FTIR e medidas de potencial zeta. A espessura da casca de sílica de Si-MN4 e de Si-MN5 é de 10 nm e 20 nm, respectivamente. A presença da casca de sílica produziu um maior diâmetro hidrodinâmico nas amostras Si-MN4 e Si-MN5 em comparação com as amostras Si-MN1, Si-MN2 e Si-MN3 (Figura 26). Aparentemente a sílica se depositou também entre as SPION separando estas nanopartículas.

A casca de sílica é formada diretamente pelo método sol-gel quando existe afinidade química entre a superfície das nanopartículas e a sílica. Superfícies de sílica, titânia, minerais, hematita, magnetita e outros óxidos podem ser facilmente modificadas com sílica empregando o método de sol-gel. Usualmente estas superfícies possuem grupos hidroxila disponíveis para reagir com os grupos hidroxila das espécies precursoras da sílica através da reação de condensação formando ligações covalentes. Porém, outras superfícies precisam da ajuda de estabilizantes, surfactantes ou agentes de acoplamento para ser revestidas com uma casca de sílica. As moléculas de SDS presentes na superfície dos agregados de SPION não possuem grupos hidroxila para reagir através da condensação, portanto é necessária a utilização de um agente de acoplamento para conseguir a formação da casca de sílica. O PVP é um polímero anfifílico não iônico usado amplamente e que se adsorve facilmente em metais e óxidos de metais. Devido às suas propriedades tem sido utilizado como agente de acoplamento para permitir a formação de casca de sílica na superfície de nanopartículas. Quando os agregados de SPION são suspensos em uma solução de PVP e se deixa em agitação por um tempo, as cadeias poliméricas de PVP se adsorvem na superfície dos agregados deixando na superfície suas seções que interagem melhor com a água, ou seja os grupos amida [101].

Figura 27. Imagens TEM: a) Si-MN4 e b) Si-MN5.



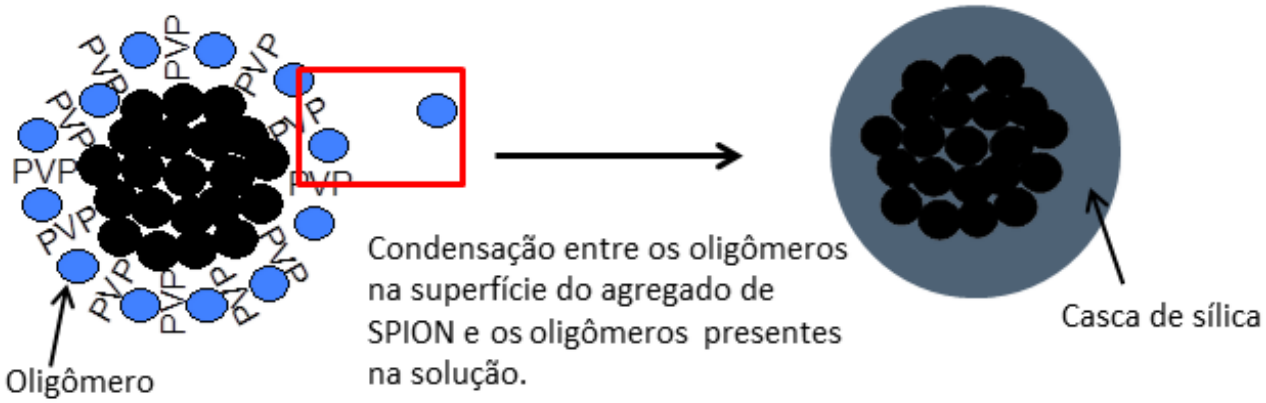


Elaborado pelo autor.

O TEOS incorporado na suspensão hidrolisa para formar silanóis, os quais polimerizam através da reação de condensação formando oligômeros de óxido de silício. A formação da casca de sílica ao redor dos agregados de SPION provavelmente seja produto da afinidade do grupo amida da PVP pelos oligômeros de óxido de silício. Os oligômeros interagem com os grupos amida da PVP formado uma primeira camada óxido de silício sobre a superfície dos agregados de SPION. Esta camada contem grupos hidroxila para reagir com os oligômeros através da condensação e assim se consegue formar a casca de sílica ao redor dos agregados de SPION [102–104]. Um esquema deste processo é mostrado na Figura 28.

Os resultados de TEM e DLS indicam que a casca de sílica ao redor dos agregados de SPION é detectada quando 1,25 mL ou um volume maior de TEOS é usado no procedimento descrito. No entanto, os resultados FTIR evidenciaram a presença de sílica em todas as amostras Si-MN. Provavelmente, nas amostras Si-MN1, Si-MN2 e Si-MN3, a sílica se depositou entre os interstícios presentes nos agregados de SPION, o que explicaria a presença de sílica nestas amostras e a ausência de uma casca de sílica. Por isso nas imagens TEM das amostras Si-MN4 e Si-MN5 parece que a sílica se depositou também entre as SPION. Para formar a casca de sílica é necessário gerar uma quantidade de sílica maior do que aquela necessária para preencher os interstícios do interior dos agregados, assim o excesso de sílica se deposita na superfície dos agregados. Também é provável a formação de uma fina camada de sílica na superfície dos agregados, a qual não é detectada pelas técnicas utilizas.

Figura 28. Formação da casca de sílica ao redor do agregado de SPION.



Elaborado pelo autor.

5. Conclusões

Agregados de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com tamanhos similares foram recobertos com uma casca de sílica de espessura controlada (Si-MN) pela quantidade de TEOS utilizado como precursor. A superfície de nanopartículas de óxido de ferro foi modificada com ácido oleico e depois suspensas em octano para obter um ferrofluido. O ferrofluido orgânico obtido foi emulsionado em uma solução aquosa de SDS. Os agregados de SPION foram submetidos à reação sol-gel empregando PVP como agente de acoplamento. As partículas Si-MN estão compostas pelos agregados de SPION recobertos com uma casca de sílica. Determinou-se aproximadamente a quantidade mínima de TEOS necessária para induzir a formação da casca de sílica ao redor dos agregados de nanopartículas de óxido de ferro. Abaixo da quantidade mínima, provavelmente acontece a deposição de sílica nos interstícios dos agregados, ou a formação de uma fina camada de sílica na superfície dos agregados.

6. Sugestões para trabalhos futuros

A adsorção ácidos nucleicos na superfície da sílica é utilizada como método de separação deste tipo de moléculas. Os agregados de SPION modificados com sílica na superfície (Si-MN) podem ser utilizados para a separação magnética de ácidos nucleicos. Assim, a perspectiva de continuidade deste trabalho é estudar a capacidade das partículas Si-MN visando à separação de ácidos nucleicos.

Ademais, a eficácia de adsorção de adsorventes multifuncionais é aprimorada pela introdução de grupos funcionais na superfície para prover a eficiência com diferentes sítios de adsorção. Em experimentos preliminares foram introduzidos grupos amina, carboxila e anilina na superfície de amostras de Si-MN e a adsorção de ácidos nucleicos ainda não foi avaliada.

Capítulo 3: Síntese e caracterização de nanopartículas híbridas de sílica e albumina

1. Introdução

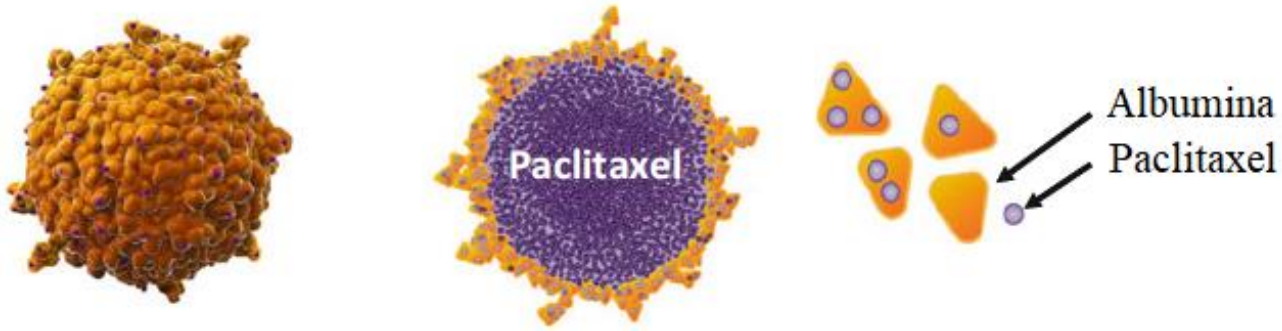
1.1. Albumina

A albumina, um componente do sangue humano, é uma proteína natural biocompatível, biodegradável, solúvel em agua, relativamente barata de obter, os produtos de sua degradação não são tóxicos, possui uma alta estabilidade, sua meia vida é 19 dias in vivo e se encontra em forma pura em várias fontes. A função natural da albumina é trabalhar como transportador de várias moléculas no sistema circulatório. Para cumprir com a essa função, a albumina possui a habilidade de formar ligações com uma ampla variedade de moléculas [105, 106]. Essa característica é produzida pela grande quantidade de resíduos de aminoácidos com carga elétrica que permite interagir com outras moléculas através de interações eletrostáticas [107]. Portanto, pode servir como um excelente transportador de fármacos e outras biomoléculas. Existem diferentes tipos de albumina segundo sua origem, as mais estudadas são a albumina de soro humano (HSA) e a albumina de soro bovino (BSA) [106]. A HSA e a BSA compartilham muitas propriedades, tais como, solubilidade em agua, massa molecular similar, número aproximado de resíduos de aminoácidos, etc. A BSA é a albumina empregada na maioria dos estudos publicados devido à sua aceitação pela indústria farmacêutica e seu uso como proteína modelo em estudos fundamentais.

Nanosistemas com albumina são facilmente dispersáveis e exibem boa estabilidade coloidal. Todas estas características fazem da albumina um material adequado na preparação de nanomaterias para sistemas de liberação controlada [106]. Estudos prévios confirmaram a utilidade da albumina nesta área tecnológica e alguns sistemas estão atualmente disponíveis no mercado como por exemplo o Abraxane®, aprovada pela FDA em 2005, consiste em *paclitaxel* (Taxol®, fármaco anticancerígeno) encapsulado em nanopartículas de albumina (Figura 29) [105]. As nanopartículas preparadas a base de albumina poderiam ser utilizadas em terapia fototérmica, terapia fotodinâmica, obtenção de imagens, ressonância magnética, tomografia fotoacústica ou imageamento multimodal [106]. Mais de 100 diferentes moléculas ativas ou de

diagnóstico foram incorporadas em partículas de albumina para serem administradas por diferentes vias [105].

Figura 29. Representação esquemática do Abraxane®.



Adaptado de M. Otagiri et al. [142]

Nanopartículas de BSA podem ser preparadas por métodos distintos, os principais são o método de emulsificação e o método de nanoprecipitação. O primeiro método envolve a emulsificação da solução de albumina em uma fase oleosa e a solidificação por desnaturação térmica ou reticulação química usando formaldeído ou glutaraldeído [105, 107]. Uma limitação deste método é a necessidade de usar solventes orgânicos, para a remoção de ambos os resíduos oleosos e os surfactantes necessários para a estabilização da emulsão. Outra desvantagem deste método é que é difícil controlar o tamanho das partículas de albumina. O método de nanoprecipitação consiste na mudança da solubilidade da albumina em água. A diminuição de solubilidade se consegue mediante alterações no pH, na concentração de sais, nas condições de solubilidade e mais comumente pela adição de outro liquido miscível, conhecido como não-solvente [107]. Esta técnica permite aprimorar o controle na distribuição de tamanhos das nanopartículas. A presença de grupos tiol na albumina, devido ao aminoácido cisteína, tem sido aproveitada para empregar a albumina como um molde (*template*) para a síntese de nanopartículas inorgânicas. Este processo é similar à biomineralização que acontece nos seres vivos. Os grupos tiol interagem com ions metálicos e fornecem a estrutura de suporte para a formação das nanopartículas

inorgânicas [106]**.** Lomis et al. prepararam nanopartículas de HSA carregadas com paclitaxel pelo método de emulsificação, obtendo nanopartículas com tamanho controlável entre 100 e 200 nm. Os parâmetros como concentração de reagentes e as condições de homogeneização foram avaliados e correlacionados com as propriedades dos nanosistemas. Também foram estudadas a liberação do fármaco e a citotoxicidade em células de câncer, e os resultados mostraram que o nanosistema possui uma eficiência terapêutica ótima e apresenta poucos efeitos colaterais [108]. Recentemente, Tarhini et al. prepararam nanopartículas de BSA empregando o método de nanoprecipitação e estudaram o efeito da concentração dos reagentes, a proporção solvente/não-solvente e a força iônica da solução tampão. A estabilidade coloidal, o potencial zeta e o tamanho das nanopartículas foram avaliadas, encontrando as condições ótimas para produzir nanopartículas de BSA adequadas para aplicações biomédicas [107].

1.2. Nanopartículas híbridas

A preparação de nanopartículas é um campo de pesquisa que tem experimentado um alto desenvolvimento tecnológico e interesse comercial durante as últimas décadas devido à produção de materiais com propriedades únicas que têm sido amplamente utilizados para inovação. Particularmente, no domínio biomédico e farmacêutico, as nanopartículas têm recebido atenção considerável devido à sua capacidade de interagir intimamente com estruturas biológicas. As nanopartículas podem ser sintetizadas a partir de diferentes compostos precursores, tais como, polímeros, metais, óxidos, calcogênios, etc. Em outros casos, as nanopartículas híbridas ou nanocompositos podem ser feitos com mais de um componente. O livro de ouro da IUPAC define materiais híbridos como: “Material composto por uma mistura íntima de componentes inorgânicos, componentes orgânicos ou ambos os tipos de componentes. Nota: Os componentes geralmente se interpenetram em escalas inferiores a 1 μm” [109]. Na escala nanométrica a interpenetração de dois materiais acontece sempre em escalas inferiores a 1 μm, pelo qual a mistura de dois ou mais materiais quaisquer na escala nanométrica podem ser denominados como nanomateriais híbridos [110]. A presença de diferentes materiais em um único sistema permite a interação entre eles e pode levar a alterações nas propriedades, tais como estabilidade coloidal, estabilidade química, biodegradabilidade, capacidade de carga, toxicidade, etc. As nanopartículas híbridas

estão principalmente correlacionadas com a integração de componentes orgânicos, macromoléculas biodegradáveis, macromoléculas sensíveis a estímulos, lipídios, macromoléculas anfifílicas e dendrímeros, com ingredientes inorgânicos, tais como nanopartículas de ouro, prata, sílica, óxido de ferro, pontos quânticos, etc [111]. A maior parte dos nanosistemas híbridos consiste em nanopartículas inorgânicas com uma propriedade específica encapsuladas em uma matriz orgânica que protege a nanopartícula inorgânica e confere estabilidade coloidal ao sistema.

Nanopartículas híbridas compostas de polímero e material inorgânico podem ser preparadas por vários métodos de síntese, graças à capacidade de combinar diferentes maneiras para introduzir cada fase no nanosistema. Entre os método mais comuns estão [110]:

1. Métodos nos quais a formação de componentes poliméricos e inorgânicos ocorre *ex situ* e a nanopartícula híbrida é formada pela combinação dos componentes. Dois casos podem ser diferenciados: (i) aqueles em que cadeias poliméricas estão ligadas às partículas inorgânicas; e (ii) aqueles em que nanopartículas poliméricas e nanopartículas inorgânicas são combinadas. Em ambos os casos, a ligação química dos componentes pode ser covalente ou não covalente.

2. Estratégias em que o componente inorgânico (tipicamente nanopartículas inorgânicas) é formado *ex situ* e, depois a polimerização do material orgânico ocorre em sua presença.

3. Estratégias em que a fase de polímero ou as partículas de polímero são formadas *ex situ* e a precipitação do componente inorgânico ocorre *in situ*.

4. Estratégias em que tanto o polímero quanto os componentes inorgânicos são formados simultaneamente *in situ*, durante a formação de nanopartículas híbridas.

Algumas nanopartículas híbridas combinam sinergicamente as funções terapêuticas e de diagnóstico de seus componentes em um único nanosistema, melhorando a eficiência dos tratamentos de doenças. Esses sistemas seguem o conceito de dispositivo teranóstico. Por exemplo, em sistemas que combinam geração de imagens com funções terapêuticas, a biodistribuição dos materiais pode ser monitorada in vivo, reduzindo o potencial de efeitos colaterais não intencionais da toxicidade do

fármaco e também permite que a equipe médica monitore o progresso e a eficácia de uma terapia durante todo o curso do tratamento [111, 112].

1.3. Nanopartículas de sílica e nanopartículas híbridas de sílica

As nanopartículas de sílica (SiO_2) têm muitas propriedades adequadas que as tornam uma plataforma promissora para o desenvolvimento da nanomedicina. Elas mostram uma extensa área de superfície, biocompatibilidade, alta estabilidade química e coloidal, baixo custo, fácil funcionalização da superfície, transparência óptica e fácil difusão por todo o corpo. O tamanho, forma, porosidade e carga de superfície de nanopartículas de sílica são facilmente controlados. Além disso, o revestimento de sílica na superfície de outras nanopartículas é um processo comum de modificação de superfície de nanopartículas [113].

O método de síntese de nanopartículas de sílica mais empregado é o método de Stöber [114], o qual permite a produção de nanopartículas de sílica esféricas e monodispersas a partir de soluções de mistura água e álcool de ortossilicato de tetraetila (TEOS) na presença de hidróxido de amônio como catalisador. A concentração do alcoxisilano, água, álcool, hidróxido de amônio e a temperatura da reação são os parâmetros que determinam o tamanho e a distribuição das nanopartículas [115, 116]. A geração de sílica envolve dois tipos de reações químicas: os silanóis (Si-OH) são formados pela hidrólise do TEOS (equação 4), e as ligações siloxano (Si-O-Si) são formadas pela policondensação entre os silanóis (equação 5).

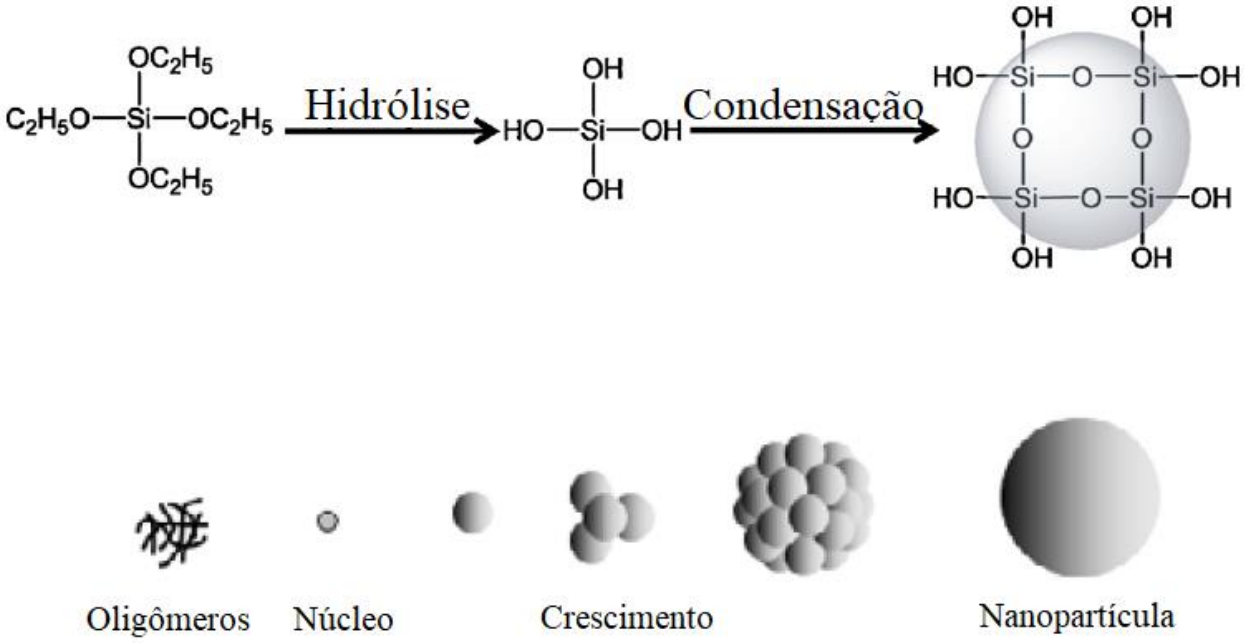
Hidrólise: $Si\text{-}(OC_2H_5)_4 + H_2O \rightarrow Si\text{-}(OC_2H_5)_3OH + C_2H_5OH$ Equação 4

Policondensação: $\text{-}Si\text{-}OH + HO\text{-}Si\text{-} \rightarrow -Si\text{-}O\text{-}Si\text{-} + H_2O$ Equação 5

A formação das nanopartículas de sílica pode ser dividida em duas etapas: (1) a nucleação, a qual envolve a formação de núcleos iniciais de sílica através dos processos de hidrólise e de condensação, e (2) o crescimento, esta etapa pode acontecer pela adição dos monômeros ou oligômeros de sílica na superfície dos núcleos ou pela agregação controlada dos núcleos para formar partículas maiores [115]. Para o crescimento uniforme das nanopartículas é melhor ter um tempo de nucleação curto para que durante o crescimento das partículas todos os núcleos possam crescer pelo

mesmo período de tempo [113]. O controle sobre o crescimento das nanopartículas no processo de Stöber permite a síntese de muitas variedades de partículas de sílica. Embora existam muitas técnicas sintéticas exclusivas para a criação de nanopartículas de sílica, a maioria das técnicas para sintetizar partículas mesoporosas, ocas e de várias formas é fundamentalmente derivada do processo de Stöber [113]. A Figura 30 mostra um esquema da síntese de nanopartículas de sílica através do método de Stöber.

Figura 30. Síntese de nanopartículas de sílica através do método de Stöber.



Adaptado de K. Panwar et al. [86] e de V. Masalov et al. [143]

Nanopartículas hibridas de sílica tem recebido grande interesse na área biomédica pela capacidade de combinar em um único sistema as propriedades da sílica com as funcionalidades oferecidas pelos componentes orgânicos e biológicos. Assim foram propostos muitos sistemas híbridos de sílica para serem empregados como sistemas de liberação controlada de fármacos, agentes para obtenção de imagens, plataformas para tratamento de inflamações e agentes teranósticos [117].

Entre os métodos de produção de nanopartículas híbridas de sílica, destaca-se o método de deposição em molde (*template deposition*) [118, 119]. Alguns polímeros são capazes de se organizar em solução para formar uma variedade de estruturas, tais como micelas, vesículas, microgeis, partículas, etc. Estas geometrias confinadas podem ser usadas como suportes ou moldes para a precipitação e cristalização de matéria inorgânica e, em geral, tornam-se ocluídos na estrutura durante a formação do componente inorgânico, o que resulta em um híbrido polímero/matéria inorgânica. Os polímeros atuam como agentes controladores e orientadores da precipitação dos materiais inorgânicos [110]. Este método é empregado pelos organismos vivos no processo de biomineralização, no qual as biomoléculas (aminoácidos, proteínas, polissacarídeos, lipídios e peptídeos) desempenham um papel crucial na formação dos minerais. Algumas algas conhecidas como diatomáceas conseguem produzir sílica na escala nanométrica em condições biológicas, ou seja em solução aquosa, baixas temperaturas, e meio aproximadamente neutro, o qual resulta muito atrativo no campo de síntese de nanopartículas [120]. O método de deposição em molde permite obter nanopartículas de sílica e nanopartículas de **s**ílica oca com um bom controle do tamanho, forma e porosidade de amostras. Além disso, permite a produção de nanopartículas híbridas com controle sobre a relação sílica-material orgânico, as quais recebem especial atenção devido ao potencial para aplicações no campo biomédico.

Quando são usadas partículas poliméricas coloidais como moldes, o método apresenta duas variantes dependendo do uso de um molde duro ou de um molde mole [110, 118]. A primeira variante permite a deposição de material inorgânico na superfície das partículas duras, as quais atuam como suporte para o crescimento do material inorgânico, resultando geralmente em estruturas caroço-casca. Partículas ocas são obtidas removendo o caroço orgânico através da calcinação. Chen et al. obtiveram uma casca de sílica de espessura controlável ao redor de nanopartículas de poliestireno. O caroço orgânico foi removido por calcinação a 550 °C para obter nanopartículas de sílica ocas com uma distribuição de tamanhos uniforme [121]. Na segunda variante, usando moldes moles como microgeis ou nanogeis, a precipitação da fase inorgânica acontece na rede polimérica, ou seja dentro dos moldes e não se limita à superfície das partículas, obtendo nanopartículas formadas por duas redes (uma orgânica e a outra inorgânica) interpenetradas. Pi et al. sintetizaram microgeis catiônicos com estrutura caroço-casca para a deposição de sílica em molde. A sílica foi formada exclusivamente

na casca dos microgeis, ou seja a casca dos microgeis atuou como um molde mole e o caroço atuou como um molde duro. As nanopartículas obtidas tiveram um caroço de polímero compacto e uma casca hibrida sílica-polímero. A calcinação posterior do material orgânico permitiu obter nanopartículas ocas de sílica. As composição e a morfologia da superfície das nanopartículas híbridas foram controladas ao ajustar os parâmetros de síntese com o teor de água e do precursor de sílica [120]. Wang et al. empregaram as proteínas fibroína e sericina extraídas da seda para produzir nanopartículas de fibroína e nanofilamentos de sericina, as quais foram usadas como moldes para a deposição de sílica na superfície obtendo nanopartículas e nanofilamentos híbridos sílica-fibroina e sílica-sericina, respetivamente. O tamanho e a morfologia dos nanomateriais foi controlado pela concentração dos reagentes e pelas condições de síntese. A deposição da sílica foi produzida pelas ligações de hidrogênio e pelas atrações eletrostáticas entre as proteínas e a sílica. Os nanomateriais híbridos mostraram uma alta capacidade de carga de fármacos como doxorrubicina (hidrofílico) e a paclitaxel (hidrofóbico). A liberação dos fármacos foi considerada rápida em soluções com pH 5,4 e foi lenta em soluções com pH 7,4. Também foi comprovada sua capacidade para eliminar células cancerígenas. Os resultados indicaram que os nanomateriais híbridos preparados são transportadores de fármacos promissores na terapia de câncer [122]. Zhang et al. sintetizaram nanopartículas híbridas de sílica empregando nanogeis como moldes e foi avaliada a capacidade para carregar e liberar albumina de soro bovino (BSA). Utilizando o mesmo copolímero, foram preparados nanogeis compactos e soltos que atuaram como moldes duros e moldes moles, respetivamente. A estrutura e o tamanho das nanopartículas híbridas dependeram do tipo de molde empregado. As nanopartículas preparadas a partir dos moldes duros possuíam uma casca de sílica compacta na superfície, enquanto que as nanopartículas preparadas com moldes moles possuíam uma casca de sílica porosa na superfície, pois a sílica tinha sido depositada na rede polimérica. As primeiras nanopartículas exibiram uma liberação de BSA mais lenta, ou seja conseguiam reter a BSA por mais tempo. As nanopartículas preparadas com o molde mole conseguiram encapsular uma maior quantidade de BSA. Pela incorporação de nanopartículas magnéticas e pelo processo de modificação de superfície com um copolímero pH-responsivo, as nanopartículas hibridas adquiriram novas funções que melhoraram sua atividade farmacológica [123].

2. Objetivos

-Sintetizar nanopartículas monodispersas de albumina (BSA) através do método de nanoprecipitação.

-Sintetizar nanopartículas hibridas BSA-silica empregando o método de deposição de sílica em molde de nanopartículas de BSA.

-Avaliar o efeito da concentração do TEOS e de hidróxido de amônio nas características das nanopartículas híbridas obtidas.

3. Experimental

3.1. Materiais e reagentes

A albumina de soro bovino (BSA, 96%) foi obtida da Sigma-Aldrich. Polivinilpirrolidona (PVP) e ortossilicato de tetraetila (TEOS) foram adquiridos da Fluka. Glutaraldeído (25%), etanol (96%) e hidróxido de amônio (NH_4OH, 25%) foram adquiridos da VWR Prolabo e usados como recebidos.

3.2. Nanopartículas de BSA (BSA-NP)

Preparou-se uma solução aquosa de BSA (20 mg/mL). As nanopartículas de BSA foram obtidas adicionando etanol (não solvente) à solução de BSA (volume de solvente/volume de não solvente = ½) sob agitação magnética à temperatura ambiente. Após a adição do etanol, adicionou-se glutaraldeído (8% em massa em relação à BSA) como agente de reticulação e manteve-se sob agitação magnética durante 10 minutos. O etanol foi então removido por evaporação rotativa e as nanopartículas de BSA dispersas em água foram recuperadas.

3.3. Preparação de nanopartículas híbridas BSA-sílica (BS)

Em 4 mL de suspensão aquosa de BSA-NP (2% m/v) foi dissolvido 0,2 g de PVP e mantido em agitação magnética durante 3 horas. Em seguida adicionou-se hidróxido de amônio à suspensão. Posteriormente, uma solução de TEOS em etanol (25% v/v) foi adicionada à suspensão e mantida sob agitação magnética por aproximadamente 18 horas. As nanopartículas híbridas obtidas foram separadas da solução por centrifugação e resuspensas em água utilizando uma ponteira de ultrassom. Este procedimento foi repetido cinco vezes para garantir a remoção do material que não reagiu. Amostras secas foram obtidas através da liofilização. Diferentes amostras de nanopartículas híbridas BSA-sílica foram preparadas variando a quantidade de hidróxido de amônio e TEOS utilizada na preparação de acordo com a Tabela 4. Avaliou-se a influência da concentração de hidróxido de amônio e de TEOS nas propriedades físico-químicas das nanopartículas obtidas.

Tabela 4. Quantidade de hidróxido de amônio e solução de TEOS usada para preparar as amostras.

Amostra	NH_4OH (µL)	Solução de TEOS (25% v/v, µL)
BS1	280	160
BS2	280	320
BS3	280	480
BS4	160	480
BS5	400	480

3.4. Caracterização de amostras

3.4.1. Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

As análises de FTIR foram realizadas pelo espectrofotômetro FTIR Nicolet iS50 FTIR (Thermo Scientific) no modo ATR. A suspensão de nanopartículas foi colocada no cristal de ATR e deixada secar antes da análise. Os espectros foram obtidos no intervalo de 4000-500 cm^{-1}.

3.4.2. Medidas de potencial zeta

As medidas do potencial zeta das nanopartículas foram realizadas utilizando o método de microelectroforese no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). O potencial zeta foi medido em função do pH dispersando as nanopartículas em uma solução aquosa NaCl $5x10^{-3}$ $mol.L^{-1}$. O potencial zeta foi calculado com uma média de 3 medidas. O pH das suspensões foi variado no intervalo 2,5 - 9,5 utilizando soluções HCl 0,1 $mol.L^{-1}$ e NaOH 0,1 $mol.L^{-1}$.

3.4.3. Análise termogravimétrica (TGA)

As análises termogravimétricas (TGA) das amostras secas foram realizada em um equipamento TG 209 F1 ASC (Netzsch) em um intervalo de temperatura de 25 °C a 1000 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min e sob fluxo de nitrogênio de 20 mL/min.

3.4.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foram obtidas em um microscópio eletrônico Phillips CM120. Uma gota da suspensão de nanopartículas altamente diluída foi colocada em uma grade de cobre e seca à temperatura ambiente antes da análise TEM. As análises foram realizadas a uma tensão elétrica de 100 kV. Foi medido o tamanho de pelo menos 100 nanopartículas de cada amostra usando o programa ImageJ. O tamanho médio e o desvio padrão foram calculados admitindo a distribuição lognormal.

4. Resultados e discussão

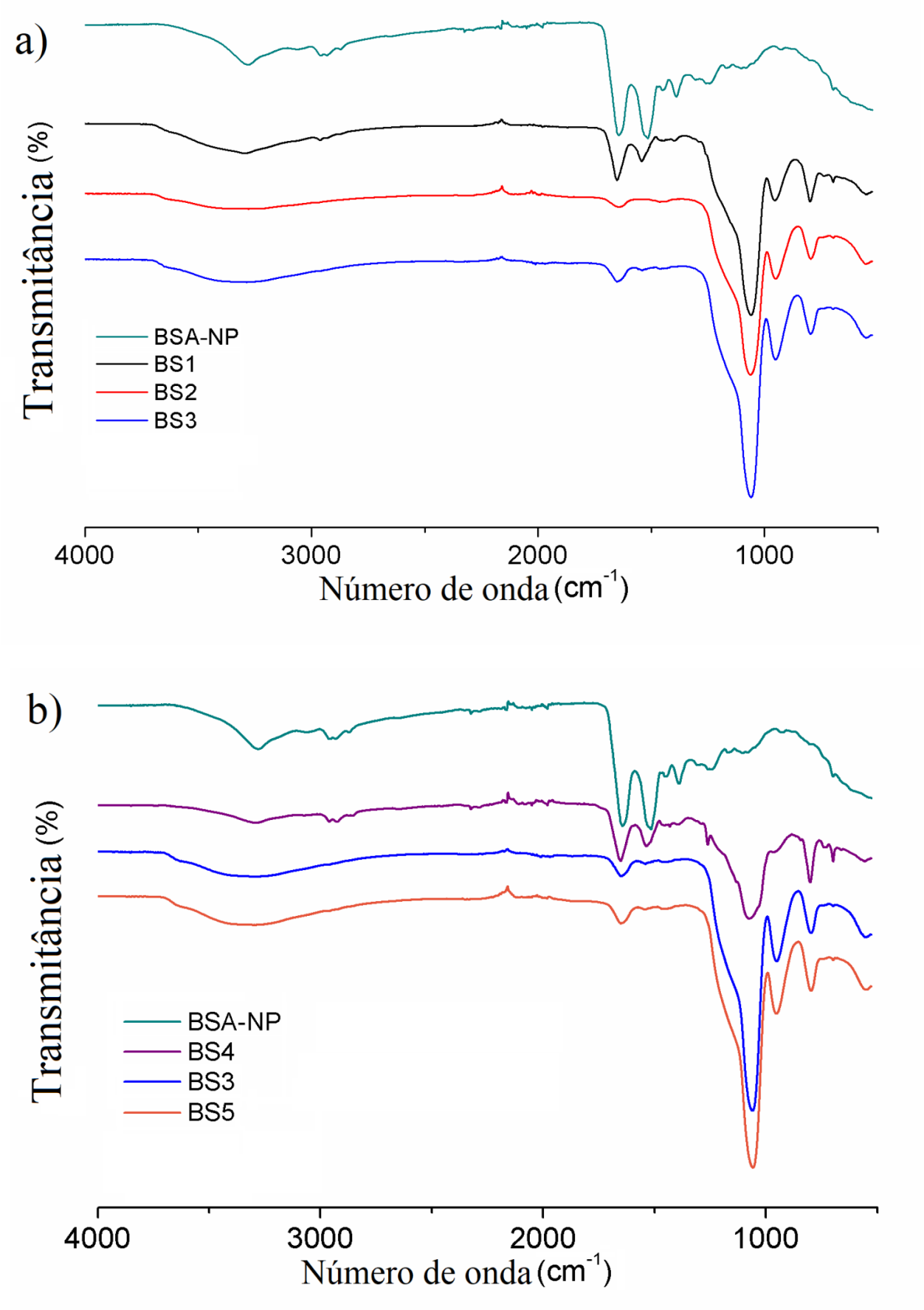
4.1. Caracterização das nanopartículas produzidas

4.1.1. Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

A Figura 31 mostra os espectros FTIR das amostras BSA-NP e BS. O espectro de BSA-NP exibe bandas de 1520 e 1645 cm^{-1}, as quais são atribuídas aos modos de vibração amida II e amida I, respectivamente. Estas bandas são produzidas pela presença de ligações peptídicas na proteína BSA. Bandas em 3060 e 3280 cm^{-1} estão relacionadas com a vibração de estiramento da amina (N-H) e hidroxila (O-H). Bandas em 2960, 2930 e 2870 cm^{-1} estão associadas ao estiramento da ligação C-H. Estas últimas bandas confirmam a natureza orgânica do material examinado [124, 125].

As nanopartículas híbridas BSA-sílica (amostras BS) apresentam bandas centradas em 1060, 950 e 795 cm^{-1} associadas às vibrações de estiramento assimétrico Si-O-Si, estiramento Si-OH e estiramento simétrico Si-O-Si, respectivamente, o que confirma a presença de sílica nessas nanopartículas [86, 126]. Os espectros BS1 e BS4 apresentam bandas atribuídas à BSA e à sílica. No entanto, os espectros de BS2, BS3 e BS5 não apresentam bandas intensas relacionadas com a BSA. Atribuiu-se que o teor de BSA nas amostras BS2, BS3 e BS5 é tão baixo que as bandas relacionadas à BSA não são observadas nos espectros FTIR. Para determinar o conteúdo de sílica nas nanopartículas BS foram realizadas análises termogravimétricas (TGA).

Figura 31. Espectros FTIR: a) Amostras preparadas variando a concentração de TEOS: BS1, BS2, BS3 e BSA-NP. b) Amostras preparadas variando a concentração de hidróxido de amônio: BS4, BS3, BS5 e BSA-NP.



Elaborado pelo autor.

4.1.2. Análise termogravimétrica (TGA)

As curvas TGA das nanopartículas BSA-NP, BS1, BS2, BS3, BS4 e BS5 são mostradas na Figura 32. As derivadas das curvas (DTGA) são mostradas no anexo 1. As perdas de massa na faixa de 25 a 200 °C são atribuídas à perda de água absorvida fisicamente nas nanopartículas. Acima de 200 °C, as perdas de massa são atribuídas à decomposição do material orgânico, que é principalmente albumina. A curva da amostra BSA-NP apresenta uma queda de massa abrupta perto de 300 °C e depois uma diminuição continua de massa até a total calcinação, a qual confirma que efetivamente a amostra BSA-NP está formada por material orgânico.

As amostras BS híbridas diminuíram de massa com o aumento da temperatura devido à calcinação do material orgânico (BSA) no seu interior. Porém, a massa final das amostras BS foi diferente de zero, pois estas amostras também contem sílica, a qual não se decompõe com o aumento da temperatura no intervalo da medida. Consequentemente, a massa remanescente após a calcinação corresponde à sílica [124]. O conteúdo de sílica nas nanopartículas de BS está listado na Tabela 5. As nanopartículas BS2, BS3 e BS5 são as que têm maior porcentagem de sílica e que também pode ser interpretado como que são as de menor porcentagem de BSA como foi sugerido pela análise FTIR. As curvas TGA das amostras BS1 e BS4 exibiram uma queda de massa ligeiramente abrupta perto de 300 °C similar ao comportamento da amostra BSA-NP. No entanto, a diminuição da massa acima de 200 °C nas amostras BS2, BS3 e BS5 não foi abrupta senão continua. Estas diferenças nas curvas TGA das amostras BS foram atribuídas ao conteúdo de sílica. A incorporação de material inorgânico em uma matriz orgânica normalmente favorece a estabilidade térmica, ou seja, retarda o processo de decomposição térmica do material orgânico o que pode ser observado na curva TGA como o aumento da temperatura de decomposição e como a diminuição menos abrupta da massa da amostra [122, 127, 128]. Este efeito foi observado nas curvas TGA das amostras BS, onde as amostras com maior conteúdo de sílica apresentaram uma diminuição mais lenta e continua da massa.

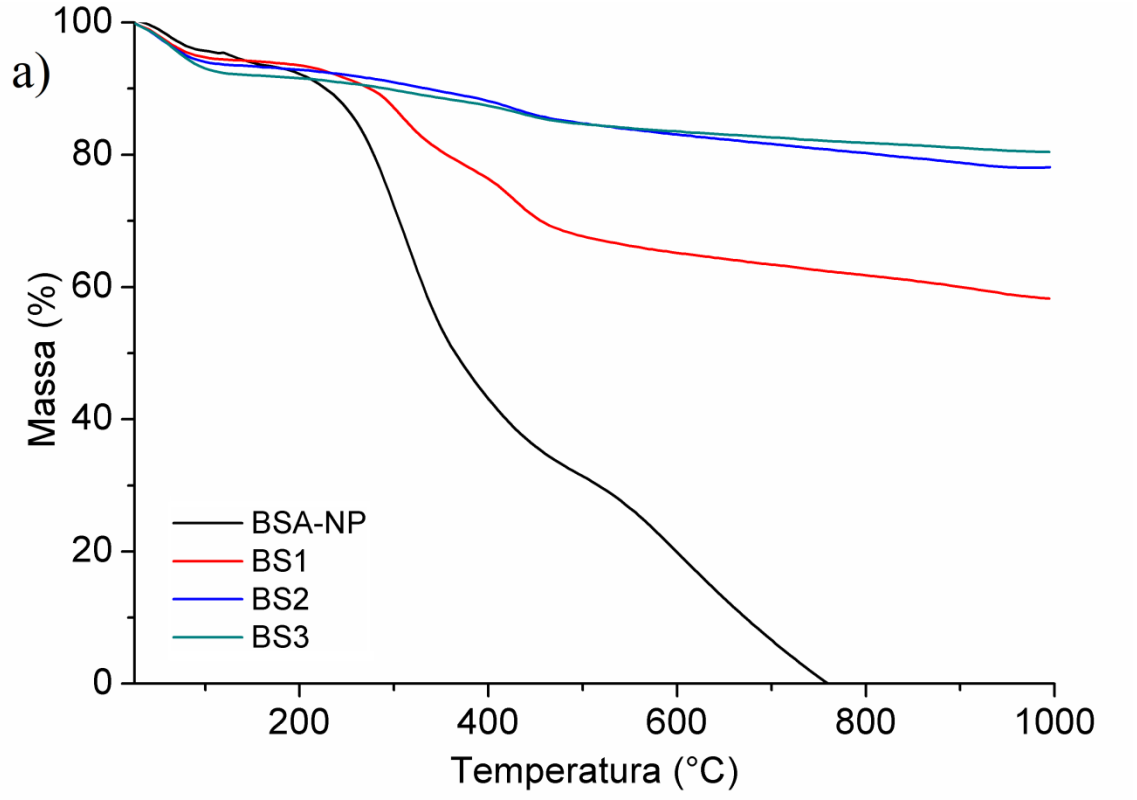
Devido a que o TEOS é a fonte de sílica e a presença de hidróxido de amônio aumenta a taxa das reações de hidrólise e de condensação, o aumento da concentração de hidróxido de amônio ou de TEOS deveria aumentar a quantidade de sílica gerada. Assim mais sílica estaria disponível para ser incorporada nas nanopartículas de albumina resultando em nanopartículas híbridas BS com maior conteúdo de sílica. Os

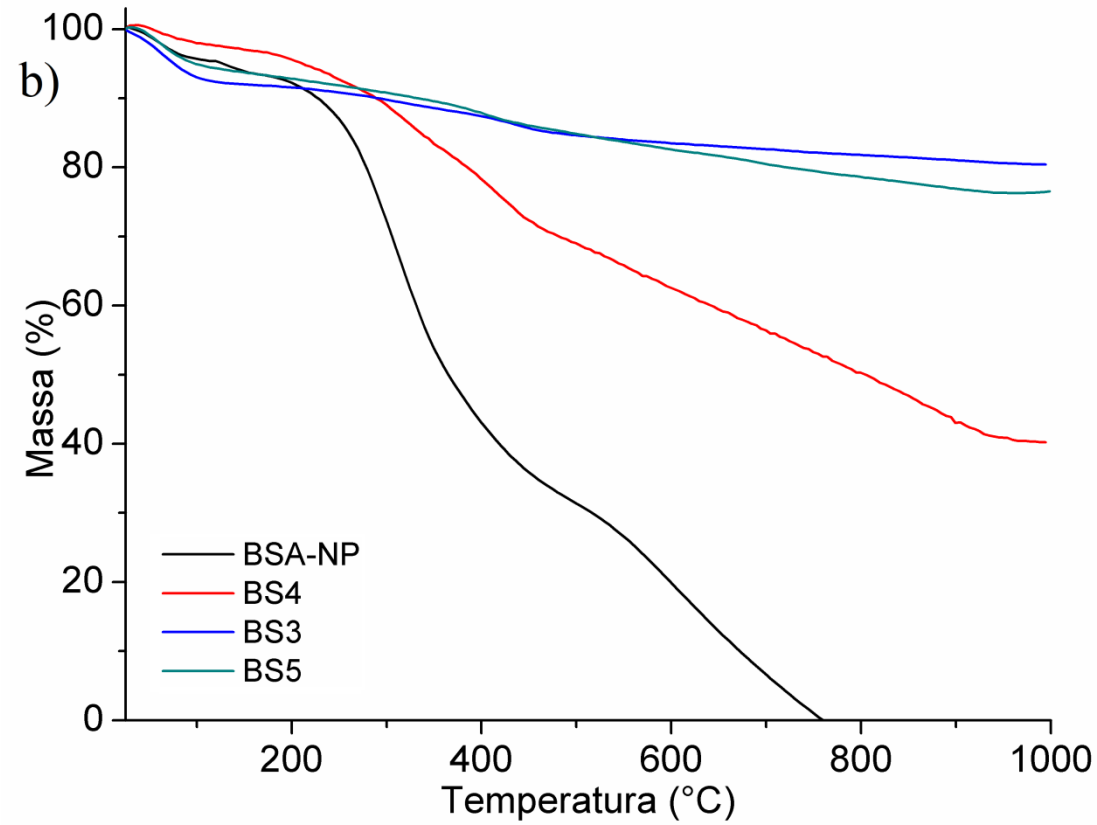
resultados apresentados na Tabela 5 revelam um aumento no conteúdo de sílica nas nanopartículas BS quando a quantidade de TEOS foi aumentada na síntese das nanopartículas, o qual era esperado como foi discutido anteriormente. Uma tendência similar era esperada para a influência da concentração de hidróxido de amônio no conteúdo de sílica em nanopartículas preparadas com a mesma concentração inicial de TEOS. A amostra BS3 tem maior conteúdo de sílica do que a amostra BS4, o que concorda com a suposição anterior que sugere um aumento no conteúdo de sílica quando a concentração de hidróxido de amônio aumenta. Embora a quantidade de hidróxido de amônio adicionada às BSA-NP foi maior em BS5 do que em BS3 (Tabela 4), o conteúdo de sílica em BS5 foi menor do que em BS3 (Tabela 5). Apesar de que a sílica seja um material quimicamente estável em soluções com baixo pH e em soluções neutras, sua solubilidade em soluções alcalinas aumenta com o aumento do pH [116, 129, 130]. As nanopartículas BS3 e BS5 foram preparadas com a mesma quantidade de TEOS, ou seja, a quantidade de sílica gerada para ser incorporada nas nanopartículas seria igual se as condições de síntese fossem semelhantes. Não obstante, a quantidade de hidróxido de amônio utilizado na síntese de BS5 foi maior do que em BS3 (Tabela 4), então o pH final da solução foi maior em BS5 do que em BS3. Provavelmente, o maior pH na suspensão BS5 em comparação com a suspensão BS3 favoreceu a dissolução de parte da sílica gerada, diminuindo a quantidade de sílica que foi incorporada nas BSA-NP. Isto explica porque apesar de que BS3 e BS5 foram preparadas com a mesma quantidade de TEOS, houve uma diferença na quantidade de sílica incorporada nas nanopartículas.

Tabela 5. Características das nanopartículas de albumina (BSA-NP) e das nanopartículas híbridas (BS): tamanho médio, ponto isoelétrico e conteúdo de sílica.

Amostra	Tamanho médio/ nm	Ponto isoeléctrico (PIE)	Conteúdo de sílica/ %
BSA-NP	84±10	5,0	0
BS1	134±23	4,2	58,2
BS2	213±15	4,0	78,0
BS3	219±14	3,8	80,5
BS4	90±13	4,7	40,0
BS5	251±14	2,0	76,8

Figura 32. Curvas termogravimétricas (TGA): a) Amostras preparadas variando a concentração de TEOS: BS1, BS2, BS3 e BSA-NP. b) Amostras preparadas variando a concentração de hidróxido de amônio: BS4, BS3, BS5 e BSA-NP.





Elaborado pelo autor.

4.1.3. Medidas de potencial zeta

As medidas de potencial zeta das nanopartículas BSA-NP, BS1, BS2, BS3, BS4 e BS5 em função do pH estão na Figura 33. A curva do potencial zeta depende das características físico-químicas da superfície das nanopartículas, o que fornece informação sobre as espécies químicas na superfície das nanopartículas. Todas as amostras exibem o perfil típico da curva do potencial zeta. No entanto, o ponto isoelétrico (PIE, pH no qual o potencial zeta é zero) é diferente para cada amostra. Os valores do PIE estão listados na Tabela 5. O PIE da BSA-NP é 5,0 o que concorda com o valor reportado em artigos científicos prévios [125, 131].

Nanopartículas com estrutura caroço-casca nos quais a casca está formada exclusivamente por sílica apresentam uma curva de potencial zeta similar à curva de nanopartículas de sílica e um PIE em torno de 2,0 [89, 90]. Este resultado foi observado nos agregados de SPION com sílica na superfície mencionado no capítulo anterior (Si-MN). O PIE das nanopartículas BS1, BS2, BS3 e BS4 é menor do que o PIE de BSA-NP e maior do que o PIE da sílica, portanto parece razoável pressupor que estas nanopartículas não apresentam uma casca exclusiva de sílica na superfície senão que sílica e BSA estão presentes na superfície destas nanopartículas e a proporção desses materiais determina o PIE de cada amostra [132, 133].

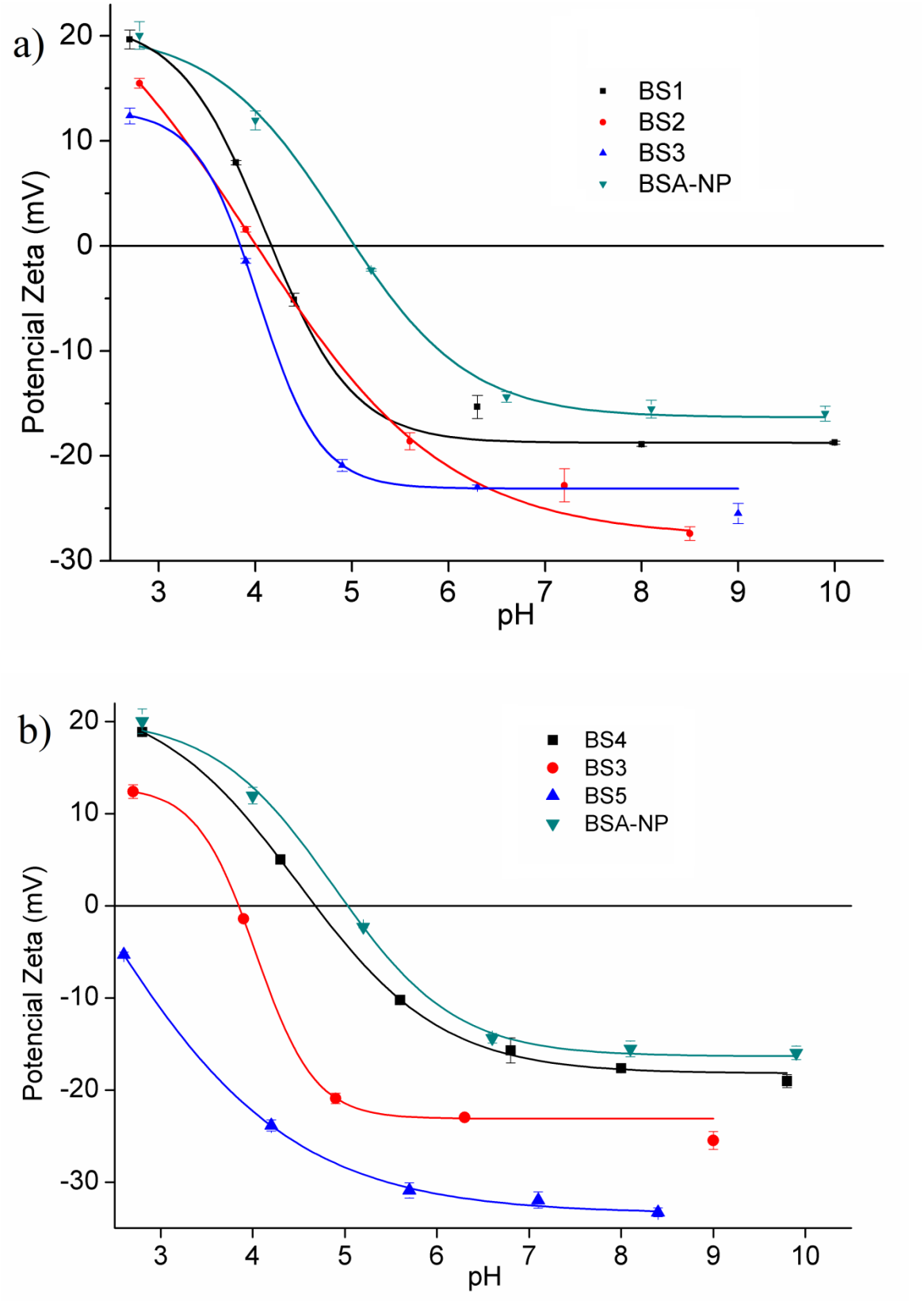
A curva de potencial zeta das nanopartículas BS4 é semelhante à curva de potencial zeta das nanopartículas BSA-NP, também seus PIE são ligeiramente similares. Estes resultados sugerem que a superfície das nanopartículas BS4 é composta maioritariamente por BSA. Embora o teor de sílica na superfície da nanopartículas BS4 seja baixo, os resultados da análise termogravimétrica (Tabela 5) sugerem que as nanopartículas BS4 são formadas por 40% de sílica, então a sílica encontra-se distribuída também no interior da nanopartícula.

A curva de potencial zeta da amostra BS5 é similar à curva de potencial zeta de nanopartículas de sílica. Embora os valores do potencial zeta medido da amostra BS5 são menores do que 0 mV, o PIE das nanopartículas foi estimado em aproximadamente 2,0, o qual é o mesmo valor do PIE da sílica. O PIE de BS5 sugere uma alta concentração de sílica na superfície das nanopartículas, portanto é possível que BS5 seja a única amostra que apresenta uma casca composta quase exclusivamente de sílica na superfície das nanopartículas.

Um aumento na concentração de hidróxido de amônio ou de TEOS, durante a síntese das nanopartículas BS, resulta na redução do PIE das nanopartículas BS, a qual indicaria um aumento no teor de sílica na superfície das nanopartículas BS. Este efeito está de acordo com a explicação anterior da influencia da concentração de hidróxido de amônio e de TEOS no conteúdo de sílica nas nanopartículas BS.

Estes resultados indicam que o PIE das nanopartículas BS pode ser finamente ajustado entre 5 e 2 controlando-se adequadamente a concentração dos reagentes durante a síntese.

Figura 33. Potencial zeta em função do pH: a) Amostras preparadas variando a concentração de TEOS: BS1, BS2, BS3 e BSA-NP. b) Amostras preparadas variando a concentração de hidróxido de amônio: BS4, BS3, BS5 e BSA-NP.



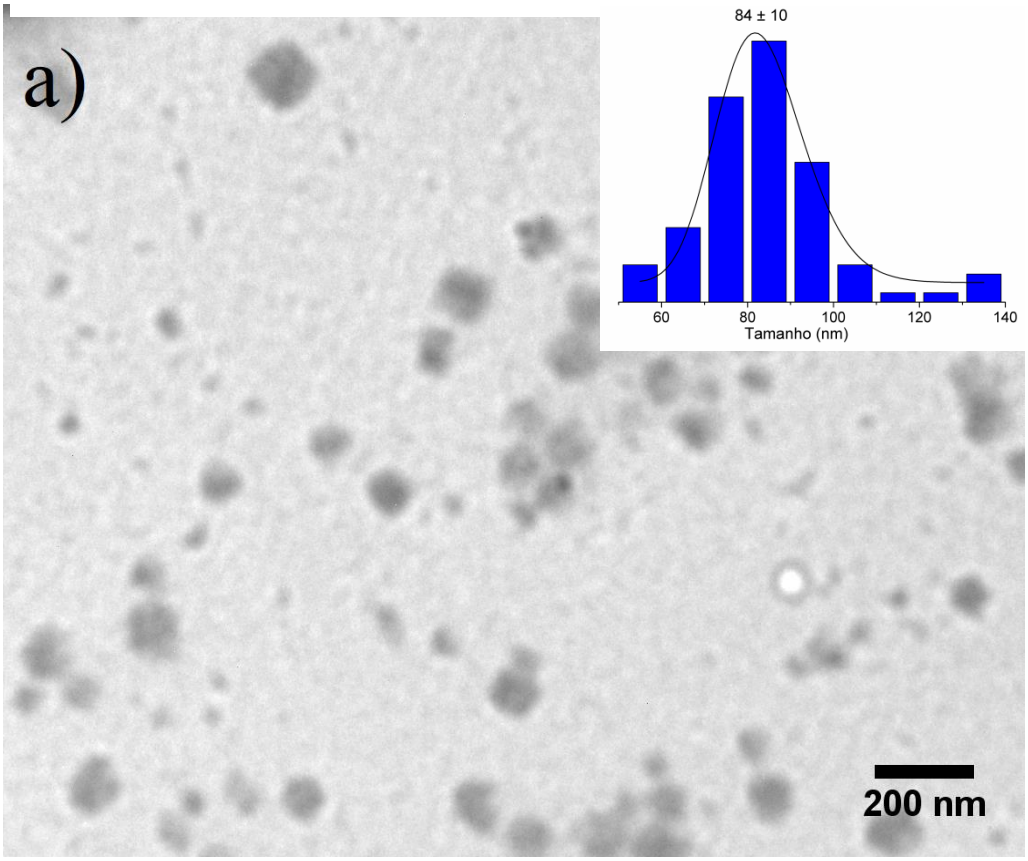
Elaborado pelo autor.

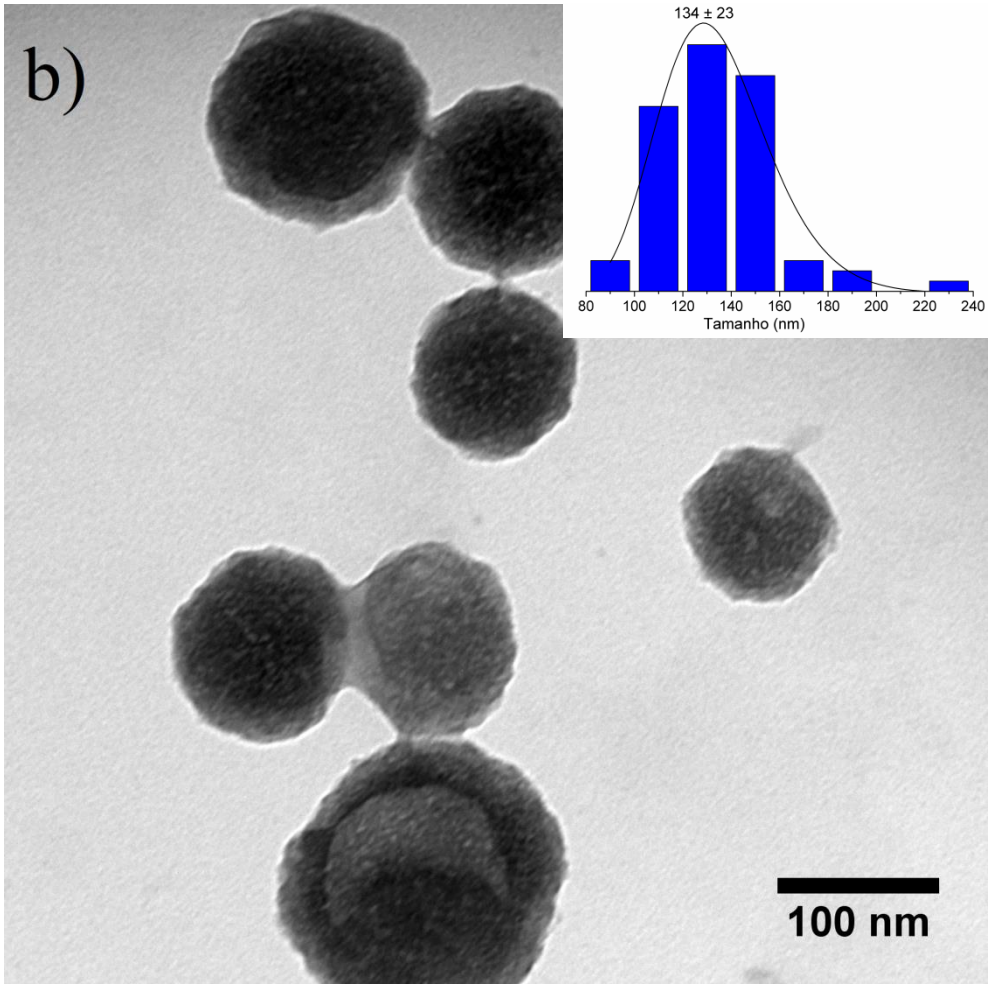
4.1.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As imagens TEM das nanopartículas BSA-NP, BS1, BS2, BS3, BS4 e BS5 são mostradas nas Figuras 34; 35 e 36. As imagens TEM das nanopartículas BS confirmam a presença de nanopartículas com tamanhos e formas similares e com uma superfície aparentemente rugosa. O tamanho médio e o desvio padrão das nanopartículas são apresentados na Tabela 5, estes resultados mostram que as nanopartículas têm uma distribuição de tamanhos monodispersa.

As nanopartículas de BSA (BSA-NP) foram preparadas pelo método de nanoprecipitação. Quando o etanol foi adicionado à solução aquosa de BSA, a solubilidade da BSA em água diminuiu e as moléculas precipitaram formando aglomerados de BSA os quais foram reticulados com glutaraldeído e obteve-se as BSA-NP. As nanopartículas híbridas BSA-sílica (BS) foram obtidas através do método de deposição em molde. As nanopartículas BSA-NP foram utilizadas como moldes para a precipitação de sílica na rede polimérica das nanopartículas. A sílica foi produzida a partir do TEOS seguindo o método sol-gel. O TEOS não é solúvel em agua, portanto é necessário primeiro dissolver este reagente em etanol para posteriormente ser adicionado à suspensão de BSA-NP. Na suspensão aquosa aconteceu a hidrólise de TEOS produzindo grupos silanóis (Equação 4), em seguida, a condensação dos silanóis (Equação 5) gerou os primeiros oligômeros de sílica e depois os núcleos primários de sílica. As nanopartículas de BSA apresentam uma estrutura similar aos nanohidrogéis, pois estão formadas por moléculas de BSA reticuladas com gluteraldeído e a BSA apresenta uma alta afinidade pela água. Portanto, estas nanopartículas armazenam água no seu interior quando são suspensas em água. A formação das nanopartículas híbridas começa quando os precursores de sílica conseguem penetrar nas BSA-NP, depois o crescimento da sílica acontecem no interior das nanopartículas de BSA [123]. Trabalhos anteriores sugerem que a BSA fornece um ambiente que induz a nucleação da sílica e o crescimento da rede inorgânica, atribuído aos grupos funcionais da BSA que poderiam se associar com a sílica através de ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas [134]. Porém, para assegurar a incorporação de sílica nas BSA-NP, utilizou-se a PVP na síntese das nanopartículas híbridas para atuar como agente de acoplamento, direcionando a deposição de sílica nas BSA-NP. Durante o crescimento da matriz de sílica, a BSA é aprisionada na estrutura de sílica, produzindo a interpenetração da rede inorgânica (sílica) e orgânica (BSA).

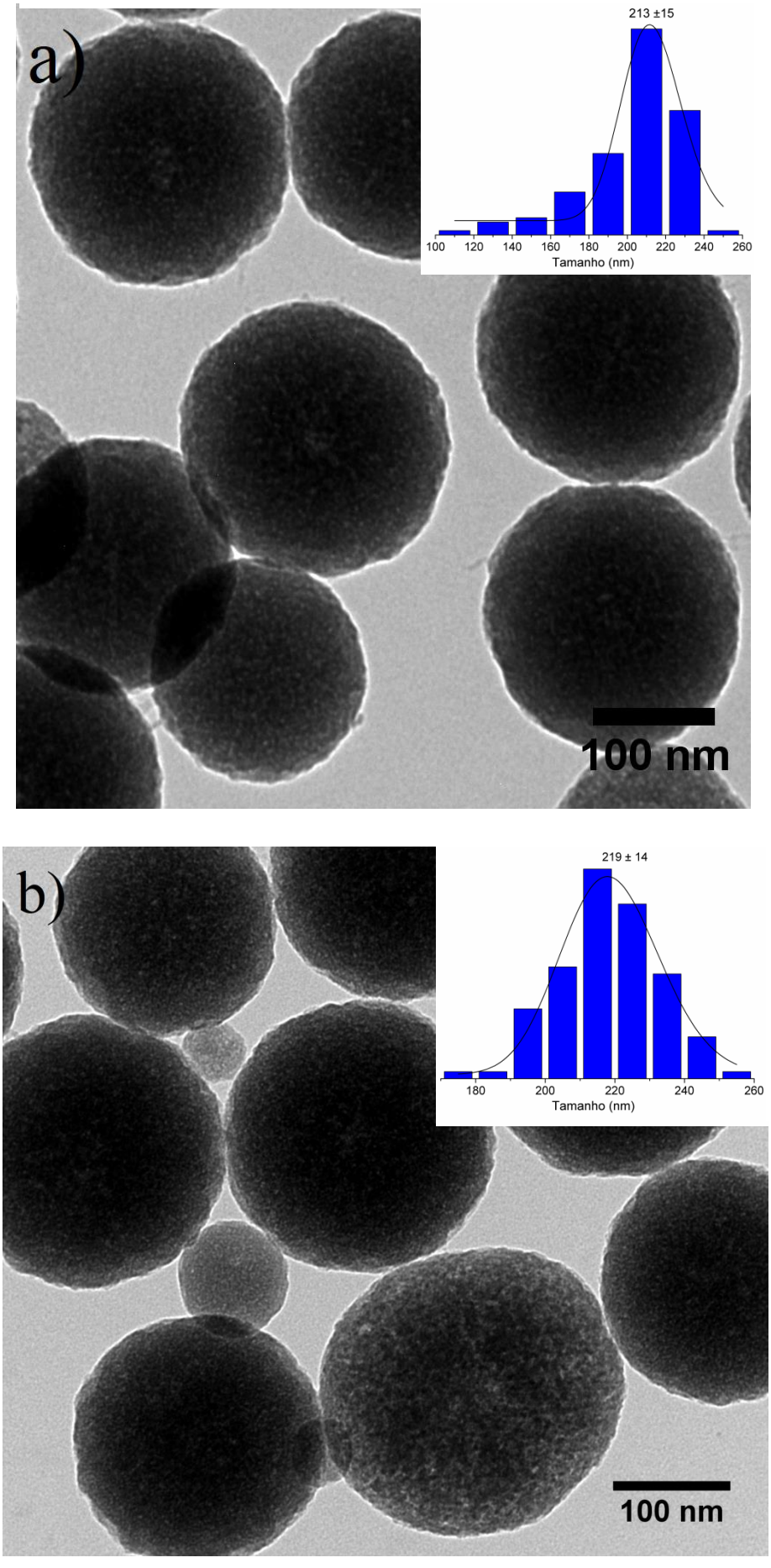
Figura 34. Imagens TEM e distribuição de tamanhos das nanopartículas: a) BSA-NP e b) BS1.





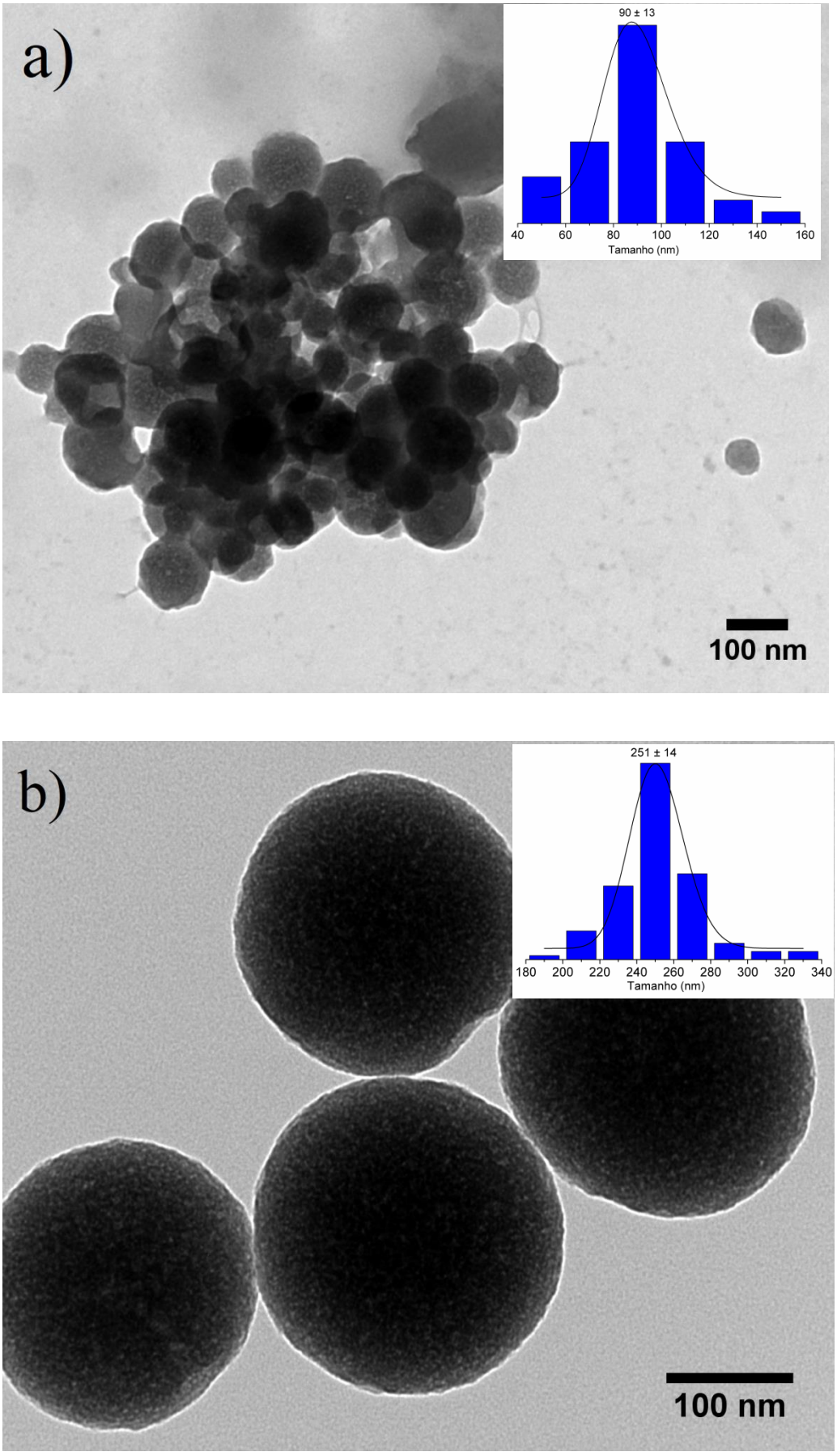
Elaborado pelo autor.

Figura 35. Imagens TEM e distribuição de tamanhos das nanopartículas: a) BS2 e b) BS3.



Elaborado pelo autor.

Figura 36. Imagens TEM e distribuição de tamanhos das nanopartículas: a) BS4 e b) BS5.



Elaborado pelo autor.

A morfologia das nanopartículas BSA-NP é ligeiramente irregular (Figura 34.a). Uma morfologia similar, porém mais próxima de esferas é observada nas amostras BS1 (Figura 34.b) e BS4 (Figura 36.a), enquanto as nanopartículas BS2 (Figura 35.a), BS3 (Figura 35.b) e BS5 (Figura 36.b) são aproximadamente esféricas. Estas diferenças são devidas provavelmente à quantidade de sílica nas nanopartículas BS. As nanopartículas BSA-NP armazenam água no seu interior quando estão em suspensão aquosa, e o volume e a forma dependem da quantidade de água armazenada. Durante o processo de secagem, as nanopartículas BSA-NP perdem água diminuindo de volume e produzindo nanopartículas secas com formas ligeiramente diferentes. A sílica nas nanopartículas BS resulta em uma matriz inorgânica que confere rigidez às nanopartículas. A perda de moléculas de água durante a secagem não altera a forma da matriz inorgânica e mantem quase a mesma forma quando estão em suspensão ou secas. Portanto, as nanopartículas BS são menos alteradas pelo encolhimento durante o processo de secagem do que as nanopartículas BSA-NP [132]. Este efeito depende da quantidade de sílica nas nanopartículas. As nanopartículas com menor quantidade de sílica, tais como BS1 e BS4 (Tabela 5) são um pouco modificadas pelo processo de secagem. Tais nanopartículas aparecem nas imagens TEM como esferas levemente irregulares. Enquanto que as nanopartículas BS2, BS3 e BS5, compostas por mais de 75% de sílica, não são afetadas pelo processo de secagem e mantem uma forma esférica ainda depois da secagem.

Nas imagens TEM das amostras BS1, BS2, BS3 e BS5, as nanopartículas aparentemente possuem uma estrutura caroço-casca. Exibem uma área circular interna escura e ao redor uma área um pouco mais clara. Embora as diferenças de tonalidades sejam limitadas, sugere-se a existência de duas fases com distinta densidade, sendo a fase interna a de maior densidade. Nanopartículas híbridas com caroço de material orgânico e casca de sílica reportadas em artigos científicos também apresentam micrografias TEM com um caroço mais escuro [120, 132]. Provavelmente este efeito é produzido pelas diferenças no grau de reticulação nas BSA-NP, sendo a parte interior a que tem maior grau de reticulação [132]. Segundo os resultados das análises de potencial zeta, a superfície das nanopartículas BS1, BS2 e BS3 é composta por uma mistura de sílica e BSA, a qual forma a casca exibida nas microscopias TEM. De outro modo, os resultados de potencial zeta indicaram uma superfície formada quase exclusivamente por sílica nas nanopartículas BS5, provavelmente essa fase é observada

como casca nas micrografias TEM das nanopartículas BS5. A imagem TEM das nanopartículas BS4 não evidencia a presença de uma casca definida, ou seja a sílica está distribuída dentro das nanopartículas de forma mais homogênea do que nas outras nanopartículas BS, uma atribuição similar foi sugerida na analise da curva de potencial zeta desta amostra.

As concentrações de TEOS e de hidróxido de amônio na síntese das nanopartículas híbridas BS influenciam significativamente no tamanho médio das nanopartículas. Um aumento na concentração de TEOS ou de hidróxido de amônio (na faixa de trabalho) produziu nanopartículas maiores. Essa tendência também foi observada em artigos científicos relacionados à síntese de nanopartículas de sílica [115, 135]. Como foi discutido anteriormente, um aumento na concentração de TEOS ou de hidróxido de amônio gera uma maior quantidade de sílica que pode ser incorporada nas nanopartículas BSA-NP, consequentemente o tamanho das nanopartículas híbridas BS deveria aumentar. Esta relação foi confirmada pelos resultados TGA nas amostras BS1, BS2, BS3 e BS4. Ou seja o crescimento das nanopartículas dependeu da quantidade de sílica disponível para ser incorporada nas nanopartículas BSA-NP. Embora o tamanho médio das nanopartículas BS5 é maior que o tamanho médio das outras nanopartículas BS, as nanopartículas BS5 não possuem o maior conteúdo de sílica entre as nanopartículas BS (Tabela 5). Possivelmente, nas nanopartículas BS5, a rede de sílica não penetrou tão profundamente no interior das nanopartículas BSA-NP quanto nas outras nanopartículas BS, tendo assim mais sílica para ser incorporada na superfície e permitindo o crescimento de uma casca de sílica como foi indicado pelos resultados de potencial zeta. A distribuição heterogênea da sílica nas nanopartículas BS5 contrasta com a distribuição da sílica nas nanopartículas BS4, onde aparentemente a distribuição é mais homogênea. Assim, as condições de síntese influenciam também a distribuição da sílica no interior das nanopartículas, no entanto, não está claro o motivo da diferente distribuição de sílica, um estudo mais extenso é necessário para elucidar o fenômeno.

O tamanho médio das nanopartículas BS4 é ligeiramente maior do que o tamanho médio das nanopartículas BSA-NP, isto apesar que BS4 contem 40% de sílica e BSA-NP não contem sílica. Por outro lado, também não existe diferença significativa entre os tamanhos médios de BS2 e BS3.

5. Conclusões

Neste capítulo, nanopartículas híbridas de BSA-sílica foram sintetizadas via a deposição de sílica em nanopartículas de BSA. A sílica foi depositada nas nanopartículas de BSA através do processo sol-gel. Verificou-se que o método utilizado é capaz de produzir nanopartículas monodispersas. A influencia da concentração de hidróxido de amônio e de TEOS nas propriedades das nanopartículas foi investigada. Os resultados sugerem que o tamanho das partículas, o ponto isoelétrico e o conteúdo de sílica das nanopartículas dependem da concentração de TEOS e hidróxido de amônio usado na síntese.

6. Sugestões para trabalhos futuros

As conclusões deste capítulo baseiam-se na investigação da deposição de sílica sobre as nanopartículas de BSA. Com base nos resultados as perspectivas de continuidade do trabalho direcionam para a necessidade de avaliar outros parâmetros de síntese considerados relevantes para a produção de nanopartículas BS, tais como o grau de reticulação das nanopartículas de BSA, o tamanho das nanopartículas de BSA e a temperatura. As modificações induzidas nas nanopartículas BSA, consideradas como moldes para a deposição de sílica, devido às mudanças dos parâmetros mencionados influenciam na facilidade para incorporar sílica no interior das nanopartículas BSA, qual seja uma alteração em sua natureza para atuar como molde mole ou molde duro.

Como foi mencionado anteriormente, a albumina é uma proteína transportadora de biomoléculas, portanto, é esperado que as nanopartículas BS devidamente modificadas e funcionalizadas atuem como sistemas de liberação controlada para biomoléculas e fármacos, com perspectivas de congregarem a biocompatibilidade e a biodisponibilidade. Assim um projeto relevante para continuar o trabalho consiste em avaliar a capacidade de carga e a liberação de fármacos pelas nanopartículas híbridas BS.

A adsorção de ácidos nucleicos na superfície da sílica é utilizada como método de separação deste tipo de moléculas. Portanto, considere-se também a perspectiva de investigar a adsorção de ácidos nucleicos na superfície das nanopartículas híbridas devido à presença de sílica e à influência do ponto isoelétrico da superfície na capacidade de adsorção de ácidos nucleicos.

Conclusão Geral da Tese

Biomateriais poliméricos e nanoestruturados foram obtidos tais como descritos nos capítulos desta tese.

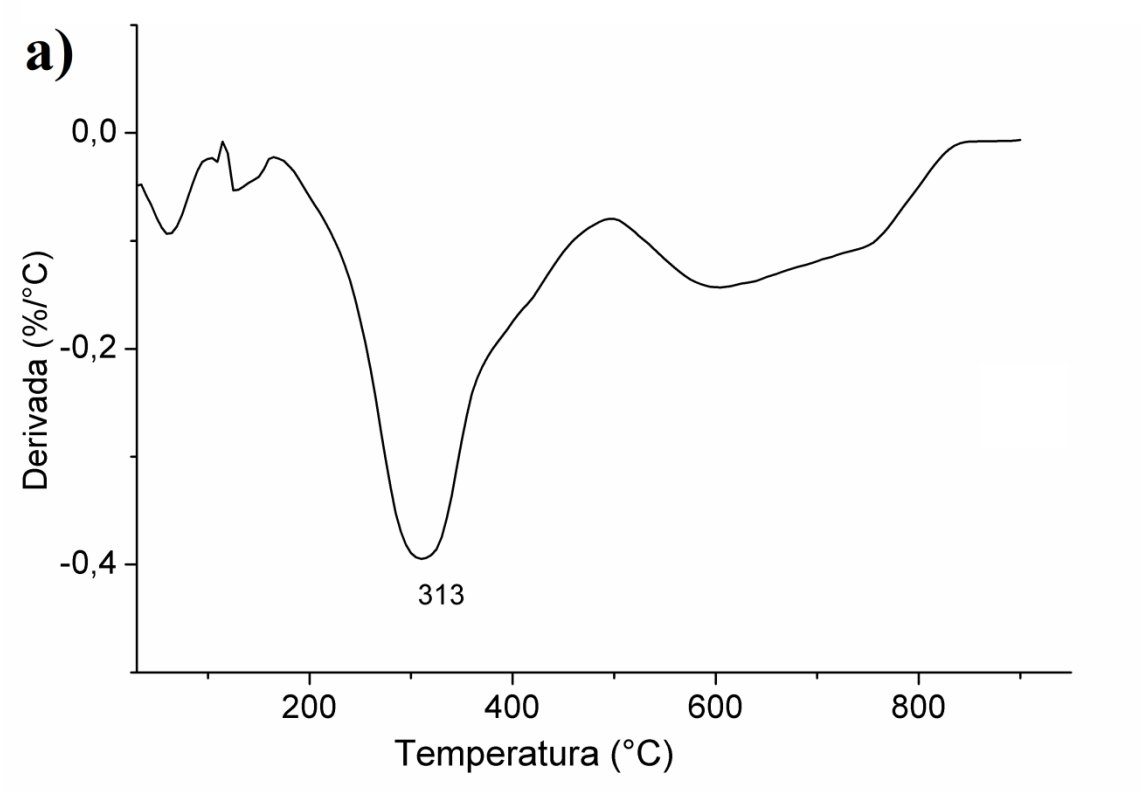
Poliaspartaminas são indicadas como candidatas à substituição de PNIPAAm devido à similaridade entre as estruturas moleculares e também devido a sua propriedade de responder à mudanças de temperatura e pH.

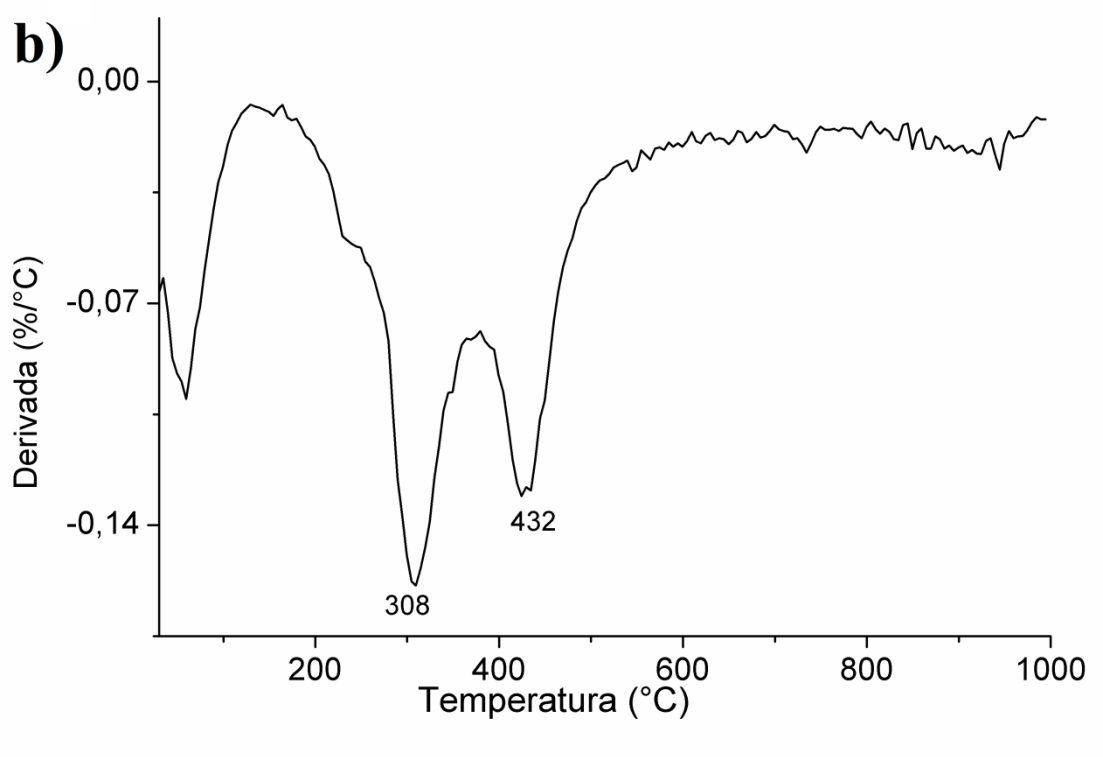
Partículas homogêneas foram formadas por agregados de nanopartículas de óxidos de ferro recobertos por uma casca de sílica. As partículas são sugeridas para atuar como adsorventes no processo de separação magnética de ácidos nucleicos.

Nanopartículas híbridas de albumina e sílica foram preparadas e caracterizadas quanto ao tamanho, carga de superfície (potencial zeta) e conteúdo de sílica para investigar o potencial como um sistema de liberação controlada de fármacos.

Anexo 1

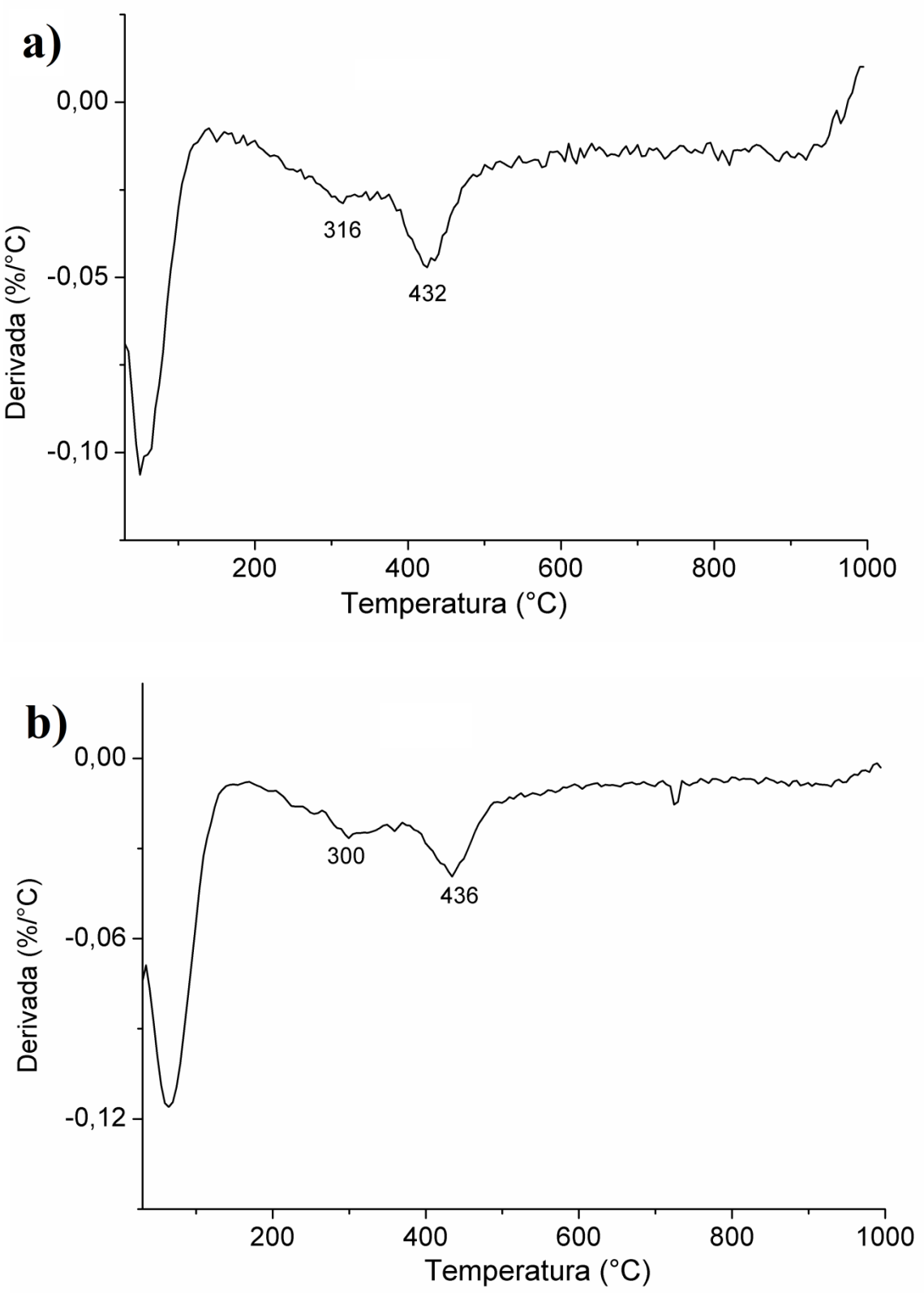
Figura 37. Derivadas dos gráficos TGA: a) BSA-NP e b) BS1.





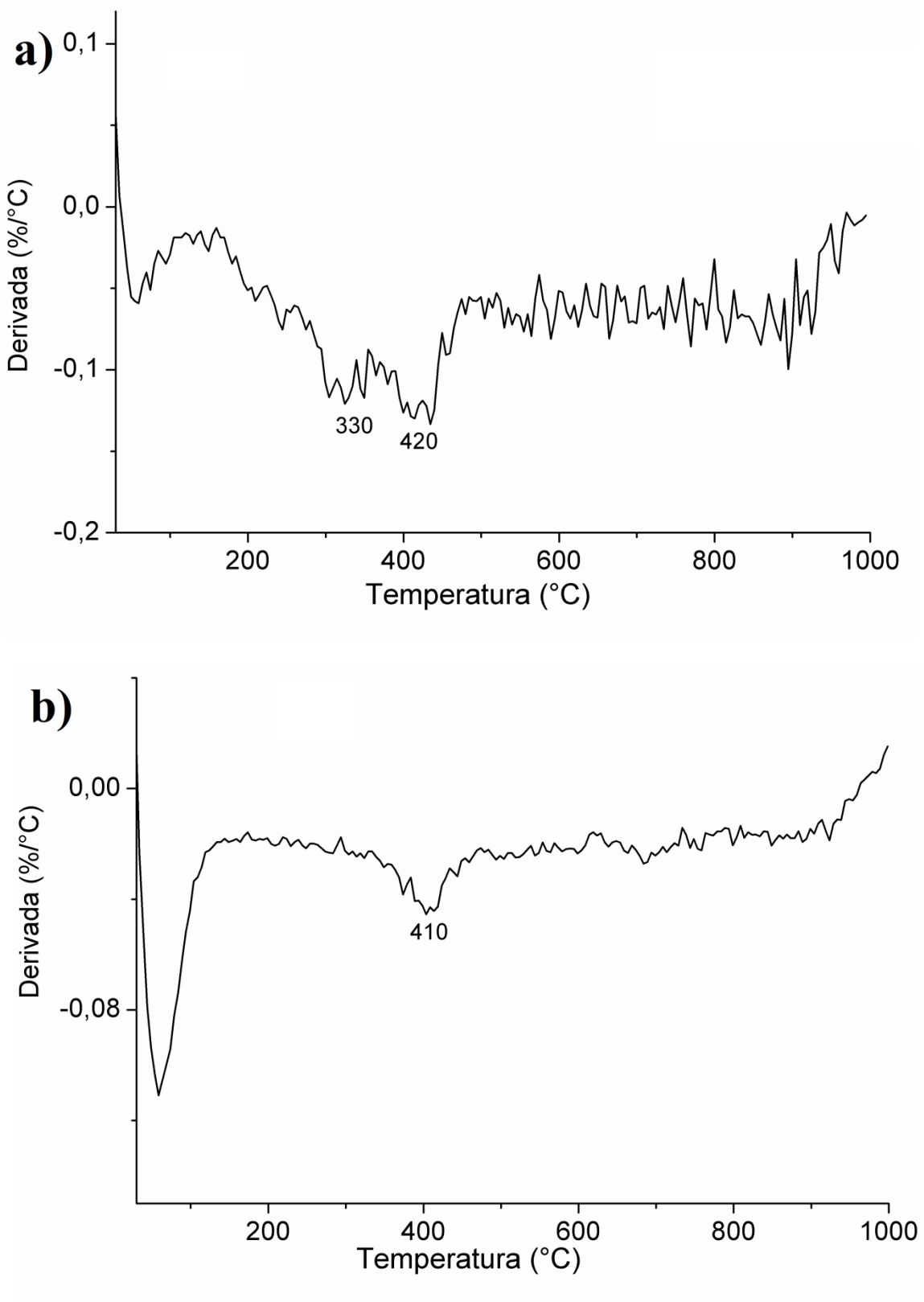
Elaborado pelo autor.

Figura 38. Derivadas dos gráficos TGA: a) BS2 e b) BS3.



Elaborado pelo autor.

Figura 39. Derivadas dos gráficos TGA: a) BS4 e b) BS5.



Elaborado pelo autor.

Referências

1. Cabane E, Zhang X, Langowska K, et al (2012) Stimuli-responsive polymers and their applications in nanomedicine. Biointerphases 7:1–27 . doi: 10.1007/s13758-011-0009-3

2. Cheng R, Meng F, Deng C, et al (2013) Dual and multi-stimuli responsive polymeric nanoparticles for programmed site-specific drug delivery. Biomaterials 34:3647–3657 . doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.084

3. Crucho CIC (2015) Stimuli-responsive polymeric nanoparticles for nanomedicine. ChemMedChem 10:24–38 . doi: 10.1002/cmdc.201402290

4. Liu M, Du H, Zhang W, Zhai G (2017) Internal stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery: Design strategies and applications. Mater Sci Eng C 71:1267–1280 . doi: 10.1016/j.msec.2016.11.030

5. Li Y, Gao J, Zhang C, et al (2017) Stimuli-Responsive Polymeric Nanocarriers for Efficient Gene Delivery. Top Curr Chem 375:27 . doi: 10.1007/s41061-017-0119-6

6. Chan A, Orme RP, Fricker RA, Roach P (2013) Remote and local control of stimuli responsive materials for therapeutic applications. Adv Drug Deliv Rev 65:497–514 . doi: 10.1016/j.addr.2012.07.007

7. Gandhi A, Paul A, Sen SO, Sen KK (2015) Studies on thermoresponsive polymers: Phase behaviour, drug delivery and biomedical applications. Asian J Pharm Sci 10:99–107 . doi: 10.1016/j.ajps.2014.08.010

8. Kim YJ, Matsunaga YT (2017) Thermo-responsive polymers and their application as smart biomaterials. J Mater Chem B 5:4307–4321 . doi: 10.1039/c7tb00157f

9. Karimi M, Sahandi Zangabad P, Ghasemi A, et al (2016) Temperature-Responsive Smart Nanocarriers for Delivery of Therapeutic Agents: Applications and Recent Advances. ACS Appl Mater Interfaces 8:21107–21133 . doi: 10.1021/acsami.6b00371

10. Nair LS, Laurencin CT (2007) Biodegradable polymers as biomaterials. Prog Polym Sci 32:762–798 . doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017

11. Naahidi S, Jafari M, Edalat F, et al (2013) Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. J Control Release 166:182–194 . doi: 10.1016/j.jconrel.2012.12.013

12. Jalalvandi E, Shavandi A (2018) Polysuccinimide and Its Derivatives: Degradable and Water Soluble Polymers (Review). Eur Polym J 109:43–54 . doi: 10.1016/j.eurpolymj.2018.08.056

13. Chiriac AP, Nita LE, Neamtu I (2010) Poly(ethylene glycol) functionalized by polycondensing procedure with poly(succinimide). Polymery 55:641–645

14. Gyenes T, Torma V, Zrínyi M (2008) Swelling properties of aspartic acid-based hydrogels. Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp 319:154–158 . doi: 10.1016/j.colsurfa.2007.06.016

15. Gyenes T, Torma V, Gyarmati B, Zrínyi M (2008) Synthesis and swelling properties of novel pH-sensitive poly(aspartic acid) gels. Acta Biomater 4:733–744 . doi: 10.1016/j.actbio.2007.12.004

16. Gu X, Wang J, Liu X, et al (2013) Temperature-responsive drug delivery systems based on polyaspartamides with isopropylamine pendant groups. Soft Matter 9:7267–7273 . doi: 10.1039/c3sm50904d

17. Oh NM, Oh KT, Youn YS, et al (2013) Poly(L-aspartic acid) nanogels for lysosome-selective antitumor drug delivery. Colloids Surf B Biointerfaces 101:298–306 . doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.07.013

18. Park CW, Yang HM, Woo MA, et al (2017) Completely disintegrable redox-responsive poly(amino acid) nanogels for intracellular drug delivery. J Ind Eng Chem 45:182–188 . doi: 10.1016/j.jiec.2016.09.021

19. Sharma A, Srivastava A (2013) Pronounced influence of pH, metal-ion and solvent isotope on the thermoresponse of synthetic amphiphilic polypeptides. Polym Chem 4:5119 . doi: 10.1039/c3py00741c

20. Tanimoto F, Kitamura Y, Ono T, Yoshizawa H (2010) A versatile biodegradable polymer with a thermo-reversible/irreversible transition. ACS Appl Mater Interfaces 2:606–610 . doi: 10.1021/am900705s

21. Medeiros SF, Santos AM, Fessi H, Elaissari A (2011) Stimuli-responsive magnetic particles for biomedical applications. Int J Pharm 403:139–161 . doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.10.011

22. Hoagland PD, Fox SW (1973) The Hydrolysis of polyimides. Experientia 29:962–964

23. Yeh J-C, Yang H-H, Hsu Y-T, et al (2013) Synthesis and characteristics of biodegradable and temperature responsive polymeric micelles based on poly(aspartic acid)-g-poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N-dimethylacrylamide). Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp 421:1–8 . doi: 10.1016/j.colsurfa.2012.12.014

24. Song Z, Wang K, Gao C, et al (2016) A New Thermo-,pH-, and CO2-Responsive Homopolymer of Poly[N-[2-(diethylamino)ethyl]acrylamide]: Is the Diethylamino Group Underestimated? Macromolecules 49:162–171

25. Nakato T, Yoshitake M, Matsubara K, Tomida M (1998) Relationships between Structure and Properties of Poly(aspartic acid)s. Macromolecules 31:2107–2113

26. Nakato T, Kusuno A, Kakuchi T (2000) Synthesis of Poly(succinimide) by Bulk Polycondensation of L -Aspartic Acid with an Acid Catalyst. J Polym Sci Part A Polym Chem 38:117–122

27. Wang X, Wu G, Lu C, et al (2012) A novel delivery system of doxorubicin with high load and pH-responsive release from the nanoparticles of poly (α,β-aspartic

acid) derivative. Eur J Pharm Sci 47:256–264 . doi: 10.1016/j.ejps.2012.04.007

28. Furyk S, Zhang Y, Ortiz-Acosta D, et al (2006) Effects of end group polarity and molecular weight on the lower critical solution temperature of poly(N-isopropylacrylamide). J Polym Sci Part A Polym Chem 44:1492–1501 . doi: 10.1002/pola.21256

29. Pistorius AM, Groenen PJ, Grip WJ De (1993) Infrared analysis of peptide succinimide derivatives. Int J Pept protein Res 42:570–577

30. Molnar K, Juriga D, Nagy PM, et al (2014) Electrospun poly(aspartic acid) gel scaffolds for artificial extracellular matrix. Polym Int 63:1608–1615 . doi: 10.1002/pi.4720

31. Yang D, Zhang X, Yuan L, Hu J (2009) PEG-g-poly(aspartamide-co-N,N-dimethylethylenediamino aspartamide): Synthesis, characterization and its application as a drug delivery system. Prog Nat Sci 19:1305–1310 . doi: 10.1016/j.pnsc.2009.02.008

32. Vega-Chacón J, Arbeláez MIA, Jorge JH, et al (2017) pH-responsive poly(aspartic acid) hydrogel-coated magnetite nanoparticles for biomedical applications. Mater Sci Eng C 77:366–373 . doi: 10.1016/j.msec.2017.03.244

33. Barth A, Zscherp C (2002) What vibrations tell about proteins. Q Rev Biophys 35:369–430 . doi: 10.1017/S0033583502003815

34. Lu C, Li B, Liu N, et al (2014) A hydrazone crosslinked zwitterionic polypeptide nanogel as a platform for controlled drug delivery. RSC Adv 4:50301–50311 . doi: 10.1039/C4RA08871A

35. Hsu S, Chu I (2012) Design of polyanionic nanocarriers based on modified poly (aspartic acid)s for oral administration : synthesis and characterization. doi: 10.1007/s10965-012-9913-6

36. Torma V, Gyenes T, Szakács Z, et al (2007) Novel amino acid-based polymers for pharmaceutical applications. Polym Bull 59:311–318 . doi: 10.1007/s00289-007-0774-9

37. Gottlieb HE, Kotlyar V, Nudelman A (1997) NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. J Org Chem 62:7512–7515 . doi: 10.1021/jo971176v

38. Matsubara K, Nakato T, Tomida M (1997) 1 H and 13 C NMR Characterization of Poly (succinimide) Prepared by Thermal Polycondensation of L -Aspartic Acid 1. Macromolecules 30:2305–2312

39. Gu X, Wang J, Wang Y, et al (2013) Layer-by-layer assembled polyaspartamide nanocapsules for pH-responsive protein delivery. Colloids Surf B Biointerfaces 108:205–211 . doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.03.007

40. Tomida M, Nakato T, Matsunami S, Kakuchi T (1997) Convenient synthesis of high molecular weight poly(succinimide) by acid-catalyses polycondensation of L-aspartic acid. Polymer (Guildf) 38:4733–4736

41. Kang HS, Yang SR, Kim J-D, et al (2001) Effects of Grafted Alkyl Groups on Aggregation Behavior of Amphiphilic Poly(aspartic acid). Langmuir 17:7501–7506 . doi: 10.1021/la0107953

42. Matsubara K, Nakato T, Tomida M (1998) End Group and Irregular Structure Analysis in Thermally Prepared Sodium Polyaspartate by 1 H and 13 C NMR Spectroscopy. Macromolecules 31:1466–1472

43. Zhao Y, Su H, Fang L, Tan T (2005) Superabsorbent hydrogels from poly(aspartic acid) with salt-, temperature- and pH-responsiveness properties. Polymer (Guildf) 46:5368–5376 . doi: 10.1016/j.polymer.2005.04.015

44. Mosig J, Gooding CH, Wheeler AP (1997) Kinetic and Thermal Characterization of the Hydrolysis of Polysuccinimide. Ind Eng Chem Res 36:2163–2170

45. Yoshida T, Lai TC, Kwon GS, Sako K (2013) pH- and ion-sensitive polymers for drug delivery. Expert Opin Drug Deliv 10:1497–1513 . doi: doi:10.1517/17425247.2013.821978.

46. Morishita M, Lowman AM, Takayama K, et al (2002) Elucidation of the mechanism of incorporation of insulin in controlled release systems based on complexation polymers. J Control Release 81:25–32 . doi: 10.1016/S0168-3659(02)00019-6

47. Wang Y, Nie J, Chang B, et al (2013) Poly(vinylcaprolactam)-based biodegradable multiresponsive microgels for drug delivery. Biomacromolecules 14:3034–3046 . doi: 10.1021/bm401131w

48. Chen H, Xu W, Chen T, et al (2005) Aggregation of biodegradable amphiphilic poly(succinimide-co-N-propyl aspartamide) and poly(N-dodecyl aspartamide-co-N-propyl aspartamide) in aqueous medium and its preliminary drug-released properties. Polymer (Guildf) 46:1821–1827 . doi: 10.1016/j.polymer.2004.12.042

49. Jeevanandam J, Barhoum A, Chan YS, et al (2018) Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. Beilstein J Nanotechnol 9:1050–1074 . doi: 10.3762/bjnano.9.98

50. The European Commission (2011) Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU). Off J Eur Union L 275:38–40

51. U S Department of Health and Human Services Administration Food and Drug (2014) Considering Whether an FDA-Regulated Product Involves the Application of Nanotechnology. Guid Ind 1–14

52. Ramanathan Nagarajan TAH Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation and Functionalization

53. Luis M. Liz-Marzán PVK (2003) Nanoscale materials, First. Kluwer Academic Publishers, New York

54. Kaur R, Hasan A, Iqbal N, et al (2014) Synthesis and surface engineering of magnetic nanoparticles for environmental cleanup and pesticide residue analysis: a review. J Sep Sci 37:1805–25 . doi: 10.1002/jssc.201400256

55. Ling D, Hyeon T (2013) Chemical design of biocompatible iron oxide nanoparticles for medical applications. Small 9:1450–1466 . doi: 10.1002/smll.201202111

56. Mahmoudi M, Sant S, Wang B, et al (2011) Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. Adv Drug Deliv Rev 63:24–46 . doi: 10.1016/j.addr.2010.05.006

57. Horák D, Babic M, Macková H, Benes MJ (2007) Preparation and properties of magnetic nano- and microsized particles for biological and environmental separations. J Sep Sci 30:1751–72 . doi: 10.1002/jssc.200700088

58. Gupta AK, Gupta M (2005) Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials 26:3995–4021 . doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.012

59. Lu A-H, Salabas EL, Schüth F (2007) Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. Angew Chem Int Ed Engl 46:1222–1244 . doi: 10.1002/anie.200602866

60. Hola K, Markova Z, Zoppellaro G, et al (2015) Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI , drug delivery , magnetic separation and immobilization of biosubstances. Biotechnol Adv 33:1162–1176 . doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.02.003

61. Ling D, Lee N, Hyeon T (2015) Chemical synthesis and assembly of uniformly sized iron oxide nanoparticles for medical applications. Acc Chem Res 48:1276–1285 . doi: 10.1021/acs.accounts.5b00038

62. Laurent S, Saei AA, Behzadi S, et al (2014) Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for delivery of therapeutic agents: opportunities and challenges. Expert Opin Drug Deliv 11:1449–1470 . doi: 10.1517/17425247.2014.924501

63. Verma J, Lal S, Noorden CJ Van (2014) Nanoparticles for hyperthermic therapy : synthesis strategies and applications in glioblastoma. Int J Nanomedicine 10:2863–2877

64. Laurent S, Dutz S, Häfeli UO, Mahmoudi M (2011) Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. Adv Colloid Interface Sci 166:8–23 . doi: 10.1016/j.cis.2011.04.003

65. Kumar CSSR, Mohammad F (2011) Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. Adv Drug Deliv Rev 63:789–808 . doi: 10.1016/j.addr.2011.03.008

66. Frazier N, Ghandehari H (2015) Hyperthermia approaches for enhanced delivery of nanomedicines to solid tumors. Biotechnol Bioeng 112:1967–83 . doi: 10.1002/bit.25653

67. Barrow M, Taylor A, Murray P, et al (2015) Design considerations for the synthesis of polymer coated iron oxide nanoparticles for stem cell labelling and tracking using MRI. Chem Soc Rev 44:6733–6748 . doi: 10.1039/c5cs00331h

68. Amin ML, Joo JY, Yi DK, An SS a (2015) Surface modification and local

orientations of surface molecules in nanotherapeutics. J Control Release 207:131–142 . doi: 10.1016/j.jconrel.2015.04.017

69. Ramimoghadam D, Bagheri S, Hamid SBA (2015) Stable Monodisperse Nanomagnetic Colloidal Suspensions: An overview. Colloids Surfaces B Biointerfaces 133:388–411 . doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.02.003

70. Oh JK, Park JM (2011) Iron oxide-based superparamagnetic polymeric nanomaterials: Design, preparation, and biomedical application. Prog Polym Sci 36:168–189 . doi: 10.1016/j.progpolymsci.2010.08.005

71. Ladj R, Bitar A, Eissa MM, et al (2013) Polymer encapsulation of inorganic nanoparticles for biomedical applications. Int J Pharm 458:230–241 . doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.09.001

72. Wu W, He Q, Jiang C (2008) Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies. Nanoscale Res Lett 3:397–415 . doi: 10.1007/s11671-008-9174-9

73. Sapsford KE, Algar WR, Berti L, et al (2013) Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology. Chem Rev 113:1904–2074 . doi: 10.1021/cr300143v

74. Ghosh Chaudhuri R, Paria S (2012) Core/shell nanoparticles: classes, properties, synthesis mechanisms, characterization, and applications. Chem Rev 112:2373–2433 . doi: 10.1021/cr100449n

75. Biju V (2014) Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. Chem Soc Rev 43:744–764 . doi: 10.1039/c3cs60273g

76. Joselevich M, Williams FJ (2008) Synthesis and characterization of diazonium functionalized nanoparticles for deposition on metal surfaces. Langmuir 24:11711–11717 . doi: 10.1021/la802247k

77. Bitar A, Vega-Chacón J, Lgourna Z, et al (2018) Submicron silica shell–magnetic core preparation and characterization. Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp 537:318-324 . doi: 10.1016/j.colsurfa.2017.10.034

78. Montagne F, Mondain-Monval O, Pichot C, et al (2002) Preparation and characterization of narrow sized (o/w) magnetic emulsion. J Magn Magn Mater 250:302–312 . doi: 10.1016/S0304-8853(02)00412-2

79. Rahman M, Nahar Y, Ullah W, et al (2015) Incorporation of iron oxide nanoparticles into temperature-responsive poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) P (NIPAAm-AA) polymer hydrogel. J Polym Res 22:33 . doi: 10.1007/s10965-015-0673-y

80. Zhang L, He R, Gu HC (2006) Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. Appl Surf Sci 253:2611–2617 . doi: 10.1016/j.apsusc.2006.05.023

81. Li Y, Ma F, Su X, et al (2012) Synthesis and catalysis of oleic acid-coated Fe3O4 nanocrystals for direct coal liquefaction. Catal Commun 26:231–234 . doi: 10.1016/j.catcom.2012.06.002

82. Viana RB, Da Silva ABF, Pimentel AS (2012) Infrared spectroscopy of anionic, cationic, and zwitterionic surfactants. Adv Phys Chem 2012:903272 . doi: 10.1155/2012/903272

83. Khosroshahi ME, Ghazanfari L (2012) Synthesis and functionalization of SiO2 coated Fe3O4 nanoparticles with amine groups based on self-assembly. Mater Sci Eng C 32:1043–1049 . doi: 10.1016/j.msec.2011.09.003

84. Yu S, Wu G, Gu X, et al (2013) Magnetic and pH-sensitive nanoparticles for antitumor drug delivery. Colloids Surf B Biointerfaces 103:15–22 . doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.10.041

85. Bini RA, Marques RFC, Santos FJ, et al (2012) Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxysilanes. J Magn Magn Mater 324:534–539 . doi: 10.1016/j.jmmm.2011.08.035

86. Panwar K, Jassal M, Agrawal AK (2015) In situ synthesis of Ag-SiO2 Janus particles with epoxy functionality for textile applications. Particuology 19:107–112 . doi: 10.1016/j.partic.2014.06.007

87. Yang YJ, Kelkar A V., Zhu X, et al (2015) Effect of sodium dodecylsulfate monomers and micelles on the stability of aqueous dispersions of titanium dioxide pigment nanoparticles against agglomeration and sedimentation. J Colloid Interface Sci 450:434–445 . doi: 10.1016/j.jcis.2015.02.051

88. Ranjbari E, Hadjmohammadi MR, Kiekens F, De Wael K (2015) Mixed Hemi/Ad-Micelle Sodium Dodecyl Sulfate-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for the Efficient Removal and Trace Determination of Rhodamine-B and Rhodamine-6G. Anal Chem 87:7894–7901 . doi: 10.1021/acs.analchem.5b01676

89. Wilhelm P, Stephan D (2006) On-line tracking of the coating of nanoscaled silica with titania nanoparticles via zeta-potential measurements. J Colloid Interface Sci 293:88–92 . doi: 10.1016/j.jcis.2005.06.047

90. Souza DM, Andrade a. L, Fabris JD, et al (2008) Synthesis and in vitro evaluation of toxicity of silica-coated magnetite nanoparticles. J Non Cryst Solids 354:4894–4897 . doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2008.04.042

91. Lowe BM, Skylaris CK, Green NG (2015) Acid-base dissociation mechanisms and energetics at the silica-water interface: An activationless process. J Colloid Interface Sci 451:231–244 . doi: 10.1016/j.jcis.2015.01.094

92. Li L, He X, Chen L, Zhang Y (2009) Preparation of core-shell magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for recognition of bovine hemoglobin. Chem Asian J 4:286–293 . doi: 10.1002/asia.200800300

93. Li Z, Kawashita M, Araki N, et al (2010) Magnetite nanoparticles with high heating efficiencies for application in the hyperthermia of cancer. Mater Sci Eng C 30:990–996 . doi: 10.1016/j.msec.2010.04.016

94. Chatterjee J, Haik Y, Chen C-J (2003) Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. J Magn Magn Mater 257:113–118 . doi: 10.1016/S0304-8853(02)01066-1

95. Kim DK, Zhang Y, Voit W, et al (2001) Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles. J Magn Magn Mater 225:30–36 . doi: 10.1016/S0304-8853(00)01224-5

96. Ju-Nam Y, Lead JR (2008) Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. Sci Total Environ 400:396–414 . doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.06.042

97. Zhu Y, Stubbs LP, Ho F, et al (2010) Magnetic Nanocomposites: A New Perspective in Catalysis. ChemCatChem 2:365–374 . doi: 10.1002/cctc.200900314

98. Yu L, Chu K, Ye H, et al (2012) Recent advances in microemulsion electrokinetic chromatography. Trends Anal Chem 34:140–151 . doi: 10.1016/j.trac.2011.11.003

99. Burguera JL, Burguera M (2004) Analytical applications of organized assemblies for on-line spectrometric determinations : present and future. 64:1099–1108 . doi: 10.1016/j.talanta.2004.02.046

100. Xin X, Zhang H, Xu G, et al (2013) Influence of CTAB and SDS on the properties of oil-in-water nano-emulsion with paraffin and span 20/Tween 20. Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp 418:60–67 . doi: 10.1016/j.colsurfa.2012.10.065

101. Park JH, Oh C, Shin S Il, et al (2003) Preparation of hollow silica microspheres in W/O emulsions with polymers. J Colloid Interface Sci 266:107–114 . doi: 10.1016/S0021-9797(03)00645-3

102. Graf C, Vossen DLJ, Imhof A, Blaaderen A Van (2003) A General Method To Coat Colloidal Particles with Silica. Langmuir 19:6693–6700 . doi: 10.1021/la0347859

103. Koczkur KM, Mourdikoudis S, Polavarapu L, Skrabalak SE (2015) Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. Dalt Trans 44:17883–17905 . doi: 10.1039/c5dt02964c

104. Cha J, Cui P, Lee J (2010) A simple method to synthesize multifunctional silica nanocomposites, NPs@SiO2, using polyvinylpyrrolidone (PVP) as a mediator. J Mater Chem 20:5533–5537 . doi: 10.1039/b924702e

105. Yedomon B, Fessi H, Charcosset C (2013) Preparation of Bovine Serum Albumin (BSA) nanoparticles by desolvation using a membrane contactor: A new tool for large scale production. Eur J Pharm Biopharm 85:398–405 . doi: 10.1016/j.ejpb.2013.06.014

106. An FF, Zhang XH (2017) Strategies for preparing albumin-based nanoparticles for multifunctional bioimaging and drug delivery. Theranostics 7:3667–3689 . doi: 10.7150/thno.19365

107. Tarhini M, Benlyamani I, Hamdani S, et al (2018) Protein-based nanoparticle preparation via nanoprecipitation method. Materials (Basel) 11:1–18 . doi: 10.3390/ma11030394

108. Lomis N, Westfall S, Farahdel L, et al (2016) Human Serum Albumin Nanoparticles for Use in Cancer Drug Delivery: Process Optimization and In Vitro Characterization. Nanomaterials 6:116 . doi: 10.3390/nano6060116

109. International Union of Pure and Applied Chemistry (2012) Compendium of Chemical Terminology

110. Hood M, Mari M, Muñoz-Espí R (2014) Synthetic Strategies in the Preparation of Polymer/Inorganic Hybrid Nanoparticles. Materials (Basel) 7:4057–4087 . doi: 10.3390/ma7054057

111. Liu J, Detrembleur C, Mornet S, et al (2015) Design of hybrid nanovehicles for remotely triggered drug release: an overview. J Mater Chem B 3:6117–6147 . doi: 10.1039/C5TB00664C

112. Sailor MJ, Park J-H (2012) Hybrid nanoparticles for detection and treatment of cancer. Adv Mater 24:3779–3802 . doi: 10.1002/adma.201200653

113. Liberman A, Mendez N, Trogler WC, Kummel AC (2014) Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine. Surf Sci Rep 69:132–158 . doi: 10.1016/j.surfrep.2014.07.001

114. Stober W, Fink A, Bohn E (1968) Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. J Colloid Interface Sci 26:62–69

115. Rahman IA, Vejayakumaran P, Sipaut CS, et al (2007) An optimized sol-gel synthesis of stable primary equivalent silica particles. Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp 294:102–110 . doi: 10.1016/j.colsurfa.2006.08.001

116. Wu S-H, Mou C-Y, Lin H-P (2013) Synthesis of mesoporous silica nanoparticles. Chem Soc Rev 42:3862–3875 . doi: 10.1039/c3cs35405a

117. Bagheri E, Ansari L, Abnous K, et al (2018) Silica based hybrid materials for drug delivery and bioimaging. J Control Release 277:57–76 . doi: 10.1016/j.jconrel.2018.03.014

118. Preiss LC, Landfester K, Muñoz-Espí R (2014) Biopolymer colloids for controlling and templating inorganic synthesis. Beilstein J Nanotechnol 5:2129–2138 . doi: 10.3762/bjnano.5.222

119. Ethirajan A, Landfester K (2010) Functional hybrid materials with polymer nanoparticles as templates. Chem - A Eur J 16:9398–9412 . doi: 10.1002/chem.201001477

120. Pi M, Yang T, Yuan J, et al (2010) Biomimetic synthesis of raspberry-like hybrid polymer-silica core-shell nanoparticles by templating colloidal particles with hairy polyamine shell. Colloids Surfaces B Biointerfaces 78:193–199 . doi: 10.1016/j.colsurfb.2010.02.031

121. Chen Y, Wang Y (2017) Synthesis and Characterization of Hollow Mesoporous Silica Spheres Using Negative-Charged Polystyrene Particles as Templates. J Inorg Organomet Polym Mater 27:380–384 . doi: 10.1007/s10904-016-0447-y

122. Wang J, Yang S, Li C, et al (2017) Nucleation and Assembly of Silica into

Protein-Based Nanocomposites as Effective Anticancer Drug Carriers Using Self-Assembled Silk Protein Nanostructures as Biotemplates. ACS Appl Mater Interfaces 9:22259–22267 . doi: 10.1021/acsami.7b05664.Nucleation

123. Zhang J, Jia J, Kim JP, et al (2018) Construction of versatile multilayered composite nanoparticles from a customized nanogel template. Bioact Mater 3:87–96 . doi: 10.1016/j.bioactmat.2017.06.003

124. Li Z, Qiang L, Zhong S, et al (2013) Synthesis and characterization of monodisperse magnetic Fe3O4@BSA core-shell nanoparticles. Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp 436:1145–1151 . doi: 10.1016/j.colsurfa.2013.08.044

125. Qasim M, Asghar K, Dharmapuri G, Das D (2017) Investigation of novel superparamagnetic Ni0.5Zn0.5Fe2O4@albumen nanoparticles for controlled delivery of anti-cancer drug. Nanotechnology 28:365101 . doi: 10.1088/1361-6528/aa7d81

126. Katumba G, Mwakikunga BW, Mothibinyane TR (2008) FTIR and Raman spectroscopy of carbon nanoparticles in SiO2, ZnO and NiO matrices. Nanoscale Res Lett 3:421–426 . doi: 10.1007/s11671-008-9172-y

127. Geng H, Peng R, Han S, et al (2010) Surface-modified titania nanoparticles with conjugated polymer for hybrid photovoltaic devices. J Electron Mater 39:2346–2351 . doi: 10.1007/s11664-010-1137-0

128. He Y (2004) Preparation of polyaniline/nano-ZnO composites via a novel Pickering emulsion route. Powder Technol 147:59–63 . doi: 10.1016/j.powtec.2004.09.038

129. Maraghechi H, Rajabipour F, Pantano CG, Burgos WD (2016) Effect of calcium on dissolution and precipitation reactions of amorphous silica at high alkalinity. Cem Concr Res 87:1–13 . doi: 10.1016/j.cemconres.2016.05.004

130. Alexander GB, Heston WM, Iler RK (1954) The solubility of amorphous silica in water. J Phys Chem 58:453–455 . doi: 10.1021/j150516a002

131. Lu X, Wu J, Huo G, et al (2012) Protein-passivated FeNi3particles with low toxicity and high inductive heating efficiency for thermal therapy. Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp 414:168–173 . doi: 10.1016/j.colsurfa.2012.08.062

132. Zhou F, Li S, Vo CD, et al (2007) Biomimetic deposition of silica templated by a cationic polyamine-containing microgel. Langmuir 23:9737–9744 . doi: 10.1021/la700715t

133. Li X, Yuan J, Liu H, et al (2010) Microgel-silica hybrid particles: Strategies for tunable nanostructure, composition, surface property and porphyrin functionalization. J Colloid Interface Sci 348:408–415 . doi: 10.1016/j.jcis.2010.04.066

134. Fournier AC, McGrath KM (2011) Porous protein-silica composite formation: Manipulation of silicate porosity and protein conformation. Soft Matter 7:4918–4927 . doi: 10.1039/c1sm05299c

135. Rao KS, El-Hami K, Kodaki T, et al (2005) A novel method for synthesis of silica nanoparticles. J Colloid Interface Sci 289:125–131 . doi: 10.1016/j.jcis.2005.02.019

136. Huang S-H, Juang R-S (2011) Biochemical and biomedical applications of multifunctional magnetic nanoparticles: a review. J Nanoparticle Res 13:4411–4430 . doi: 10.1007/s11051-011-0551-4

137. De La Rosa VR, Woisel P, Hoogenboom R (2016) Supramolecular control over thermoresponsive polymers. Mater Today 19:44–55 . doi: 10.1016/j.mattod.2015.06.013

138. Rossi LM, Garcia MAS, Vono LLR (2012) Recent advances in the development of magnetically recoverable metal nanoparticle catalysts. J Braz Chem Soc 23:1959–1971 . doi: 10.1590/S0103-50532012001100002

139. Aquino E, Prieto F, Galán CA, et al (2011) Ferrite of Cd, Pb and Mn, Synthesis and Characterization Hydrochemical way. Dyna 167:78–86

140. Zhou W, Yao N, Yao G, et al (2008) Facile synthesis of aminophenylboronic acid-functionalized magnetic nanoparticles for selective separation of glycopeptides and glycoproteins. Chem Commun 5577–5579 . doi: 10.1039/b808800d

141. Sun C, Lee JSH, Zhang M (2008) Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. Adv Drug Deliv Rev 60:1252–1265 . doi: 10.1016/j.addr.2008.03.018

142. Otagiri M, Giam Chuang VT (2016) Albumin in Medicine. Springer Nature

143. Masalov VM, Sukhinina NS, Kudrenko EA, Emelchenko GA (2011) Mechanism of formation and nanostructure of Stober silica particles. Nanotechnology 22:275718 . doi: 10.1088/0957-4484/22/27/275718