

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E
NANOBIOTECNOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

NANOCOMPÓSITOS FORMADOS POR NANOPARTÍCULAS DE
MAGUEMITA FUNCIONALIZADAS COM CITRATO DE RÓDIO (II) E
BIOPOLÍMEROS

DEYSE COELHO DA SILVA

Brasília, 20 de fevereiro de 2018

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**NANOCOMPÓSITOS FORMADOS POR NANOPARTÍCULAS DE
MAGUEMITA FUNCIONALIZADAS COM CITRATO DE RÓDIO (II) E
BIOPOLÍMEROS**

DEYSE COELHO DA SILVA

ORIENTADORA:

Professora MARIA APARECIDA GODOY SOLER

Brasília, 20 de fevereiro de 2018

*Aos meus queridos pais, Terezinha e Mauro,
minhas irmãs, Dayane e Alice Vitória, ao meu
querido namorado, Marcello, as pessoas que eu
mais amo nessa vida.*

Agradecimentos

Primeiramente agradecer aos meus queridos e amados pais, Terezinha e Mauro, por sempre me apoiarem, mesmo nos momentos difíceis, ensinaram-me a ter respeito, amor e carinho.

Especialmente ao meu querido namorado, Marcello Barreto que tanto amo, ao qual sempre estive ao meu lado, seja em momentos difíceis quanto nos bons, obrigada pelo seu amor, carinho, companheirismo e paciência nestes últimos 4 anos.

Especialmente à professora Maria Aparecida Godoy Soler, pelo apoio, ensinamentos e atenção.

À professora Dr^a Grazielle Anselmo Joanitti, pela realização do teste de MTT.

Ao professor Dr. Marcelo de Assumpção Pereira da Silva pelas análises por meio de Microscopia de Força Atômica.

Aos professores Dr. Sebastião William da Silva, Dr. Paulo Eduardo Narcizo de Souza, Dr^a Claire Nain Lunardi Gomes e Dr. Paulo César de Moraes, por terem lecionado e transmitido seus conhecimentos.

Ao professor Dr. Aparecido Ribeiro de Sousa, pelo fornecimento e apoio na realização do trabalho com a síntese do fluido magnético.

Ao Coordenador professor Dr. João Paulo Figueiró Longo, pelas orientações administrativas.

À Camila Letti, pela dedicação e atenção ao introduzir-me nas práticas laboratoriais.

Ao Rafael Aragão, Luis Ramirez e Luisa Vogado, pela ajuda na finalização do trabalho.

À Deizilene, pela sua amizade, pelo treinamento para utilização do equipamento UV-vis.

À Luana Fiune pela amizade, apoio nos momentos de muitas dúvidas no laboratório e pelas companhias nos almoços do RU.

Aos demais colegas que me apoiaram para a realização deste trabalho: Julhyana, Ariane, Felipe, Bernardo, Antonia, Karen, Ana Lygia, à Kelly Cristina, da secretaria do programa de pós-graduação, pela sua compreensão e cordialidade no atendimento.

À Ingrid, pelo apoio para a realização das imagens de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura.

Ao INCT Centro-oeste e Norte de Nanobiotecnologia e à CAPES, por apoiar este trabalho e pelo auxílio financeiro.

Por fim, agradeço a todos que me ajudaram a realizar este trabalho.

*“Boas coisas acontecem para quem espera, as melhores
coisas acontecem para quem se levanta e faz!”*

Autor desconhecido.

RESUMO

O objetivo deste trabalho é a preparação, caracterização e avaliação da citotoxicidade *in vitro* de nanocompósitos (NCs) poliméricos contendo nanopartículas (NPs) de óxidos de ferro funcionalizados com citrato (cit-mgn) ou citrato de ródio (II) (cit-mag-ro) e biopolímeros. Os NCs formados por NPs de óxido de ferro e Pluronic (F127) ou poli (álcool vinílico) (PVA), foram depositados por meio da técnica de automontagem camada-por-camada, do (inglês layer-by-layer - LbL). As NPs de óxido de ferro foram sintetizadas por meio do método de coprecipitação em meio aquoso, funcionalizadas com citrato de ródio (II) ou ácido cítrico, e estabilizadas formando o coloide magnético. O crescimento dos NCs foi monitorado por meio de espectroscopia UV-Vis, enquanto que a morfologia da superfície foi investigada por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura e de microscopia de força atômica. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostraram que as NPs sintetizadas (cit-mgn e cit-mag-ro) têm formato aproximadamente esférico com diâmetro de 5 nm. Os NCs depositados são formados por uma estrutura compacta não apresentando segregação de fase. Testes de citotoxicidade dos NCs produzidos foram realizados utilizando células tumorais da linhagem MCF-7, empregando o protocolo MTT. Os resultados mostraram que os NCs formados por NPs funcionalizadas com citrato de ródio II com 10 bicamadas são mais citotóxicos para as células tumorais estudadas, do que os de 3 bicamadas.

Palavras-chave: biopolímeros, nanocompósitos poliméricos, maguemitita, fluido magnético, automontagem, layer-by-layer, citotoxicidade, nanopartículas de óxido de ferro, citrato de ródio, poli (álcool vinílico), Pluronic.

ABSTRACT

The present work is a preparation, characterization and evaluation of the in vitro cytotoxicity of polymeric nanocomposites (NCs) containing iron oxide nanoparticles (NPs) functionalized with citrate (cit-mgn) or rhodium (II) citrate (citmag) and biopolymers. The NCs formed by NPs of iron oxide and Plutonium (F127) or polyvinyl alcohol (PVA), were deposited by the technique of self-assembling layer-by-layer, do (English layer-by-layer - LBL). Iron oxide NPs were synthesized by the coprecipitation medium in aqueous medium, functionalized with rhodium (II) citrate or citric acid, and stabilized to form the magnetic colloid. The growth of the NCs was monitored by means of UV-Vis spectroscopy, while surface morphology was investigated by means of scanning electron microscopy and atomic force microscopy. As transmission electron microscopy images, such as the synthesized NPs (cit-mgn and cit-mag-ro), the format can be obtained with the diameter of 5 nm. The deposited NCs are formed by a compact structure not exhibiting phase segregation. NC cytotoxicity tests were found on tumor cells of the MCF-7 lineage, using the MTT protocol. The results were NCs formed by NPs functionalized with rhodium citrate II with 10 bilayers are more cytotoxic for tumor cells studied than 3 bilayers.

Key Words: Biopolymers, Polymeric Nanocomposites, Magnetite, Magnetic Fluid, Self-Assembly, Layer-By-Layer, Cytotoxicity, Iron Oxide Nanoparticles, Rhodium Citrate, Polyvinyl Alcohol, Pluronic.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1 Introdução.....	1
1.1 Motivação	6
1.2 Justificativa.....	6
1.3 Objetivos.....	6
1.3.1 Objetivo Geral.....	6

CAPÍTULO 2

2 Fundamentos Teóricos	8
2.1 Nanocompósitos.....	8
2.1.2 Técnica de Automontagem	9
2.2 Matriz Polimérica	11
2.3 Complexos Metálicos.....	13
2.4 Nanopartículas de Óxido de Ferro.....	16
2.5 Fluido Magnético	18
2.5.1 Funcionalizadas das NPMs	19
2.5.2 Estabilizações de dispersões coloidais.....	21

CAPÍTULO 3

3 Procedimentos Experimentais.....	25
3.2 Materiais.....	26
3.3 Preparação dos compósitos.....	27
3.3.1 Síntese dos FMs.....	27

3.4 Deposição de NCs LbL.....	30
3.5 Técnicas de Caracterização	33
3.6 Estudo de Viabilidade Celular.....	38
CAPÍTULO 4	
4 Resultados e Discussão.....	40
4.1 Caracterização do FM.....	40
4.2 Monitoramento da deposição dos NCs.....	45
4.2.1 Estudo do tempo de imersão para os NCs com F127.....	45
4.2.1 Estudo do tempo de imersão para os NCs com PVA.....	52
4.2.3 Dados de espectroscopia Raman.....	56
4.2.2 Estudo da morfologia da superfície dos NCs.....	56
4.2 Teste de citotoxicidade.....	63
CAPÍTULO 5	
5 Conclusões e Perspectivas.....	66
5.1 Conclusões.....	66
5.2. Perspectivas para trabalhos futuros.....	67
CAPÍTULO 6	
6 Referências Bibliográficas.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Relação de NCs que foram analisados por MFA.....	37
Tabela 3.2. Relação de NCs que foram analisados por MEV.....	38
Tabela 3.3. Relação de substrato para o controle (lâminas limpas e com os NCs (PVA/cit-mag-ro) ₃ , (PVA/cit-mag-ro) ₁₀ , que foram empregados para o estudo da viabilidade celular.....	39
Tabela 4.1. Dados obtidos para as medidas de potencial zeta e D_H para as amostras empregadas.....	41
Tabela 4.2 – Relação dos valores obtidos para a viabilidade celular por meio da análise estatística.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Esquema do processo de deposição dos NCs por automontagem.....	10
Figura 2.2. Fórmula estrutural do PVA.....	12
Figura 2.3. Fórmula estrutural do óxido de polietileno (PEO) e óxido de polipropileno (PPO), representados como $EO_x - PO_y - EO_x$. No caso do Pluronic - F127 ($PEO_{97} - PPO_{69} - PEO_{97}$).....	12
Figura 2.4. Estrutura do carboxilato de ródio (II) em (a) uma estrutura do tipo gaiola com os grupos carboxilatos na região equatorial e os ligantes L na região axial, e (b) estrutura em sequência de cadeia infinita ressaltando os sítios axiais ocupados pelos átomos de oxigênio da molécula vizinha.....	14
Figura 2.5. Estrutura molecular geral do ácido cítrico (a) e citrato de ródio (II) (b). Os grupos carboxílicos do ácido cítrico são observados nas posições α e β . Onde em (b) pode-se observar que o ácido cítrico se liga no carboxilato de ródio pela posição α , formando assim o citrato de ródio (II).....	15
Figura 2.6. Estrutura da magnetita. Onde (a) cristal natural, e (b) estrutura cristalina da magnetita com oxigênio, A, o cátion tetraédricos de Fe^{3+} , e B, o cátion octaédrico de Fe^{3+}	17
Figura 2.7. Estrutura da molécula de citrato em solução aquosa.....	19
Figura 2.8. Ilustração da funcionalização de uma NPs de maguemita com uma molécula de citrato de ródio (II) (a), (b) representação esquemática de como ficaria a ligação dos compostos e (c) uma representação ilustrativa da NP ligada ao citrato de ródio (II).....	20
Figura 2.9. Ilustração do perfil das curvas de energia potencial (V_T) de interação entre duas partículas em função da distância (d) (JAFELICCI & VARANDA, 1999).....	22
Figura 2.10. Ilustração representativa do mecanismo de estabilidade eletrostático.....	23
Figura 2.11. Ilustração esquemática do mecanismo de estabilização estérica.....	24
Figura 2.12. Ilustração esquemática do mecanismo de estabilização eletro-estérica entre duas NPs revestidas com ligantes polifuncionais.....	24
Figura 3.1. Ilustração esquemática das técnicas empregadas na caracterização dos FMs e dos	

NCs LbL.....	26
Figura 3.2. Ilustração do processo de síntese das NPs de magnetita por meio do método de coprecipitação.....	28
Figura 3.3. Ilustração da rota de síntese para a obtenção do citrato de ródio (II). Adaptação de Nunes, 2014.....	29
Figura 3.4. Mecanismo de origem dos espalhamentos Raman Stokes, Anti-Sokes e Rayleigh.....	35
Figura 4.1. Imagem de MET típica da amostra de NPs de óxido de ferro funcionalizadas com citrato (a); e histograma de distribuição de tamanho obtido a partir de imagens de MET (b), onde a linha em vermelho representa o ajuste obtido com a função log normal.....	42
Figura 4.2. Imagem de MET típica da amostra de NPs de óxido de ferro funcionalizadas com citrato de ródio (II) (a); e histograma de distribuição de tamanho obtido a partir de imagens de MET (b), onde a linha em vermelho representa o ajuste obtido com a função log normal.....	42
Figura 4.3. Espectro Raman típico da amostra de NPs de óxido de ferro cobertas por citrato (a) e com citrato de ródio (b), sob intensidade do laser 0,25mW, ajustado por meio de lorentzianas.....	43
Figura 4.4. Espectro FT-IR típico da amostra de nanopartículas de óxido de ferro cobertas por citrato de ródio (II), em pastilha de KBr. O espectro de 400 a 4000 cm^{-1} . Em (a) FM cit-mgn e em (b) FM cit-mag-ro.....	45
Figura 4.5. Espectros de UV-vis do NC (F127-1/cit-mgn) _n , com n variando de 1 a 5 bicamadas, para os tempos de imersão de 1, 3, 10 e 30 min. No painel à direita, tem-se a intensidade da absorbância em 380 nm em função do número de bicamadas.....	47
Figura 4.6. Intensidade da absorbância @ 380 nm em função do tempo de imersão para o NC (F127-1/cit-mgn) ₅	48
Figura 4.7. Espectros de UV-vis do NC (F127-20/cit-mgn) _n , com n variando de 1 a 5 bicamadas, para os tempos de imersão de 1, 3, 10 e 30 min. No painel à direita, tem-se a intensidade da absorbância em 380 nm em função do número de bicamadas.....	49
Figura 4.8. Intensidade da absorbância @ 380 nm em função do tempo de imersão para o NC	

(F127-20/cit-mgn) ₅	50
Figura 4.9. Espectros de UV-vis do NC (F127-50/cit-mgn) _n , com n variando de 1 a 5 bicamadas, para os tempos de imersão de 1, 3, 15 e 30 min. No painel à direita, tem-se a intensidade da absorbância em 380 nm em função do número de bicamadas.....	51
Figura 4.10. Intensidade da absorbância @ 380 nm em função do tempo de imersão para o NC (F127-50/cit-mgn) ₅	52
Figura 4.11. Espectros de UV-vis do NC (PVA/cit-mgn) _n , com n variando de 1 a 5 bicamadas, para os tempos de imersão de 1, 3, 10 e 30 min. No painel à direita, tem-se a intensidade da absorbância em 380 e 480 nm em função do número de bicamadas.....	53
Figura 4.12. Intensidade da absorbância @ 380 nm em função do tempo de imersão para o NC (PVA/cit-mgn) ₅	54
Figura 4.13. Espectros de UV-vis dos NCs em (a) (F127-20/cit-mgn) _n ; (b) (PVA/cit-mgn) _n , e em (c) (PVA/cit-mag-ro) _n com n variando de 1 a 30 bicamadas. Nos painéis à direita, tem-se a intensidade da absorbância em 380 e 480 nm em (a) e (b) e em 320 e 520 nm em (c) em função do número de bicamadas.....	55
Figura 4.14. Espectro Raman obtido do NCs (PVA/cit-mag-ro) _n , onde contêm 10 bicamadas, ajustado empregando-se funções lorentzianas.....	56
Figura 4.15. Imagem de MEV das amostras controles com substrato limpo (a). Nas resoluções de 5.000x (lado esquerdo) e 25.000x (lado direito).....	57
Figura 4.16. Imagem de MEV dos NCs separados por bicamadas, (a) (PVA/cit-mag-ro) ₁ , (b) (PVA/cit-mag-ro) ₃ , (c) (PVA/cit-mag-ro) ₅ , (d) (PVA/cit-mag-ro) ₇ , (e) (PVA/cit-mag-ro) _{9,5} . Resoluções de 5.000x (lado esquerdo) e 25.000x (lado direito), barra 1µm. Continua.....	57
Figura 4.17. Imagem de MFA de topografia (painel esquerdo) e de fase (painel direito), (PVA/cit-mag-ro) ₁ (a e b) (PVA/cit-mag-ro) ₃ (c e d); (PVA/cit-mag-ro) ₅ (e e f); (PVA/cit-mag-ro) ₇ (g e h); (PVA/cit-mag-ro) _{9,5} (i e j) e (PVA/cit-mag-ro) ₁₀ (k e l). Continua.....	60
Figura 4.18. Imagem de MFA em três dimensões da topografia da amostra (PVA/cit-mag-ro) _{9,5} em (a) e (PVA/cit-mag-ro) ₁₀ , em (b).....	62
Figura 4.19. Dados dos valores de espessura dos NCs obtidos por meio das imagens de MFA	

em função do número de bicamadas, para as amostras (PVA/cit-mag-ro)_n, com n= 1, 3, 5, 9,5 e 10 bicamadas.....62

Figura 4.20. Ilustração dos resultados obtidos do estudo de viabilidade celular de células tumorais de carcinoma mamário da linhagem MCF-7, NCs com os NCs (PVA/cit-mag-ro)₃ e (PVA/cit-mag-ro)₁₀ e controles com tempo de exposição de 24 horas.....64

LISTA DE SÍMBOLOS

- 2d – Bidimensional
- 3d – Tridimensional
- A – Absorbância
- b – Espessura da Amostra
- C – Número de Intervalos de Tamanhos
- c – Concentração da Amostra Absorvedora
- D – Coeficiente de Difusão
- D_{MET} – Diâmetro Médio Obtido por MET
- $D_{\text{méd}}$ – Diâmetro Médio
- DMEM– Dulbecco'S Modified Eagle Medium
- DMSO – Dimetil Sulfóxido
- EDL – Espalhamento Dinâmico de Luz
- EC – Estabilidade Coloidal
- F127 – Pluronic
- Fe_3O_4 – Magnetita
- FM – Fluido Magnético
- FT-IR – Espectroscopia Infravermelho por Transformada de Fourier
- GO – Óxido de Grafeno
- I – Intensidade do Laser Após Atravessar a Amostra
- ION– Iron Oxide Nanoparticles
- I_0 – Potência do Feixe que Incide na Amostra
- IV – Espectroscopia no Infravermelho
- LB – Langmuir-Blodgett
- LbL – Layer-by-Layer
- Magh-Rh₂(H₂cit)₄ – Fluido Magnético com o Citrato de Ródio (II)
- MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- MFA – Microscopia de Força Atômica
- MTT– Brometo de 3(4,5 Dimetiltiazol-2il)-2,5-Difenil-Tetrazólio
- n – Número de Partículas Contadas

- NaCl – Cloreto de Sódio
- NCs – Nanocompósitos
- NFs - Nanofilmes
- NPs – Nanopartículas
- $P(D)$ – Distribuição Log-Normal
- PBS– Solução de Tampão Fosfato
- PDAC – Hidrocloro de Poli (Dialil Dimetilamônio)
- pH – Potencial de Hidrogênio
- PVA – Poli (Álcool Vinílico)
- PVA/cit-mag-ro – Nanocompósito Constituído Por Poli (Álcool Vinílico) e Nanopartículas funcionalizadas com Citrato de Ródio (II)
- Raman – Espectroscopia Raman
- $\text{RH}_2(\text{H}_2\text{cit})_4$ - Citrato de Ródio (II)
- RTA – Refletância Total Atenuada
- SFB – Soro Fetal Bovino
- T – Temperatura Absoluta
- T – Transmitância
- UV-Vis – Espectroscopia no Ultravioleta/Visível
- ν_0 – Frequência Do Laser
- ν_v – Frequência Do Fóton que é Absorvido ou Emitido no Processo de Espalhamento Inelástico
- $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ – Hematita
- $\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$ – Maguemita
- ζ – Potencial Zeta
- σ – Desvio Padrão do Diâmetro

Capítulo 1

Introdução

Nos últimos anos a medicina em geral teve avanços consideráveis devido à introdução dos nanomateriais em sistemas para a entrega de fármacos, em diagnóstico, biossensores, etc. Aplicações estas, que têm contribuído para o diagnóstico precoce e o tratamento de doenças (HAMBLIN et al., 2016; RIBEIRO et al, 2016). Em particular, as multicamadas produzidas por meio da técnica de montagem camada por camada (DECHER e HONG, 1991), vêm sendo utilizadas na preparação de materiais para aplicações em dermatologia (HAMMOND, 2012). O método baseia-se na adsorção alternada de espécies complementares em um substrato por meio de interações eletrostáticas, ligação de hidrogênio ou outras interações secundárias (DECHER e HONG, 1991; DECHER, 1997), permitindo o controle nanométrico da composição e a deposição de camadas altamente complexas, com características específicas. No entanto, ao contrário de outras técnicas de deposição a nível molecular, as multicamadas são depositadas em meio aquoso e à temperatura ambiente, preservando a atividade dos fármacos e de outras moléculas bioativas (HAMMOND, 2012).

As multicamadas podem ser projetadas para exibir altos níveis de biocompatibilidade seja *in vitro* ou *in vivo* (KOKTYSH et al., 2002; AI et al., 2003; HAIPENG et al, 2004; THOMPSON et al., 2005; SWISTON et al, 2008), incorporar uma ampla gama de fármacos, incluindo moléculas de diversos tamanhos, bem como nanomateriais orgânicos e inorgânicos, como as nanopartículas de óxido de ferro (ION, do inglês iron oxide nanoparticles). Um aspecto particularmente singular dessas multicamadas é a capacidade de incorporação e

entrega de dois ou mais fármacos, com diferentes perfis de liberação, ou mesmo a entrega sequencial dependente do tempo (JUAN et al., 2004; WOOD et al, 2006), além de permitir explorar a liberação controlada de fármacos por vários meios de desmontagem, desestabilização ou degradação dos nanofilmes (HAMMOND, 2012). As estruturas LbL ainda são pouco exploradas na dermatologia para a entrega de fármacos via transdérmica, não havendo relatos na literatura de sua utilização no tratamento do câncer de pele que é a doença maligna mais comum dos seres humanos, com mais de um milhão de novos casos diagnosticados a cada ano (SIMÕES et al., 2015).

Dentre os compostos metálicos estudados atualmente, *in vitro* e *in vivo*, que possuem atividade antitumoral está o citrato de ródio (II) que pode estar associado as NPs de óxidos de ferro. Estudos realizados mostram que neste caso, o composto pode ser administrado por via intravenosa representando uma nova estratégia terapêutica para o tratamento de câncer (CARNEIRO et al, 2011; CARNEIRO et al., 2013).

A administração transdérmica de quimioterápicos associados a nanomateriais tem resultado em terapias menos invasivas, com a redução da dose administrada, apresentando consequentemente menor toxicidade, efeitos colaterais reduzidos e o direcionamento do fármaco para o local de ação, atingindo as células carcinogênicas (PEIXOTO et al., 2015; RIBEIRO et al, 2016; PY-DANIEL et al., 2016). Além disso, a via de administração transdérmica apresenta vantagens sobre a via oral, reduzindo os efeitos secundários indesejáveis e evitando a degradação e o metabolismo de primeira passagem hepático, e sobre as vias intravenosa e intramuscular, por ser indolor, menos invasiva, aumentando o conforto e a adesão do paciente à terapia (BAEHNER et al, 1970; OSSADNIK et al., 2006).

A técnica LbL tem sido utilizada com sucesso para a deposição de NCs formados por NPs e polímeros (CORREA-DUARTE et al., 1998; MAMEDOV et al., 2000; PATERNO et

al., 2009a; PARTERNO et al., 2009b; PATERNO et al., 2010; ALCANTARA et al., 2011a; ALCANTARA et al., 2011b; SHI et al., 2015; PATERNO et al., 2012; SOLER et al., 2012b; SOLER et al., 2012c; ALCANTARA et al., 2013a; ALCANTARA et al., 2013b; NEUMANN et al., 2013; SANTOS et al., 2014, LETTI, 2017a; LETTI, 2017b). Como componentes inorgânicas, as propriedades das IONs podem ser exploradas de diversas maneiras como sítio para o ancoramento de espécies de interesse, atividade antitumoral resultante da magnetohipertermia (PANKHURST et al., 2003; LAURENT et al., 2011; LAURENT et al., 2014), intensificador da permeação de fármacos na pele (RAO et al., 2015) e também como um elemento de controle das propriedades da matriz, sob o efeito de um campo magnético externo. Em adição, as IONs também são adequadas para aplicações tecnológicas, tais como em transformadores e sensores (VIALI et al., 2010).

Entre os biopolímeros que podem ser empregados como matriz polimérica nos NCs, pode-se citar o poli (álcool vinílico) (PVA) (WU et al., 2002; ZHANG e SINGH, 2004) e o Pluronic (F127). O PVA é biodegradável, não tóxico, solúvel em água, de alta aderência à pele (MANSUR et al., 2004) podendo ser depositado na forma de NCs (CASTILHO, 2014; SOUZA, 2016). O F127 é um copolímero tribloco anfifílico, PEO-PPO-PEO (PEO: poli (óxido de etileno); PPO: poli (óxido de propileno), tendo na sua estrutura grupos hidrofóbicos PPO (capazes de ancorar fármacos) e grupos hidrofílicos PEO, responsáveis por sua dispersão em água, resultando em coloides altamente estáveis. Este copolímero não é tóxico, é termosensível podendo gelificar a 37°C, temperatura muito próxima da corporal. Dessa forma, o F127 tem sido empregado no transporte de fármacos e outros agentes bioativos, pois pode liberá-los lentamente com uma ação prolongada (FUSCO et al., 2006; NIE et al., 2011; RIBEIRO et al., 2016).

Os compostos de ródio têm sido estudados devido aos seus efeitos anticancerígenos.

Inicialmente o carboxilato de ródio foi pesquisado visando o tratamento de células tumorais, porém seus efeitos toxicológicos são altos (REIBSCHEID, 1994). Algumas pesquisas foram desenvolvidas com o acetato de ródio (II), obtendo-se maior taxa de sobrevivência entre os animais estudados (REIBSCHEID, 1994 e KATSAROS, 2002), quando comparados com o composto estudado anteriormente. No entanto tais compostos são considerados hidrofóbicos com difícil interiorização nas células, tornando-os pouco eficientes (WEINBERG, 2008). Outros compostos de ródio com grupo hidrofílico como o metoxiacetato de ródio (II), o trifluoroacetato de ródio (II) e o citrato de ródio (II) (SOUZA, 1996 e PEIXOTO, 2015), também foram estudados. Os resultados mostraram que o citrato de ródio (II), apresentou significativa atividade antitumoral em tumor ascítico de Ehrlich, demonstrando ser promissor para quimioterapia (ZYNGIER, 1989 e CARNEIRO, 2011). No entanto, há necessidade de empregar alta dose sistêmica para garantir resultados na redução de produção de células tumorais (REIBSCHEID, 1994, HILGER, 2005). O citrato de ródio (II) é composto por dois átomos de ródio ligados a duas moléculas de água, na posição axial, e as moléculas de citrato com fórmula molecular $[\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4]$, possuem oito ácidos carboxílicos livres (-COOH) (dois para cada citrato) e duas hidroxilas (-OH) (CARNEIRO, 2011; CARNEIRO, 2013 e PEIXOTO, 2012). Estudo *in vivo* realizado em tumores de Ehrlich, que comparou o efeito do citrato de ródio (II) livre com o de uma nanoformulação, obtida com o mesmo adsorvido na superfície de NPs de maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), mostrou que o coloide composto por NPs cobertas com citrato de ródio (II) apresenta menor toxicidade às células normais, sem perder o efeito sobre as células cancerígenas (CARNEIRO, 2013; PEIXOTO, 2012 e PEIXOTO, 2015), mostrando, portanto que o citrato de ródio (II) pode ser mais eficiente quando acoplado a NPs de maguemita.

Com propriedades intrínsecas tais como os efeitos de superfície e o

superparamagnetismo, as NPs de óxidos de ferro tais como a maguemita e a magnetita, e a ferrita de cobalto, podem ser empregadas para o direcionamento de fármacos a um alvo por meio do uso de gradientes de campos magnéticos (CAPARROS, 2001; RADTCHENKO, 2002; SOLER et al., 2005; MELO et al, 2006; SOLER et al., 2007a; SOLER et al., 2007b; ARRUEBO, 2007; SOLER & PATERNO, 2015). Estas NPs podem ser sintetizadas em tamanhos na faixa de 5 a 20 nm e associadas a fármacos apresentando tamanhos apropriados para aplicação via transdérmica (CAPARROS, 2001; PAPINI, 2003 e JOHNSTON, 2006).

A aplicação de NCs visando a entrega de fármacos via transdérmica é favorecida devido ao tamanho de seus componentes, que em contato com a pele atravessam as duas principais camadas sem prejuízo de sua metabolização, mas podem ser afetadas por vários fatores, tais como espessura, temperatura, nível de hidratação, limpeza da pele, fluxo sanguíneo, concentração de lipídios, número de folículos pilosos, função das glândulas sudoríparas, raça, pH na superfície da pele e integridade do estrato córneo (CLEETER, 1994; CARNEIRO, 2011 e De VILLIERS, 2011). Os NCs LbL representam uma estratégia para a administração transdérmica de diversas classes de fármacos, incluindo o quimioterápico citrato de ródio (II), considerando-se que, com a desagregação do NC o fármaco ou outras moléculas bioativas poderão ser liberados e penetrar na pele via folículos pilosos, desse modo, podendo atingir células específicas (RAO et al., 2015). Não foram encontrados na literatura estudos relativos ao quimioterápico citrato de ródio (II) associado a nanoestruturas planares (SHI et al, 2011).

Neste contexto, este projeto contempla a fabricação e a caracterização de dois tipos de NCs depositados por meio da técnica de automontagem compostos por biopolímeros (PVA ou Pluronic F127) e nanopartículas de maguemita funcionalizadas com citrato ou citrato de ródio (II).

1.2 Justificativa

A deposição de nanoestruturas planares contendo NPs de óxido de ferro funcionalizados com ácido cítrico ou citrato de ródio (II) e polímeros biocompatíveis será realizada empregando-se a técnica de automontagem camada-por-camada. Neste estudo, ao contrário da quase totalidade dos estudos já publicados, os seus componentes serão adsorvidos com base em ligação de hidrogênio. Esta abordagem será empregada porque estudos desenvolvidos pelo grupo mostraram que nanoestruturas com essas características podem desagregar em meio biológico (SOUZA, 2016). Será empregado o biopolímero poli (álcool vinílico) PVA ou o copolímero Pluronic F127. O F127 foi aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*, Estados Unidos); enquanto a parte inorgânica será formada por NPs de óxido de ferro funcionalizadas com anticancerígeno citrato de ródio (II) ou ácido cítrico.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento de novos NCs na forma de estruturas planares depositados por LbL formados por NPs de óxido de ferro funcionalizadas com ácido cítrico ou citrato de ródio (II) e como biopolímeros PVA ou Pluronic F127.

1.3.1 Objetivo Específico

Para alcançar o objetivo mencionado, várias etapas foram desenvolvidas:

- Síntese e caracterização dos coloides magnéticos em uma primeira etapa e posteriormente o seu emprego como fonte de NPs de óxidos de ferro na deposição dos NCs;
- Desenvolvido de um protocolo para a deposição LbL dos NCs cujos componentes são acoplados por meio de ligação de hidrogênio;
- Monitoramento da deposição LbL dos NCs por meio de espectroscopia UV-vis;
- Caracterização dos NCs produzidos;
- Estudo dos efeitos citotóxicos dos NCs produzidos;

Capítulo 2

Fundamentos Teóricos

Neste trabalho, os NCs foram produzidos empregando como matrizes poliméricas, o Pluronic F127 e o poli (álcool vinílico) (PVA) e como componente inorgânico NPs de óxido de ferro funcionalizadas com ácido cítrico ou citrato de ródio (II). Neste capítulo serão apresentados a técnica de automontagem camada-por-camada (LbL) empregada na deposição dos NCs, bem como os materiais utilizados.

2.1 Nanocompósitos

A deposição de NCs LbL em superfícies sólidas tem contribuído para o avanço tecnológico, como por exemplo, no desenvolvimento de biossensores (DAVIS; HIGSON, 1975), imunoenaios (OSTROFF et al., 1998) e em aplicações biomédicas, como revestimento e funcionalização de biomateriais, por meio da automontagem de proteínas (CARUSO et al., 1997), DNA ou NPs (ZHANG et al., 2005). Os NCs podem ser preparados com a adsorção de moléculas de importância biológica, como proteínas, peptídeos, lipopolissacarídeos, polímeros e medicamentos.

Entre as técnicas mais empregadas para a produção de NCs estão a Langmuir-Blodgett, monocamadas automontadas, automontagem camada por camada, spin-coating, sublimação e spray. A técnica de automontagem LbL, que foi utilizada neste trabalho será apresentadas a seguir.

2.1.1 Técnica de Automontagem

O método de automontagem foi inicialmente sugerido por Iler em 1965 (ILER, 1966) e Kirkland em 1966 (KIRKLAND, 1965). Ambos os estudos relataram a deposição de NCs inorgânicos empregando partículas de sílica carregadas negativamente e fibrilas de bauxitas com cargas positivas. Posteriormente, Kirkland patenteou esse sistema (KIRKLAND, 1970; BERGNA et al, 1984), no entanto, a falta de técnicas de caracterização adequadas na época prejudicou o desenvolvimento desse processo de deposição. Por volta dos anos 80, Fromherz e colaboradores e Gölander e colaboradores, realizaram a montagem passo a passo de proteínas e polieletrólitos de cargas opostas. (ROSENBUSCH et al, 1980; GÖLANDER et al, 1982). Há cerca de duas décadas, a técnica LbL foi introduzida como um novo método para depositar multicamadas de polieletrólitos e funcionalizar superfícies, planares ou não (DECHER & HONG, 1991).

O método LbL é altamente versátil para produção de estruturas em multicamadas que podem ser compostas de vários tipos de materiais usando procedimento simples, e de baixo custo. As multicamadas podem ser depositadas em diferentes tipos e tamanhos de substratos. A técnica é considerada de automontagem porque a supercompensação de cargas nas camadas depositadas compensam as da camada antecedente, até que carga da superfície seja invertida, de modo que a cada camada, a deposição se encerra automaticamente. (DECHER, 1997; SOLER et al., 2012b). A maioria dos estudos utiliza a atração eletrostática entre componentes de cargas opostas. Porém encontra-se na literatura multicamadas LbL mantidas adsorvidas por meio de ligações de hidrogênio (STOCKTON & RUBNER, 1995), transferência de cargas (SHIMAZAKI et al., 1997), ligações covalentes (BRYNDA & HOUSKA, 1996), reconhecimento biológico (ANZAI et al., 1999) e interações hidrofóbicas (KOTOV, 1999).

A ligação de hidrogênio é um caso especial da interação dipolo-dipolo, que ocorre entre átomos de hidrogênio e átomos muito eletronegativos principalmente os elementos F, O e N (H – F, H – O ou H – N), e os pares de elétrons não compartilhados de outros átomos eletronegativos (SOLOMONS & FRYHLE, 2009). As ligações de hidrogênio são geralmente mais fortes que as de dipolo-dipolo e de dispersão, tendo papel importante em muitos sistemas químicos (GU et al, 2001).

O procedimento para deposição de nanocompósitos foi realizado seguindo-se as etapas ilustradas na Fig. 2.1.: (i) O substrato previamente funcionalizado é imerso na solução polimérica; (ii) Lavagem; (iii) Secagem, obtendo a primeira monocamada; (iv) O substrato é imerso, na suspensão coloidal que contém as NPs; (v) Lavagem; (vi) Secagem, obtendo a primeira bicamada;

A repetição dos passos descritos permite a formação da nanoestrutura com a espessura, ou número de bicamadas desejadas.

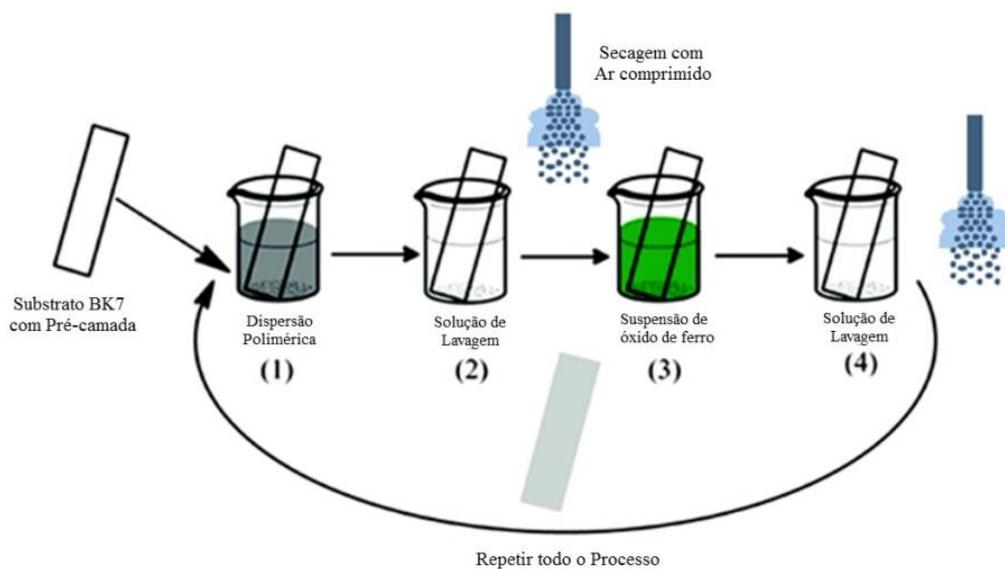


Figura 2.1. Esquema do processo de deposição dos NCs por automontagem.

2.2 Matriz Polimérica

As pesquisas sobre a utilização de polissacarídeos como biomateriais foi iniciada em 1959. Foram estudados os derivados de celulose, bem como outros compostos como a quitina, quitosana, a inulina, PVA, Pluronic F127, chegando-se a várias aplicações em medicina (GIL & FERREIRA, 2006).

Os biomateriais podem ter origem sintética ou natural e em geral são empregados para substituir partes do organismo ou dispositivos que ficam em contato com sistemas biológicos, com o objetivo de tratamento ou substituição de tecidos ou órgãos, sendo que os mais estudados são o álcool polivinílico (PVA), o poly (óxido de etileno) e o Pluronic F127.

O polímero PVA é biodegradável, não tóxico, solúvel em água e não comestível. Em 1924, foi obtida pela primeira vez por Herman e Haehnel, por meio da hidrólise de acetato de polivinila, que é a forma de obtenção comercial utilizada até o momento. Em 1961, estudos desenvolvidos por Staudinger, descreveram a transformação reversível entre o álcool polivinílico e o acetato de polivinila, por meio das reações de esterificação e saponificação (ZHANG & SINGH, 2004). As propriedades básicas do PVA dependem do grau de polimerização e da hidrólise. Devido às suas propriedades únicas tais como: excelente adesivo; boa resistência a solventes; óleos e graxas, sua resistência à permeação de oxigênio é superior à de qualquer outro polímero conhecido (ZHANG & SINGH, 2004). Em adição, é um dos poucos polímeros semicristalinos solúveis em água com boas características interfaciais e mecânicas. O PVA tem sido utilizado em processamento de papel e fibras, assim como o F127. Em adição, estudos preliminares mostraram que NCs LbL que empregaram o PVA como matriz polimérica e NPs de óxido de ferro podem ser desmanchados em meio biológico (SOUZA, 2016).

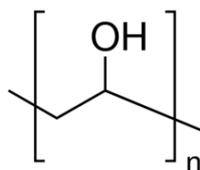


Figura 2.2. Fórmula estrutural do PVA. **Fonte:** Adquirido do site Sigma Aldrich, Brasil e Adaptado.

Os copolímeros de triblocos anfifílicos solúveis em água (tipo ABA) de óxido de polietileno (PEO) e óxido de polipropileno (PPO), comercialmente disponíveis como Pluronic® (BASF) ou Poloxamers® (ICI), podem ser sintetizados com diferentes quantidades de cada um dos blocos PEO e PPO com a fórmula $EO_x - PO_y - EO_x$. Entre as diversas espécies de Pluronic, o F127, com configuração estrutural $(PEO_{97} - PPO_{69} - PEO_{97})$, é o copolímero mais estudado devido à sua alta estabilidade, capacidade de gelificação à temperatura ambiente e não tóxico, características que o tornam um veículo adequado para fármacos e fotossensibilizadores (SCHMOLKA, 1972; DUMORTIER et al, 2006; ESCOBAR-CHÁVEZ et al, 2006; PY-DANIEL et al, 2016). Considerando-se que o copolímero F127, além das características já discutidas, apresenta sítios hidrofóbicos em sua cadeia, ele foi empregado como matriz polimérica na deposição dos compósitos com NPs de óxidos de ferro, visando obter NCs depositados em meio aquoso que apresentam sítios hidrofóbicos em sua estrutura.

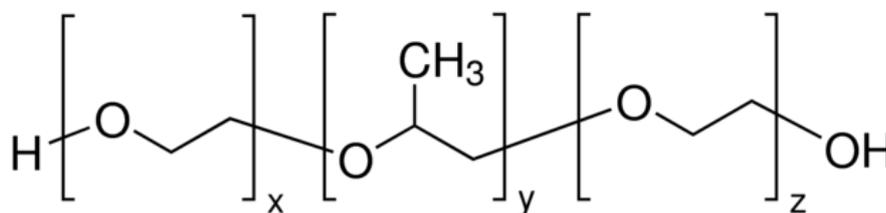


Figura 2.3. Fórmula estrutural do óxido de polietileno (PEO) e óxido de polipropileno (PPO), representados como $EO_x - PO_y - EO_x$. No caso do Pluronic - F127 $(PEO_{97} - PPO_{69} - PEO_{97})$. **Fonte:** Adquirido do site Sigma Aldrich, Brasil e Adaptado.

2.3 Complexos Metálicos

Os tratamentos terapêuticos convencionais para o câncer de mama como quimioterapia, radioterapia, cirurgia e hormonioterapia, são ineficazes quando o câncer é diagnosticado já em estado avançado. Tal fator demanda pesquisas e um contínuo desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas que possam tratar e curar a doença de forma eficaz e menos invasiva (DHANKHAR et al, 2010). Até o momento, os quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer agem nas células tumorais e nas normais, causando assim, toxicidade sistêmica e efeitos colaterais ao organismo. (BRANNON-PEPPAS & BLANCHETTE, 2004). Uma das alternativas seria direcionar o quimioterápico para o local desejado, o que não ocorre com as tecnologias disponíveis (GU et al, 2007).

Os agentes metálicos que apresentam propriedades antitumorais em linhagens celulares, como os carboxilatos de ródio (II) (ZHANG & LIPPARD, 2003), têm sido estudados. Em particular, os carboxilatos de ródio (II), com fórmula geral $(\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CR})_4)$ têm sido investigados desde 1960, estando entre os mais promissores da segunda geração de compostos de metais de transição com atividade antitumoral (SOUZA et al, 1996; KATSAROS & ANAGNOSTOPOULOU, 2002).

A Fig. 2.4 (a) mostra a estrutura do carboxilato de ródio (II), onde se observa a estrutura básica (tipo gaiola), formada pela ligação em ponte de quatro grupos carboxilatos na região equatorial à ligação $\text{Rh}^{2+} - \text{Rh}^{2+}$. Os dois cátions Rh possuem estado de oxidação formal +2 e são unidos por uma ligação metal-metal (NORMAN & KOLARI, 1978). Uma variedade de novas estruturas podem ser formadas a partir da modificação dos ligantes (L) ou ânions (X), formando $[\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CR})_4\text{L}_n]$ e sais $\text{M}_n[\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CR})_4\text{X}_n]$, onde ($n = 1,2$; M = metal alcalino ou base protonada) (BOYAR & ROBINSON, 1983), nas posições. A representação

por meio da estrutura de gaiola é idealizada, pois as moléculas possuem cadeias infinitas, onde os sítios axiais são ocupados pelos átomos de oxigênio da molécula vizinha (Fig. 2.4b) (COTTON, HILLARD & MURILLO, 2002).

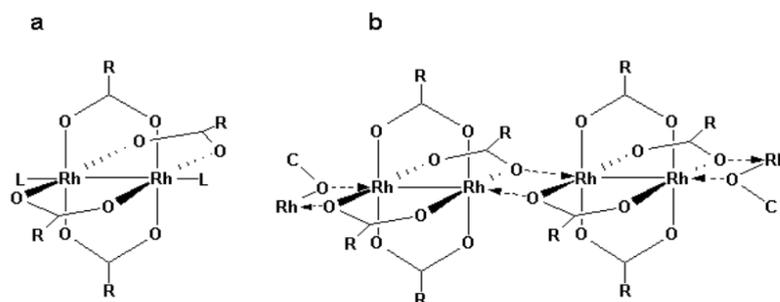


Figura 2.4. Estrutura do carboxilato de ródio (II) em (a) uma estrutura do tipo gaiola com os grupos carboxilatos na região equatorial e os ligantes L na região axial, e (b) estrutura em sequência de cadeia infinita ressaltando os sítios axiais ocupados pelos átomos de oxigênio da molécula vizinha. Fonte: COTTON et al, 2002.

O mecanismo de ação pelo qual os carboxilatos de ródio exercem suas atividades biológicas ainda não é bem conhecido, mas as investigações têm sido realizadas para esclarecer as interações entre os carboxilatos de ródio (II) e moléculas biológicas. Observa-se que a atividade antitumoral destes complexos pode estar, em parte, associada a um mecanismo de inibição de síntese de DNA e proteína, de maneira similar ao que ocorre com a cisplatina (KATSAROS e ANAGNOSTOPOULOU, 2002). Também foi demonstrado que o carboxilato de ródio (II) pode interromper a síntese e transcrição do DNA porque pode fazer ligação direta com os átomos de nitrogênio, enxofre, oxigênio e fósforo estabilizando nucleotídeos no DNA, o que indica seu potencial para uso na quimioterapia (HOWARD, SPRING & BEAR, 1976; CHIFOTIDES & DUNBAR, 2005).

O citrato de ródio (II), cuja fórmula molecular é $[Rh_2(H_2cit)_4]$, é formado pela ligação em ponte de quatro íons citrato a uma unidade dimetalica $Rh^{2+} - Rh^{2+}$. A nomenclatura proposta é tetrakis (p-0,0-citrato) de dirródio (II). O complexo possui uma cadeia fechada composta por dois átomos de ródio ligados à água na posição axial e por

quatro grupos radicais constituídos por citrato. Com os grupos radicais constituídos por três carboxilas que podem estar nas posições alfa (α) ou beta (β), conforme se observa na Fig. 2.5(a).

O citrato de ródio (II) apresenta atividade citotóxica, citostática e antitumoral em células de carcinoma mamário em tumor ascético de Ehlich e em células tumorais (Y-1) e normais da adrenocortical (AR-1) (ZYNGIER, KIMURA & NAJJAR, 1989; REIBSCHEID et al, 1994). Este composto possui em sua estrutura grupos carboxilatos e hidroxilas, não coordenados que podem ser utilizados em etapas reacionais com moléculas específicas (anticorpos, proteínas, polímeros) ou com superfícies, pelas quais, estes possam estabelecer interações químicas ou físicas. Os grupos funcionais são quimicamente similares ao de moléculas bioativas (ácidos orgânicos, aminoácidos, carboidratos, etc) sendo utilizadas para funcionalizar nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (GUPTA & GUPTA, 2005). para produzir formulações do tipo fármaco-partícula. Devido às similaridades do citrato de ródio (II) com o ácido cítrico, como solubilidade e acidez, a sua adsorção em ION leva à obtenção de FM estáveis com características de biocompatibilidade e estabilidade (GEPPERT, et. al., 2009).

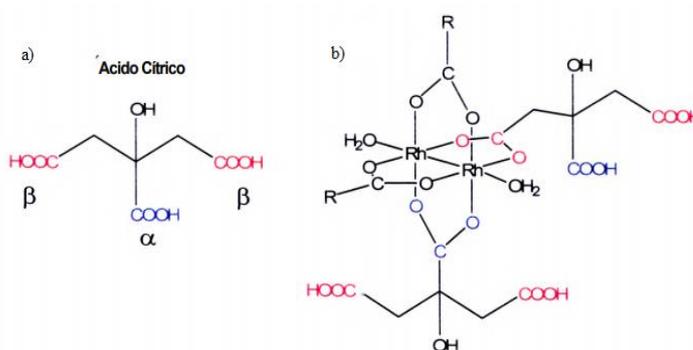


Figura 2.5. Estrutura molecular geral do ácido cítrico (a) e citrato de ródio (II) (b). Os grupos carboxílicos do ácido cítrico são observados nas posições α e β . Onde em (b) pode-se observar que o ácido cítrico se liga no carboxilato de ródio pela posição α , formando assim o citrato de ródio (II) (CARNEIRO et al, 2011).

2.4 Nanopartículas de Óxido de Ferro

A magnetita, cujo cristal natural é mostrado na Fig. 2.6 (a) apresenta estrutura espinélio invertida, com íons O_2^- de empacotamento cúbico e os íons Fe^{2+} nos interstícios octaédricos, bem como a metade dos íons Fe^{3+} ; enquanto o restante dos íons Fe^{3+} nos sítios tetraédricos, conforme se observa na Fig. 2.6 (b). Os fluidos magnéticos (FM) ou ferrofluidos consistem de nanopartículas magnéticas dispersas em suspensões coloidais estáveis. Para que as NPs sejam consideradas biocompatíveis, biodegradáveis, hemocompatíveis e não tóxicas ao organismo é necessário que elas sejam funcionalizadas com materiais biocompatíveis e estáveis tais como dextrana, ácido cítrico, meso-2,3-dimercaptosuccinic acid, fosfolipídios, entre outros (DOUZIECH-EYROLLES et al, 2007; MCBAIN et al, 2008; MCCARTHY & WEISSLEDER, 2008; SOLER et al, 2011; NUNES et al, 2014a).

A síntese de NPs pode ser realizada empregando diversos métodos químicos como o de decomposição térmica, reações hidrotermais, microemulsão e coprecipitação (LAURENT et al, 2008). O total controle de tamanho e morfologia das NPs é obtido por meio do método de decomposição térmica. Os processos de síntese de NPs por coprecipitação e por decomposição térmica são os mais estudados (ASTRUC et al, 2005).

Os FMs utilizados nesta pesquisa foram obtidos por meio da coprecipitação por ser um método relativamente simples e eficiente. O método por coprecipitação em meio aquoso é de baixo custo, e permite um controle considerável das dimensões, cristalinidade e morfologia das NPs (WILLARD, 2004).

Os óxidos de ferro magnetita (Fe_3O_4) e maguemita ($\gamma-Fe_2O_3$) são geralmente preparados por uma mistura estequiométrica de sais ferrosos e férricos em meio aquoso alcalino em atmosfera inerte, à temperatura ambiente ou elevada. A composição, a forma e o

tamanho das NPs dependem do tipo de sais utilizados, como por exemplo, cloretos, sulfatos ou nitratos. As características das NPs dependem de variáveis empregadas durante a coprecipitação, tais como a temperatura, o valor do pH e a força iônica do meio.

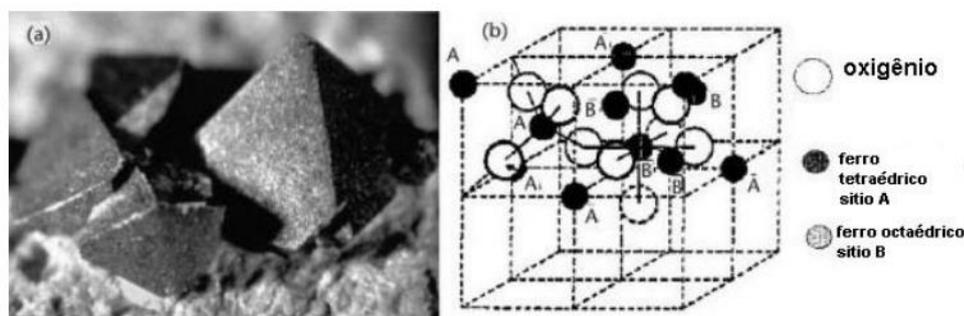


Figura 2.6. Estrutura da magnetita. Onde (a) cristal natural, e (b) estrutura cristalina da magnetita com oxigênio, A, o cátion tetraédricos de Fe^{3+} , e B, o cátion octaédrico de Fe^{3+} (SCHULZ, 2009).

A síntese das NPs por coprecipitação consiste na hidrólise alcalina do sal férrico na presença de outro sal, que possua em sua composição íons de um metal de transição divalente como, por exemplo, Fe, Ni, Co, ou Zn. As NPs de Fe_3O_4 . A magnetita pode ser obtida ao se dissolver os íons de Fe^{2+} e Fe^{3+} em meio alcalino, conforme a reação química 2.1 (KANG, 1996).



Para que ocorra a precipitação total de magnetita é necessário que a solução seja mantida com pH entre 9 e 14, com proporção de $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$ em 2:1 (KANG, 1996; SOLER, 2012a). No momento da síntese, a base é adicionada à solução de íons metálicos sob agitação. O diâmetro das NPs depende de parâmetros como velocidade da agitação, concentração da base e temperatura da reação. Outros fatores também influenciam no tamanho das NPs como o tipo de sais utilizados, a razão molar de $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$, o pH do meio, a concentração dos íons e da presença de surfactantes (RAMIREZ, 2013). Durante a síntese ocorre um processo de nucleação e crescimento dos cristais (GRIBANOV et al, 1990; GUPTA & GUPTA, 2005).

Neste trabalho, foi utilizado o método de coprecipitação para obtenção FMs que foram empregadas como fonte de NPs na deposição dos nanocompósitos.

2.5 Fluidos Magnéticos

Em sua maioria as aplicações que envolvem partículas magnéticas requerem que as mesmas estejam estabilizadas na forma de dispersão coloidal chamado de FM. Os FMs apresentam estabilidade coloidal, onde as NPs dispersas tendem a se agregar por causa do mecanismo de redução de energia livre devido à grande área superficial. Na preparação do FM, a estabilidade pode ser obtida principalmente por meio dos processos de repulsão eletrostática e/ou estérica, contrapondo à atração de Van der Waals e dipolar magnética existente entre as nanopartículas (SOLER et al., 2012c).

Em um FM as NPs (fase dispersa) encontram-se suspensas em um líquido, orgânico ou inorgânico (fase dispersante) (ROSENSWEIG, 1987; SHAW, 1992). As propriedades de superfície bem como a dimensão das partículas, se as interações partícula-partícula e partícula-dispersante, são os fatores que influenciam na estabilidade de um FM. O sistema não apresenta estabilidade termodinâmica, apenas estabilidade coloidal cinética, de modo que a suspensão se mantém estável por algum tempo, ou seja, sem ocorrer sedimentação (SOLER et al, 2012c). A repulsão eletrostática e a estérica podem agir para evitar a agregação das NPs originando outra forma de estabilização dos FMs em meio aquoso. Neste sentido, a superfície da NP é funcionalizada com um ligante polifuncional, no qual alguns grupos funcionais ionizáveis não se envolvem na complexação da superfície da partícula permanecendo em contato com o dispersante. Estas NPs funcionalizadas podem ser dispersas em meio aquoso, com pH neutro apropriado para o uso em aplicações biológicas (SOLER et al, 2011a).

2.5.1 Funcionalização das NPs

Neste trabalho foram utilizadas NPs funcionalizadas com ácido cítrico, de modo que a estabilidade do FM foi obtida por meio de repulsão eletroestérica. A repulsão estérica ocorre exclusivamente entre as moléculas adsorvidas na superfície das NPs, ou surfactantes; possuindo alta afinidade pelo dispersante e impedindo a aproximação das NPs. A molécula de citrato também confere à superfície das NPs carga negativa, devido à presença de grupos carboxilato, favorecendo assim a repulsão entre as mesmas. Neste sentido, o FM é estável em condições fisiológicas, de pH e salinidade, adequado para aplicações biocompatíveis (MORAIS et al., 2006).

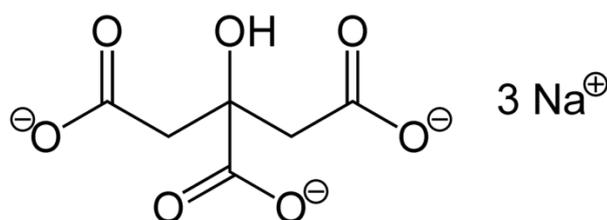


Figura 2.7. Estrutura da molécula de citrato em solução aquosa.

O FM formado por NPs funcionalizadas com citrato é estabilizado em pH 7,0 e as NPs apresentam carga negativa, permitindo que elas possam ser automontadas com polyeletrólitos de cargas positivos, via atração eletrostática. Neste trabalho, para deposição dos NCs com matriz de PVA, foi utilizado o FM em pH 3,7, pois as NPs apresentam o grupo -COOH, que podem fazer ligações de hidrogênio com moléculas neutras e com grupos aceitadores de elétrons, com o PVA e o F127 (BLATCHFORD et al, 2002).

O citrato de ródio (II) que foi empregado na funcionalização de NPs de maguemitas, apresenta em sua estrutura grupos funcionais constituídos por ácidos carboxílicos (-COOH) e por hidroxilas (-OH), levando à obtenção de suspensões coloidais estáveis (NUNES et al.,

2014b; CARNEIRO, 2011) (Fig. 2.8).

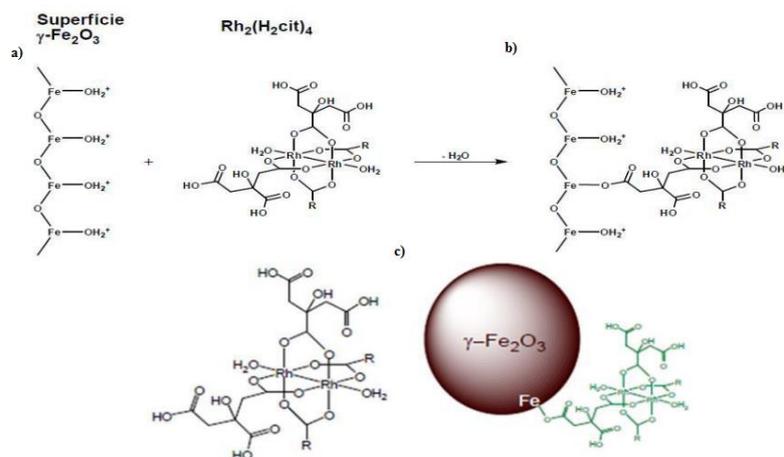


Figura 2.8. Ilustração da funcionalização de uma NPs de maguemita com uma molécula de citrato de ródio (II) (a), (b) representação esquemática de como ficaria a ligação dos compostos e (c) uma representação ilustrativa da NP ligada ao citrato de ródio (II) (CHAVES, 2013).

As NPs de óxido de ferro também contêm sítios ativos e seletivos para íons ou moléculas (Fig. 2.8a). Os grupos livres carboxila presentes na estrutura química do citrato de ródio (II), podem se ligar ao Fe-OH da superfície das NPs, reação que ocorre com a eliminação de água e formação do complexo Fe-OOC-R (Fig. 2.8b-c). Estudos realizados em nosso grupo de pesquisa utilizaram o citrato de ródio (II) livre e $[\text{Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4]$ e NPs de maguemita funcionalizadas com citrato de ródio (II) $[\text{Mgn-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4]$, para estudos *in vitro* com células cancerígenas e *in vivo*. Observou-se que no caso de associação com as NPs, a redução de carcinomas mamários em camundongos foi eficiente, enquanto as células normais foram menos afetadas (CARNEIRO, 2011; ROCHA, 2014). Neste estudo, o FM contendo as NPs de maguemita funcionalizadas com citrato de ródio (II) $[\text{Mgn-Rh}_2(\text{H}_2\text{cit})_4]$ será usado como fonte de NPs para a deposição dos NCs LbL, resultando portanto na introdução de um fármaco na estrutura do NC.

2.5.2 Estabilização de dispersões coloidais

A estabilidade do FM é necessária para qualquer tipo de aplicação. A estabilidade pode ser influenciada por mecanismos intrínsecos, como por exemplo, as interações de Van der Waals, dipolar magnética e dupla camada elétrica entre partículas, ou mesmo, por mecanismos extrínsecos, campo gravitacional, campo magnético e temperatura. A energia potencial total entre duas partículas (V_T) é dada pela soma das energias potenciais de atração (V_A) e repulsão (V_R). A variação de (V_T) com a distância entre as partículas fornece a curva de energia potencial como mostra na Fig. 2.9. Observa-se que o perfil da curva de energia potencial total V_T possui uma sequência de mínimos e máximos sugerindo que a predominância de interações atrativas ou repulsivas é variável com a distância interpartícula. A curva apresenta um pico mínimo com menor intensidade em distâncias maiores, e um pico máximo em distâncias medianas e um pico mínimo profundo em distâncias menores. Os dois picos mínimos são conhecidos como mínimo secundário (mínimo raso) e primário (mínimo profundo) e correlacionados ao processo de agregação. A existência do mínimo secundário depende da alteração de fatores que controlam a intensidade das interações repulsivas (COSGROVE, 2005). Quando o sistema atinge o mínimo secundário, pode ocorrer a agregação das partículas e corresponde o processo de floculação (EVERETT, 1988). Na região de máximo na curva ocorre a barreira energética para a agregação das partículas e corresponde a uma situação de predominância de interações repulsivas. Por outro lado, no mínimo primário as interações atrativas são muito efetivas e a agregação das partículas é irreversível, denominado coagulação. Os mecanismos de interação para a estabilidade coloidal das NPs conforme foi discutido, são: a estabilidade pode ser obtida por meio de 3 processos (EVERETT, 1988; JOLIVET, HENRY & LIVAGE, 2000; COSGROVE, 2005): i)

Interações de repulsão eletrostáticas (estabilidade eletrostática); ii) Interações de repulsão estérica; iii) Combinação de ambos os tipos de interações (estabilidade eletro-estérica)

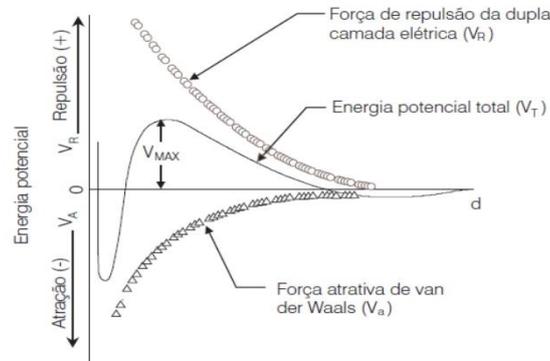


Figura 2.9. Ilustração do perfil das curvas de energia potencial (V_T) de interação entre duas partículas em função da distância (d) (JAFELICCI & VARANDA, 1999).

Um FM estabilizado por repulsão eletrostática proporciona a estabilidade coloidal pela presença de uma dupla camada elétrica que envolve a superfície das NPs (Fig. 2.10). (JUNIOR & VARANDA, 1999; COSGROVE, 2005; SOLER et al, 2012). No caso de NPs de óxido de ferro as cargas na superfície surgem devido aos grupos hidroxilas (LAURENT et al, 2008), isso ocorre, pois um equilíbrio tipo ácido-base se estabelece na interface entre as NPs e o líquido, além da adsorção de contra-íons provenientes da fase aquosa nessa interface. Portanto, as propriedades da dupla camada são muito influenciadas pelo pH, e também pela concentração e carga dos íons presentes no meio (JOLIVET et al, 2000). Quando duas NPs com potencial de mesmo sinal e magnitude se aproximam a interação produzida entre elas faz surgir uma barreira de potencial impedindo assim sua agregação (SOLER et al, 2012; MYERS, 1999).

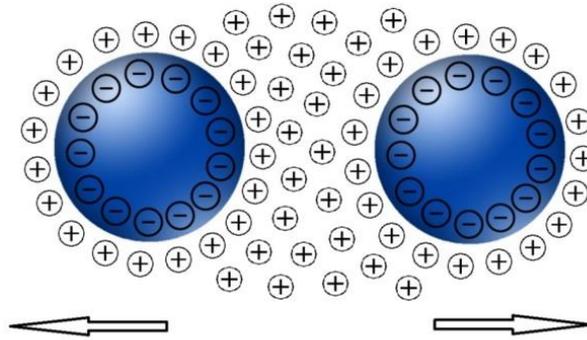


Figura 2.10. Ilustração representativa do mecanismo de estabilidade eletrostático.

A estabilização coloidal é obtida funcionalizando-se a superfície das NPs com moléculas ou polímeros que se estenderão em uma extensão que dependerá da sua afinidade com o meio de dispersão. Neste caso quando as NPs revestidas em uma suspensão coloidal se aproximam há repulsão por causa das cadeias das moléculas que foram adsorvidas na superfície (Fig. 2.11) (EVERSTE, 1988; LAURENTE et al, 2008; SOLER et al, 2012). Após a dispersão das NPs modificadas pela adsorção dessas espécies em um dispersante adequado para as moléculas adsorvidas ocorre a solvatação das cadeias das moléculas nas regiões próximas à superfície (ODENBACH, 2003). Quando ocorre a interpenetração entre as cadeias de moléculas devido à aproximação entre as NPs, elas se repelem devido aos efeitos osmóticos e entrópicos, Fig. 2.11. O efeito osmótico é causado pelo aumento da pressão osmótica na região entre as partículas devido ao aumento da concentração local das espécies adsorvidas. Já o efeito entrópico é causado pela redução da entropia conformacional das moléculas quando estas são submetidas ao espaço restrito entre duas partículas. Tais efeitos resultam numa barreira energética que impede ou dificulta a aproximação das NPs de modo a prevenir a agregação das mesmas (MYERS, 1999).

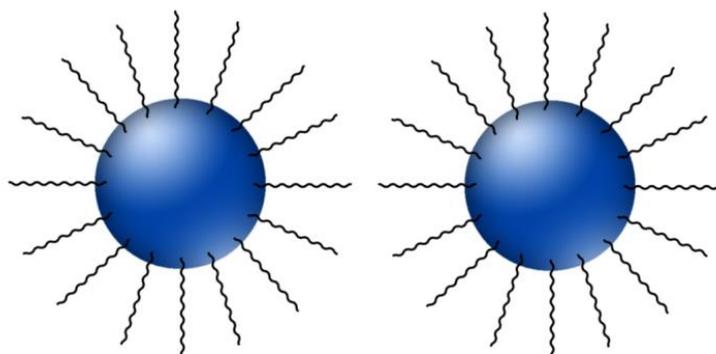


Figura 2.11. Ilustração esquemática do mecanismo de estabilização estérica.

A estabilização eletro-estérica ocorre em FM constituídos por NPs que possuem polieletrólitos ou moléculas polifuncionais adsorvidas na superfície das NPs (GUPTA e GUPTA, 2005, SOLER et al, 2012). Os grupos funcionais que estão orientados para a dispersão promovem uma densidade de carga na superfície da partícula tornando-a sensível a variações do pH no meio. Portanto, a estabilidade das suspensões coloidais depende da natureza e concentração dos ligantes e do pH (FAUCONNIER et al, 1999). Na superfície de uma NP a densidade de cargas está relacionada à ionização dos grupos funcionais livres, além de influenciar o aumento do valor de pH acima do pKa desses grupos (FAUCONNIER et al, 1999; ROGER, PONS & MASSART, 1989).

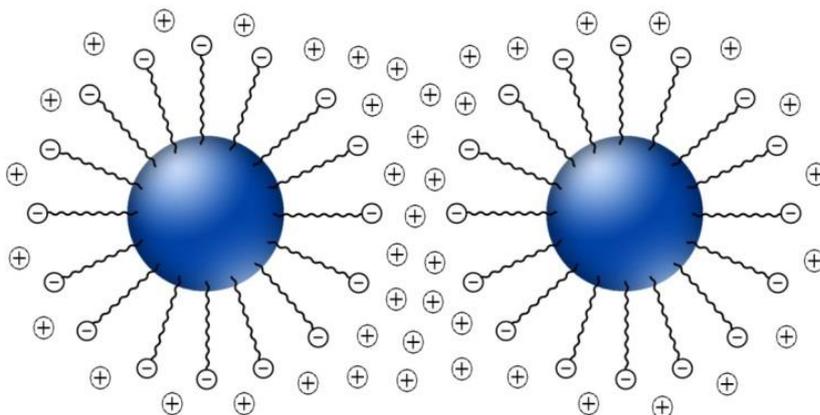


Figura 2.12. Ilustração esquemática do mecanismo de estabilização eletro-estérica entre duas NPs revestidas com ligantes polifuncionais.

Capítulo 3

Procedimentos Experimentais

Os componentes empregados na deposição dos nanocompósitos foram sintetizados ou preparados em uma primeira etapa e caracterizados. Após a síntese, os FMs foram caracterizados empregando-se diversas técnicas, de forma a determinar o tamanho, o formato, a distribuição de tamanho, a composição e a carga das NPs. As técnicas empregadas para a caracterização das partículas coloidais foram a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL), Espectroscopia Raman, medidas de absorvância no espectro UV-vis e Espectroscopia de Absorvância no Infravermelho (FTIR). Em seguida, o coloide foi empregado como fonte de partículas para a deposição dos NCs por meio da técnica LbL. Inicialmente foi feito um estudo para determinar o protocolo de deposição das multicamadas. O monitoramento do crescimento dos NCs foi realizado por meio de medidas de absorvância no espectro UV-vis a cada bicamada depositada. A morfologia da superfície e as propriedades estruturais dos NCs foram estudadas por meio das técnicas de MFA e MEV. O estudo da citotoxicidade dos NCs foi realizada *in vitro* empregando-se células de glândula mamária da linhagem de células tumorais (MCF-7), por meio de ensaio empregando o protocolo MTT (Brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio). As células foram encubadas na superfície dos NCs e, após 24h foi obtida a viabilidade das células expostas. A Figura 3.1 apresenta um esquema das técnicas de caracterização empregadas para as análises dos FMs e dos NCs.

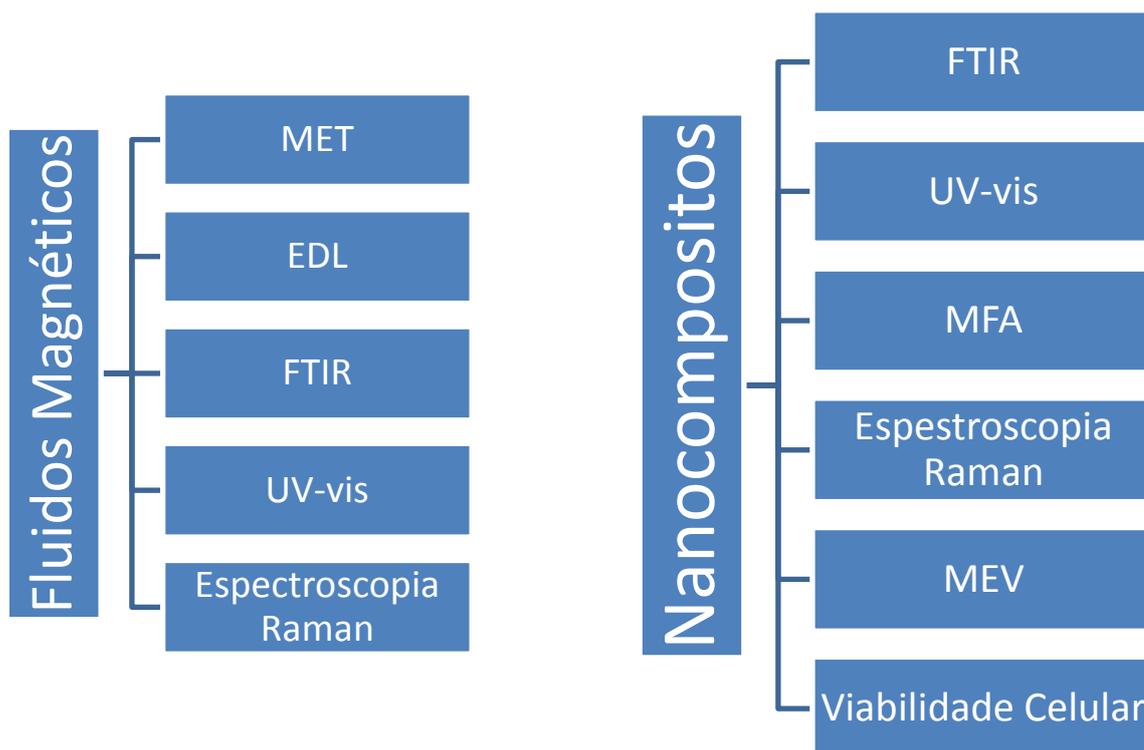


Figura 3.1. Ilustração esquemática das técnicas empregadas na caracterização dos FMs e dos NCs LbL.

3.2 Materiais

Todos os reagentes empregados neste trabalho como o ácido acético glacial (CH_3COOH), ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), ácido Clorídrico (HCl), ácido Nítrico (HNO_3), ácido perclórico (HClO_4), ácido Sulfúrico (H_2SO_4), cloreto de ferro (II) tetra hidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), cloreto de ferro (III) hexa hidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), cloreto de sódio anidro (NaCl), etanol adsoluto ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), éter de petróleo, hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de amônia (NH_4OH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), metanol (CH_3OH), PVA, Pluronic F127, nitrato ferrico ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$), solução de cloreto de ródio (RhCl_3) e sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) são de grau analítico (P.A.), foram adquiridos da Sigma Aldrich, Brasil, e utilizados

como foram fornecidos. Em todos os experimentos foi utilizada água deionizada, provida pelo sistema Mili-Q (resistividade de $18 \text{ M } \Omega \text{ cm}^{-1}$).

A solução de PBS (*phosphate buffer saline*) preparada com 137 mmol.L^{-1} de NaCl, $2,7 \text{ mmol.L}^{-1}$ de KCl, 10 mmol.L^{-1} de Na_3HPO_4 e $1,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ de KH_2PO_4 para 1L de solução concentrada 1x. Os substratos de vidro óptico BK7 foram funcionalizados. A solução do polímero PVA foi preparada com concentração de 1 mg/mL^{-1} , enquanto o polímero F127 foi preparado nas seguintes concentrações 1, 20 e 50 mg/mL^{-1} , em água deionizada. O óxido de grafeno foi fornecido pelo Professor Leonardo Giordano Paterno, Laboratório de Polímeros (LabPol), (Instituto de Química, Universidade de Brasília) e foi utilizado sem modificações.

A análise de toxicidade foi realizada em placas com 96 poços por meio do protocolo MTT. Após a incubação, as amostras foram analisadas no espectrofotômetro Spectra Max M2, comprimento de onda 595 nm, e empregando-se o software Softe Max M2, no Laboratório de Genética e Morfologia (Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília).

3.3 Preparação dos compósitos

3.3.1 Síntese dos FMs

O FM (cit-mgn), coberto com citrato neste trabalho foi sintetizado conforme o procedimento apresentado na Fig. 3.2. O processo de síntese foi realizado seguindo-se as etapas: as soluções aquosas de cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) com concentração $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e cloreto ferroso ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) concentração $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ foram gotejadas na solução de

hidróxido de sódio (NaOH), concentração 400 mmol.L⁻¹, sob agitação e à temperatura ambiente. Houve formação de um precipitado escuro, indicando a formação das NPs de magnetita. Em seguida a solução foi deixada em decantação magnética, foi lavada com água deionizada e novamente separada por decantação magnética. Ao corpo de fundo, foi adicionada sob agitação, a solução de ácido cítrico 0,05 mol.L⁻¹, pH 5,5. Após a adição do ácido cítrico a suspensão foi centrifugada (4.000 RPM durante 5 minutos) para a remoção dos agregados maiores. Em seguida a suspensão foi dialisada, utilizando-se membrana de celulose, com porosidade de 25Å por 24 horas em água deionizada sob agitação. As membranas de diálise permitem que as moléculas de citrato que não se ligaram às NPs passem do meio interno ao externo pelos poros da membrana. O pH da suspensão estoque foi ajustado para pH 6,9. Para utilização, o pH foi ajustado para 3,7 empregando soluções de NaOH (1 mol.L⁻¹) e HCl (1 mol.L⁻¹). Na sequência, foi separada uma alíquota de FM [cit-mgn] para liofilização. As amostras secas foram empregadas para a realização de análises Raman e FT-IR. A liofilização foi realizada no equipamento Liofilizador L101 (Liobras, São Carlos, São Paulo, Brasil), no laboratório de Toxicologia (Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília).

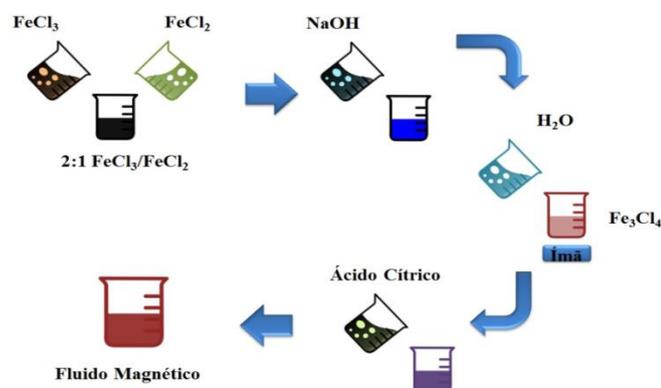


Figura 3.2. Ilustração do processo de síntese das NPs de magnetita por meio do método de coprecipitação.

A amostra de FM contendo NPs de maguemitita funcionalizadas com citrato de ródio (II), foram fornecidas por Matheus Oliveira da Silva sob orientação do Professor Aparecido Ribeiro de Souza. Em uma primeira fase é necessário a obtenção de uma solução contendo íons acetato como ligantes equatoriais, sendo obtidos através do composto acetato de ródio (II), $[\text{Rh}_2(\text{ac})_4]$ (REMPEL, 1972). Já na segunda fase conforme a ilustração da Fig. 3.3, os íons acetato são trocados por íons trifluoroacetato para formar o trifluoroacetato de ródio (II), $[\text{Rh}_2(\text{tfa})_4]$, preservando a estrutura (BEAR, KITCHENS & WILLCOTT, 1971). Na última fase os íons trifluoroacetatos são trocados por íons citrato para formação do citrato de ródio (II).

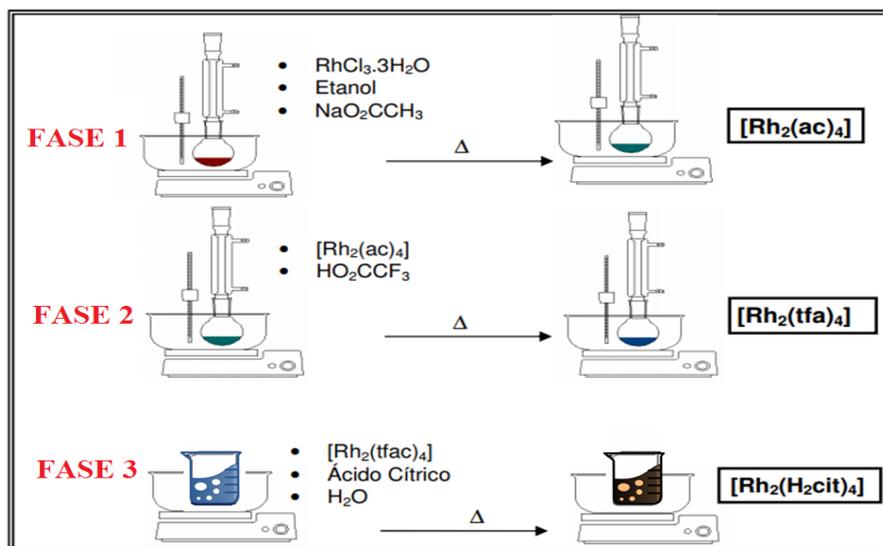


Figura 3.3. Ilustração da rota de síntese para a obtenção do citrato de ródio (II). Adaptação de Nunes, 2014b.

O FM de NPs de maguemitita funcionalizadas com citrato de ródio II foi preparado por meio do método de coprecipitação. Após a coprecipitação das NPs de magnetita, o sólido foi suspenso em meio aquoso com pH ajustado para 3 com HCl concentrado. A suspensão foi mantida com borbulhamento de oxigênio por 5 horas. Após esta etapa, observou-se que a coloração das NPs mudou de preta para marrom avermelhado, indicando a oxidação da

magnetita para maguemitita. Após centrifugação (3.000 RPM) para remoção de aglomerados, o FM de maguemitita foi dialisado por 24 horas e posteriormente estocado. A funcionalização com citrato de ródio II foi realizada misturando a solução obtida de citrato de ródio (II) após as três fases indicadas na Fig.3.3. Em seguida a dispersão foi centrifugada e as NPs sedimentadas foram submetidas a processos de lavagem. Posteriormente o pH do FM denominado (cit-mag-ro) foi ajustado para 7 com solução diluída de NaOH 1 mol.L⁻¹ (NUNES et al, 2014b).

3.4 Deposição de NCs LbL

Foram automontados dois tipos de NCs, o de F127 com NPs de magnetita funcionalizadas com ácido cítrico (F127/cit-mgn) e o de PVA com NPs de maguemitita funcionalizadas com citrato de ródio II (PVA/(cit-mag-ro)). Os nanocompósitos preparados, variando-se o número de bicamadas, foram caracterizados por meio das seguintes técnicas apresentadas na introdução deste capítulo. Os substratos foram limpos e funcionalizados, para que a superfície dos mesmos apresentem cargas superficiais negativas.

Os NCs foram depositados em substratos de vidro óptico BK7 de dimensões (10 mm x 25mm x 1mm) – fornecidos por Lentes Componentes Ópticos. A funcionalização dos substratos foi realizada seguindo-se o protocolo apresentado por Paterno e colaboradores (2009b), por meio das etapas: imersão dos substratos em solução piranha (H₂SO₄/H₂O₂, 3:1 v/v), para remoção de resíduos orgânicos, e em seguida lavagem 5 vezes com água deionizada (H₂O d.i.). Na segunda etapa os substratos foram tratados com solução de RCA (H₂O/H₂O₂/NH₄OH, 5:1:1 v/v), deixando sob aquecimento à 70° C graus, por 30 minutos, lava-se com H₂O d.i. 5 vezes, resultando em substratos com cargas negativas. Em seguida,

foram depositadas por LbL 5 bicamadas de hidrocloreto de poli (dialil dimetilamônio) (PDAC) com pH 6,3 e óxido de grafeno (GO) com de pH 10,3 para completar a funcionalização dos substratos (GROSS et al. 2014).

Os NCs com Pluronic F127 foram preparados variando-se a concentração (1, 20 e 50 mg/mL) da solução polimérica com pH 6,9. Inicialmente, foi realizado um estudo para determinar o tempo de imersão do substrato nas soluções poliméricas e FMs com base nos espectros de UV-vis obtidos a cada bicamada depositada. Os NCs com PVA foram obtidos com o concentração de 1 mg/mL e pH igual a 6,9. Nestes primeiros estudos foi utilizado apenas o FM formado por NPs funcionalizadas com ácido cítrico com pH 3,7. A montagem dos NCs camada-por-camada foi realizada seguindo-se as etapas:

- 1) Imersão do substrato limpo, funcionalizado e seco na solução polimérica, pH 6,9 (F127 ou PVA);
- 2) Imersão do substrato em solução aquosa pH 6,9;
- 3) Secagem da monocamada;
- 4) Imersão do substrato na suspensão coloidal, pH 3,7 (cit-mgn ou cit-mag-ro);
- 5) Imersão dos substratos em solução aquosa pH 3,7;
- 6) Secagem;

Após a realização das estas etapas 1) a 6) obtêm-se uma bicamada, cuja repetição leva à deposição das estruturas da espessura desejada, variando-se o número de bicamadas. Foram depositadas três séries de NCs com o F127 denominadas como: (F127-1/cit-mgn) n , (F127-20/cit-mgn) n e (F127-50/cit-mgn) n , onde o número após o F127 corresponde à concentração utilizada, e n se refere ao número de bicamadas, que variou de 1 a 30; No caso dos NCs com PVA a concentração foi igual a 1 mg/mL, variando-se o número de bicamadas de 1 a 30 (PVA/ cit-mgn) n .

3.5 Técnicas de caracterização

Neste capítulo será feita uma breve exposição das técnicas utilizadas para a caracterização dos FMs empregados e dos NCs produzidos.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) provê informações sobre a morfologia, diâmetro médio e dispersão de tamanho das NPs. No caso de NPs com formato esférico, os histogramas de tamanho são obtidos a partir da medida do diâmetro de NPs em imagens de MET. Para obter melhores resultados estatísticos, a quantidade de NPs mensuradas (n) deve ser próximo de mil. Para construir o histograma de distribuição de tamanho, o número de intervalo de tamanho (C) é dado por (SOLER et al. 2011):

$$C \cong 1 + 3,22 \times \log(n) \quad (3.1)$$

Os dados do histograma podem ser ajustados por meio da função log-normal, a partir da qual se obtém o diâmetro médio e o desvio padrão (POPPLEWELL & SAKHNINI, 1995):

$$P(D) = \frac{1}{D\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{\ln\left(\frac{D}{D_{\text{méd}}}\right)^2}{2\sigma^2}} \quad (3.2)$$

onde $P(D)$ é a função log-normal, σ é o desvio padrão do diâmetro (dispersão) e $D_{\text{méd}}$ é o diâmetro médio.

As imagens de MET das NPs foram obtidas diluindo-se uma amostra de FM (1:100), gotejadas em telas de 300 meshes, analisadas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1011 no Laboratório de Microscopia Eletrônica, CEL, IB, Universidade de Brasília. O diâmetro das NPs foi medido utilizando-se o *software* Image-J a partir de várias imagens MET.

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (EDL) permite a obtenção do diâmetro hidrodinâmico (D_H), que fornece informações sobre agregados presentes no FM. O D_H engloba a cobertura presente na superfície das NPs, bem como a sua interação com o meio. O potencial ζ permite analisar a estabilidade do FM, para que o mesmo seja considerado estável, o valor absoluto do potencial ζ deve ser maior ou igual a ± 30 mV. Ambos experimentos foram realizados no equipamento (Zetasizer Nano Z90 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido), com excitação em 632,8nm) no Laboratório de Genética e Morfologia (Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília).

No experimento EDL, um feixe de luz monocromático incide na amostra e é espalhado em várias direções, de modo que o detector coleta a luz espalhada em um ângulo de θ com relação ao feixe incidente. Devido ao movimento Browniano (aleatório), das NPs monodispersas e diluídas é possível extrair o coeficiente de difusão translacional, D_T . Considerando-se as partículas esféricas e não permeáveis ao solvente, usa-se a equação de Stokes-Einstein para o cálculo do diâmetro hidrodinâmico das NPs em equilíbrio térmico com o dispersante:

$$D_{ef} = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_T} \quad (3.3)$$

Sendo k_B a constante de Boltzmann, T a temperatura em Kelvin e η a viscosidade do solvente. (MONOPOLI et al, 2012 e WELCH et al, 2015).

O potencial Zeta (ζ) é obtido por meio da técnica de eletroforese, por meio da interação entre a carga superficial das NPs e um campo elétrico aplicado no meio aquoso. No campo elétrico, cada NP e os íons mais fortemente ligados se movem como uma unidade, e o potencial no plano de cisalhamento entre essa unidade e o meio circundante é chamado potencial ζ . Tal potencial reflete a carga superficial efetiva das NPs, logo se correlaciona com a repulsão eletrostática entre elas e com a estabilidade da suspensão (CLOGSTON, 2011). O

potencial ζ é calculado empregando a equação de Henry (HUNTER, 1981),

$$\zeta = \frac{U_E 3\eta}{2\epsilon_d f(ka)} \quad (3.4)$$

onde, ζ é o potencial zeta, U_E é a mobilidade eletroforética, η é a viscosidade do dispersante, ϵ_d é a constante dielétrica do dispersante e $f(ka)$ é a função de Henry, sendo utilizado o valor de 1,5 proporcionado pela aproximação de Smoluchowski.

onde, ζ é o potencial zeta, U_E é a mobilidade eletroforética, η é a viscosidade do dispersante, ϵ_d é a constante dielétrica do dispersante e $f(ka)$ é a função de Henry, sendo utilizado o valor de 1,5 dado pela aproximação de Smoluchowski.

O espectro no infravermelho (IV) é obtido a partir da absorção de fótons na região do infravermelho com energia igual à transição entre dois estados vibracionais da molécula (NAKAMOTO, 2009). Os modos mais simples de vibração de uma molécula, com IV ativo, são os modos de dobramento e estiramento. O espectro IR foi obtido no espectrômetro Vertex 70, Bruker Corporation (Instituto de Física, Universidade de Brasília). A medida de FT-IR foi realizada com a amostra dispersa em pastilhas de KBr, medindo-se a transmitância na faixa de 350 a 4000 cm^{-1} com 64 scans e resolução de 4 cm^{-1} .

A espectroscopia Raman é uma das técnicas mais empregadas no estudo dos materiais nanoestruturados, pois fornece informações como a simetria cristalina, arranjo atômico permitindo a identificação do material investigado (SHEBANOVA e LAZOR, 2003; SOLER 2012). O espalhamento de luz foi estudado por Smekal em 1923, e em 1928, este efeito foi observado por Sir Chandrasekara Venkata Raman, onde a luz espalhada por líquidos tais como benzeno continha picos laterais finos (bandas de espalhamento inelástico da luz por vibrações moleculares ou em cristais) e, portanto é chamado de efeito Raman (COLTHUP, 2012). A técnica de espalhamento Raman é não destrutiva, permite o estudo de estruturas sob

diferentes condições, em geral, não requer preparação da amostra e a análise dos resultados pode ser obtida de forma quantitativa e/ou qualitativa.

O espalhamento elástico, chamado de Rayleigh, é considerado intenso e possui a mesma frequência do feixe incidente ν . O espalhamento Raman é extremamente fraco, com intensidade da ordem de 10^{-5} da luz incidente (FERRARO et al, 2002). As bandas Raman que possuem frequências menores que as da radiação incidente ($\nu - \nu_i$) são denominadas Stokes. As bandas com maior frequência do que a da radiação incidente ($\nu + \nu_i$) são denominadas de bandas Anti-Stokes. A Fig. 3.4 apresenta o espalhamento Raman e o espalhamento Rayleigh. (SKOOG et al, 2002; FERRARO et al, 2002).

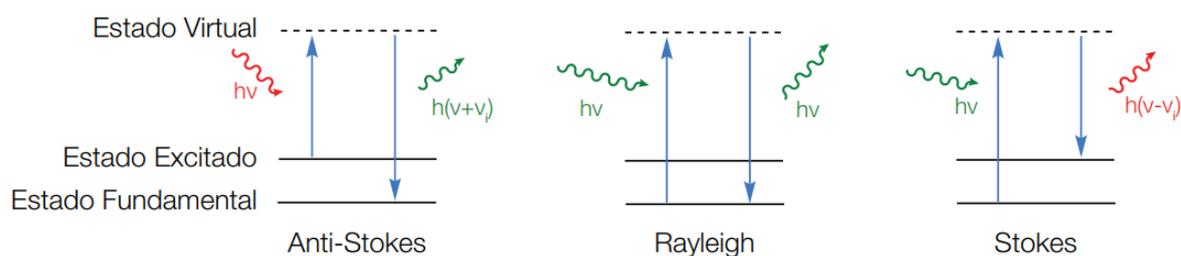


Figura 3.4. Mecanismo de origem dos espalhamentos Raman Stokes, Anti-Sokes e Rayleigh.

Neste trabalho, as NPs funcionalizadas com citrato ou citrato de ródio II foram analisadas por espectroscopia Raman, cujos espectros foram adquiridos no espectrômetro triplo T64000 com CCD, o laser incidente foi de íon-argônio (comprimento de onda 535,5nm, intensidade do feixe incidente na amostra igual a 0,25mW). Também foram obtidos espectros Raman dos NCs depositados em substratos Bk7 recobertos com uma fina camada de ouro.

A espectroscopia no ultravioleta e visível (UV-vis) é uma técnica muito empregada no estudo de compostos orgânicos e inorgânicos, por exemplo, para a identificação do princípio ativo de fármacos, bem como para monitorar o crescimento de nanoestruturas. A espectroscopia UV-vis pode ser realizada considerando-se a absorção ou transmitância de um

feixe de luz, com variação de frequência (ν) variando o comprimento de onda entre a faixa do visível, do ultravioleta e do infravermelho próximo. Os elétrons podem ser promovidos a níveis de energia mais elevados mediante a absorção de energia. Tais transações eletrônicas geram uma banda na curva de absorbância (A), fornecendo uma correlação com a concentração de material absorvedor, dada pela lei de Beer-Lambert (KHOSHTARIYA et al, 1991).

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = kcb \quad (3.5)$$

Onde, I_0 é a intensidade do feixe luminoso que incide na amostra e I é a intensidade após atravessar a amostra, k é a constante de absorvidade molar, b é a espessura da amostra e c é a concentração da amostra absorvedora. O crescimento dos NCs pode ser monitorado por meio da banda de absorbância nos comprimentos de onda entre 380nm e 480nm, características do óxido de ferro (SCHWERTMANN, 2008). Os espectros UV-vis foram obtidos no espectrofotômetro UV-vis UV-2600, (Shimadzu Corporation – Quioto, Japão), no laboratório do Instituto de Física (Universidade de Brasília).

A microscopia de força atômica (MFA) faz parte de um grupo de instrumentos denominados de microscopia de varredura por sonda. Por meio desta técnica pode se obter a morfologia da superfície de nanoestruturas (STAMOULI et al, 2004). As imagens de MFA foram obtidas no modo *tapping*, considerado o mais adequado para o estudo da morfologia da superfície dos NCs LbL, pois oferece também informações sobre as propriedades mecânicas da amostra. As variações do ângulo de fase resultam de diferenças na interação da ponta da agulha com a superfície da amostra que apresenta regiões macias e duras (ALCANTARA, 2013). A varredura da amostra é realizada pela sonda na ordem de ângströms da superfície da amostra em análise, fornecendo informações para o equipamento com uma alta resolução espacial, lateral e vertical da superfície (BINNING et al, 1986). O equipamento utilizado para

análise de MFA foi o modelo Digital MultiMode Nanoscope, IIIa, do Instituto de Física da Universidade de São Paulo – *Campus* São Carlos em São Paulo. Foram obtidas imagens de topografia, a partir das quais empregando o software do equipamento se obtém a rugosidade. Em adição também foram realizadas medidas de espessura das amostras, seguindo o protocolo desenvolvido por Lobo e colaboradores (1999). As amostras analisadas estão listadas na Tab. 3.1.:

Tabela 3.1. Relação de NCs que foram analisados por MFA.

Número de Bicamadas	Substrato
	BK7
Controle (LL)	Lâminas Limpas
1	(PVA/cit-mag-ro) ₁
3	(PVA/cit-mag-ro) ₃
5	(PVA/cit-mag-ro) ₅
7	(PVA/cit-mag-ro) ₇
9,5	(PVA/cit-mag-ro) _{9,5}
10	(PVA/cit-mag-ro) ₁₀

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para obter imagens de superfície dos NCs preparados por LbL empregando-se o microscópio eletrônico de varredura modelo JEOL JSM-700IF, do Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade de Brasília. Após a construção dos NCs, a superfície foi metalizada com uma fina camada de ouro. A relação de amostras investigadas está apresentada na Tab. 3.2.

Tabela 3.2. Relação de NCs que foram analisados por MEV.

Número de Bicamadas	Substrato
	BK7
Controle (LL)	Lâminas Limpas
1 mono	PVA ₁
3	(PVA/cit-mag-ro) ₃
5	(PVA/cit-mag-ro) ₅
7	(PVA/cit-mag-ro) ₇
9,5	(PVA/cit-mag-ro) _{9,5}

3.6 Estudo de Viabilidade Celular

O estudo de viabilidade celular foi realizado por meio do protocolo MTT, conhecido como (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide), em placas de 96 poços que abrange a análise simultânea de grande quantidade de amostras. Para cada grupo, foram incubadas 4 lâminas com células (quadruplicata) e 1 com meio de cultura o controle das amostras. O protocolo MTT (Invitrogen), baseia-se na análise da redução do reagente MTT em formazan, pela ação de desidrogenases mitocondriais. Um indicativo da viabilidade celular é a presença destas enzimas ativas. Com a redução do MTT, ocorre a formação de cristais de corante roxo formazan, sendo quantificados pela técnica de espectofotometria (HUSSAIN et al., 1993). Uma das linhagens de células escolhidas para este trabalho foi a de células tumorais MCF-7 de adenocarcinoma mamário. Tais células são amplamente utilizadas como modelo de estudo de câncer de mama, consideradas resistentes a uma variedade de fármacos e não expressam caspases-3 (SIMSTEIN et al., 2003; JÄNICKE, 2009), considerado

um gene correspondente codificador de uma proteína que é membro da família das proteases de cisteína. A ativação sequencial das caspases desempenha um papel central na fase de execução da apoptose celular (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998).

Inicialmente as células foram incubadas durante de 24 horas com DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life USA*), suplementado com soro fetal bovino (STB) 10% e antibióticos (Penicilina/Estreptomicina) 1%, em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ com pH 7.2. O experimento foi realizado em quadruplicata nas quantidades de bicamadas predeterminadas (Tab. 3.3) em substrato de vidro de 15mm de diâmetro limpos; e os NCs (PVA/cit-mag-ro)_n. Em seguida o meio foi substituído por uma solução contendo 0,5mg/mL de MTT (5 mg/mL em 0,15 mol.L⁻¹ de PBS (*Phosphate Buffered saline*: NaCl 137 mmol.L⁻¹, KCl 2,7 mmol.L⁻¹, Na₂HPO₄ 10 mmol.L⁻¹; KH₂PO₄ 2 mmol.L⁻¹; pH 7,4). Para a análise da viabilidade celular foi retirado o MTT e adicionado o DMSO (dimetilsulfóxido) para realizar leitura empregando-se o espectrofotômetro Spectra Max M2, com comprimento de onda de 595 nm, do Laboratório de Genética e Morfologia – GEM (Instituto de Biologia, Universidade de Brasília).

Tabela 3.3. Relação de substrato para o controle (lâminas limpas e com os NCs (PVA/cit-mag-ro)₃, (PVA/cit-mag-ro)₁₀, que foram empregados para o estudo da viabilidade celular.

Número de Bicamadas	Substrato
	BK7
Controle (LL)	Lâminas Limpas
3	(PVA/cit-mag-ro) ₃
10	(PVA/cit-mag-ro) ₁₀

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos com a caracterização dos fluidos magnéticos empregados como fonte de NPs para preparação dos NCs, obtidos pela técnica de automontagem, tendo como componentes NPs de magnetita e maguemita e os biopolímeros PVA e F127, serão apresentados e discutidos neste capítulo. O monitoramento do crescimento dos NCs foi realizado a partir dos dados de UV-vis, a presença do óxido de ferro e a identificação da fase foram observados nos espectros Raman obtidos dos NCs. A morfologia da superfície dos NCs foi investigada por meio de imagens de MFA e de MEV. Em adição, também foram realizados testes de citotoxicidade *in vitro* em células tumorais.

4.1 Caracterização do FM

Os dados de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico (D_H) obtidos dos FMs empregados com NPs funcionalizadas com citrato (FM cit-mgn) e com citrato de ródio (II) (FM cit-mag-ro) em pH 7 e 3,7, estão listados na Tab. 4.1. Observa-se nos dados apresentados que o FM cit-mgn é estável, com potencial ζ igual a -47 e -29 mV, quando em pH 7 e 3,7, respectivamente; enquanto o D_H varia de 51 para 58 nm, respectivamente. No caso do FM cit-mag-ro, o potencial ζ variou de -35 para -29 mV, quando o pH da suspensão variou de 7 para 3,7, respectivamente, indicando que o FM é estável. Porém, os dados do tamanho hidrodinâmico mostram que houve formação de aglomerados, pois o D_H variou de 59 para

156 nm, após a diminuição do pH (MORAIS et al., 2006; CARNEIRO, 2011; NUNES et al, 2014b; CARNEIRO, 2011; NUNES et al, 2014a). Um ácido poliprótico, como o ácido cítrico pode doar mais que um próton. A perda de prótons ocorre em uma sequência de sucessivas desprotonações que são progressivamente menos favoráveis a cada desprotonação. Quando o ácido está em meio com pH superior ao valor de pK_a , ocorrerá a desprotonação, porém em solução com pH menor do que o pK_a , a molécula permanecerá protonada. Os valores de pK_a dos grupos ácido carboxílico da molécula de ácido cítrico ligados aos carbonos 1 a 3 da estrutura são: $pK_{a1} = 3,13$; $pK_{a2} = 4,76$; $pK_{a3} = 6,40$. Quando em pH 6,9 todos os grupos ácidos carboxílicos apresentam-se desprotonados porque o pH do meio é maior do que os valores de pK_a . Quando em pH 3,7 apenas um dos grupos de ácido carboxílico estará protonado, aquele com valor de $pK_{a1} = 3,13$, e este grupo poderá interagir com grupos aceitadores de prótons, formando a ligação de hidrogênio (SOUZA, 2016).

Tabela 4.1. Dados obtidos para as medidas de potencial zeta e D_H para as amostras empregadas.

Análises dos parâmetros	FM cit-mgn		FM cit-mag-ro	
	pH 7,0	pH 3,7	pH 7,0	pH 3,7
Potencial Zeta	-47 mV	- 29 mV	- 35 mV	- 29 mV
D_H	51 nm	58 nm	59 nm	156 nm

A Fig. 4.1 (a) mostra uma imagem típica obtida do FM cit-mgn, onde se observa NPs, em sua maioria com formatos esféricos. A Fig. 4.1 (b) apresenta o histograma de distribuição de tamanho obtido a partir de medidas diâmetros medidos em diversas fotomicrografias (~ 998 NPs). A linha em vermelho mostra o ajuste obtido com a função log normal, resultando no diâmetro médio (D_{TEM}) igual a $D_{TEM} = 5 \pm 0,1$ nm e dispersão $\sigma = 0,33$

$\pm 0,02$ nm, indicando que as partículas apresentam comportamento superparamagnético e são adequadas para aplicações biológicas. Pode-se observar pelo valor da dispersão de tamanhos obtidos das NPs que a amostra é polidispersa.

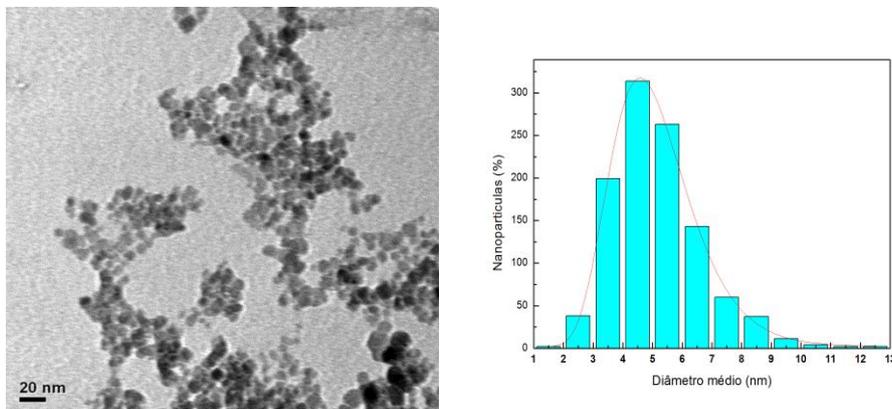


Figura 4.1. Imagem de MET típica da amostra de NPs de óxido de ferro funcionalizadas com citrato (a); e histograma de distribuição de tamanho obtido a partir de imagens de MET (b), onde a linha em vermelho representa o ajuste obtido com a função log normal.

A Fig. 4.2 (a), apresenta uma imagem MET típica obtida da amostra de FM cit-mag-ro, onde se observa NPs de formato predominante esférico. Com o ajuste obtido do histograma de tamanhos da amostra o diâmetro médio (D_{TEM}), foi igual a $D_{\text{TEM}} = 5 \pm 0,2$ nm e dispersão de tamanho $\sigma = 0,12 \pm 0,01$ nm.

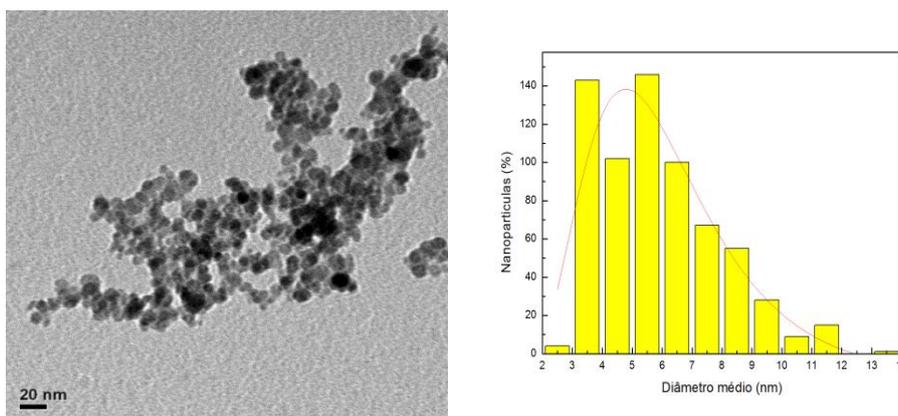


Figura 4.2. Imagem de MET típica da amostra de NPs de óxido de ferro funcionalizadas com citrato de ródio (II) (a); e histograma de distribuição de tamanho obtido a partir de imagens de MET (b), onde a linha em vermelho representa o ajuste obtido com a função log normal.

As Fig. 4.3 e 4.4 apresentam os espectros Raman de material liofilizado relativo às amostras (FM cit-mgn) e (FM cit-mag-ro), respectivamente. Os espectros foram obtidos à temperatura ambiente na região de 150 à 850 cm^{-1} e ajustados empregando-se funções lorentzianas. A intensidade do laser incidente foi igual a 0,25 mW, para evitar a degradação das amostras (SILVA et al., 2003; SOLER et al., 2004). Pode-se observar que o espectro ajustado mostra as bandas (Fig. 4.3a) para FM cit-mgn, centrados em 300, 352, 502, 649 e 722 cm^{-1} , correspondem aos modos vibracionais Raman característicos da magnetita, e o sinal observado em 200 cm^{-1} também pode ser atribuído à magnetita, considerada muito ruidosa, observa-se também que a amostra está levemente oxidada para maguemita, devido ao aparecimento da banda em 722 cm^{-1} . Na (Fig. 4.3b) observa-se o espectro da amostra de FM cit-mag-ro, que durante o processo de síntese sofreu uma etapa de oxidação, mostra três bandas largas centradas em 350, 500 e 700 cm^{-1} , correspondente aos modos vibracionais Raman característicos de maguemita, evidenciando o processo de oxidação intencional de magnetita para maguemita realizado.

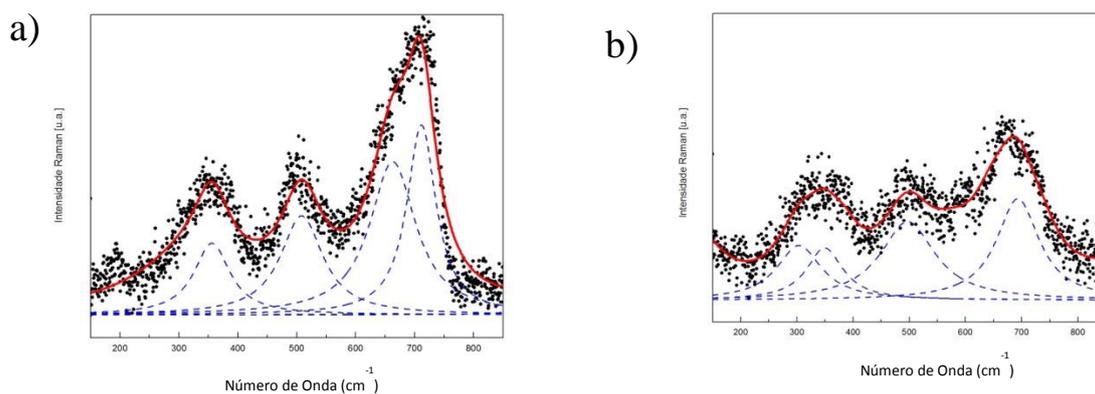


Figura 4.3. Espectro Raman típico da amostra de NPs de óxido de ferro cobertas por citrato (a) e com citrato de ródio (b), sob intensidade do laser 0,25mW, ajustado por meio de lorentzianas.

A amostra de FM cit-mgn foi caracterizada por meio da técnica de espectrometria no

IF, visando investigar a presença da cobertura e o cristal. A Fig. 4.4 (a) mostra o espectro no infravermelho na região de 400 a 4000 cm^{-1} , no qual se observam as bandas correspondentes aos óxidos de ferro, entre 400 e 600 cm^{-1} (445, 586) (VIALI, 2010), uma banda intensa em 3435 cm^{-1} correspondente ao estiramento da ligação $O - H$ indicando resquícios de água na amostra. A banda característica em 1700 cm^{-1} corresponde ao estiramento simétrico da ligação $C = O$ do grupo $-COOH$ dos ácidos carboxílicos está deslocada para 1614 cm^{-1} , o que indica a presença do grupo carboxilato $-COO-$ e segundo Racucui (2006) seria uma indicação da interação do grupo $-COO-$ com a superfície da nanopartícula. Considerando-se a diferença ($\Delta\nu$) entre a posição da vibração assimétrica e simétrica da ligação $C = O$ do grupo $-COO$, pode-se obter um indicativo do tipo de coordenação. Para as nanopartículas sintetizadas na presença de citrato, obteve-se deslocamento de $\Delta\nu = 233 cm^{-1}$ que sugere coordenação entre o carboxilato e os íons de ferro das nanopartículas do tipo monodentada (RAMIREZ-RIVERA, 2013).

O ácido cítrico e os complexos citrato de ródio (II) possuem grupos funcionais carboxila e hidroxila que podem se coordenar aos íons ferro da superfície do óxido de ferro. A Fig. 4.3b apresenta o espectro de infravermelho obtido da amostra FM cit-mag-ro liofilizadas onde se observa bandas da água adsorvida ($H - O - H$) em 3406 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} . Pode-se observar também as bandas características aos estiramentos assimétricos e simétricas dos grupos carboxilatos na região de 1720 cm^{-1} e 1400-1385 cm^{-1} , respectivamente (BELLAMY, 1975). As bandas presentes no espectro indicam funcionalização das NPs de maguemitita com citrato de ródio (II) (FAUCONNIER, 1996).

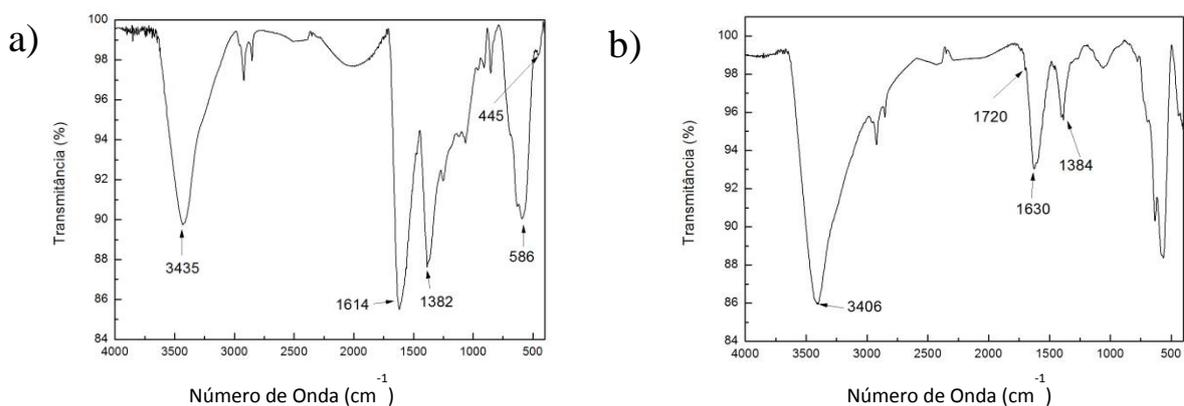


Figura 4.4. Espectro FT-IR típico da amostra de nanopartículas de óxido de ferro cobertas por citrato de ródio (II), em pastilha de KBr. O espectro de 400 a 4000 cm^{-1} . Em (a) FM cit-mgn e em (b) FM cit-mag-ro.

4.2 Monitoramento da deposição dos NCs

Os estudos preliminares da deposição de NCs automontados foram realizados empregando-se soluções de PVA e F127 com FM cit-mgn e analisados por meio da obtenção de espectros UV-vis na faixa de comprimento de onda de 300 à 800 nm, a cada bicamada depositada. Todos os espectros de UV-vis dos NCs foram obtidos em triplicata apresentando a média dos valores de intensidade de absorvância. Foi monitorada a intensidade relativa ao sinal característico dos óxidos de ferro nos espectros UV-vis, o qual pode ser detectado em um ou dois ombros em torno de 380, 480, ou 520 nm (SCHWERTMANN, 2008).

4.2.1 Estudo do tempo de imersão para os NCs com F127

Foi realizado um estudo para otimizar o tempo de imersão dos substratos nas dispersões coloidais e soluções poliméricas. Os tempos de imersão investigados foram: 1, 3,

5, 10 15, 20 e 30 min. Espectros UV-vis obtidos a cada bicamada depositada, para os tempos de imersão de 1, 3, 10 e 30 min do NC (F127-1/cit-mgn)_n, para n variando de 1 a 5 bicamadas, são apresentados na Fig. 4.5. Observa-se nos espectros, mesmo a partir da primeira bicamada um ombro em 380 nm, cuja intensidade será considerada para o monitoramento. Os painéis à direita da Fig. 4.5 mostram a intensidade obtida em 380 nm em função do número de bicamadas, obtidos dos espectros correspondentes, nos quais se observa um crescimento praticamente linear, conforme esperado para os sistemas LbL. São apresentados na Fig. 4.6 os dados da intensidade da absorbância em função do tempo de imersão obtidos dos espectros UV-vis do NC (F127-1/cit-mgn)₅, apresentados na Fig. 4.5. Observa-se na Fig. 4.6 que a intensidade aumenta com o número de bicamadas, estabilizando em um valor médio em torno de 0,14 ua. Porém o tempo de 10 min ficou fora do esperado, apresentando a maior intensidade. Os dados indicam que um tempo de imersão a partir de 10 min deve ser adequado.

A Fig. 4.7 apresenta os espectros UV-vis obtidos a cada bicamada depositada para os tempos de imersão de 1, 3, 10 e 30 min do NC (F127-20/cit-mgn)_n, n variando de 1 a 5 bicamadas. A intensidade dos ombros detectados em 380 nm em função do número de bicamadas é apresentada nos paines da direita, para cada tempo de imersão investigado. Observa-se nos painés da direita um crescimento linear do NC com o aumento de bicamadas. Observa-se na Fig. 4.8 que a partir de 5 min uma intensidade em torno de 0,14 ua., indicando um tempo de imersão suficiente da ordem de 5 min.

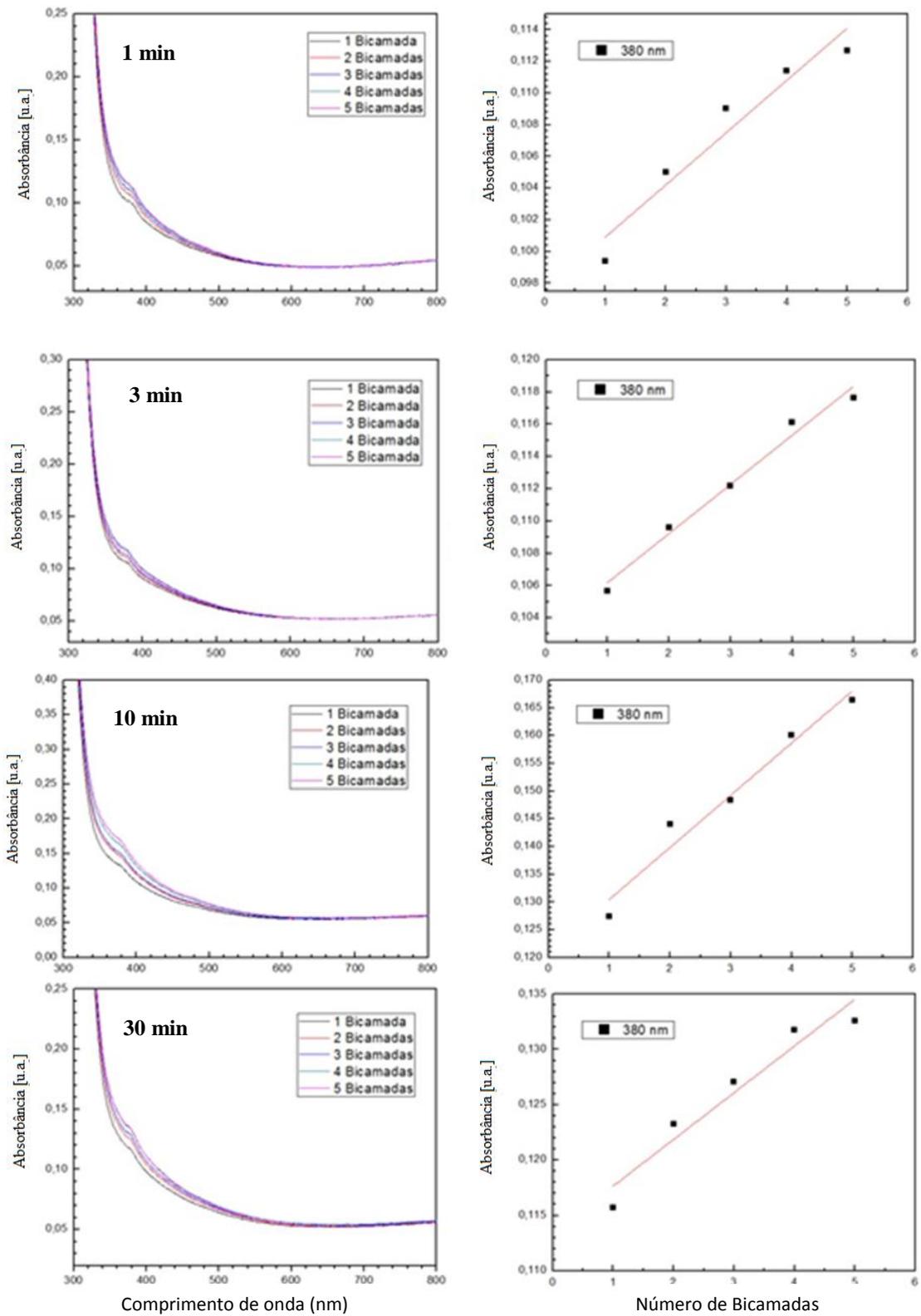
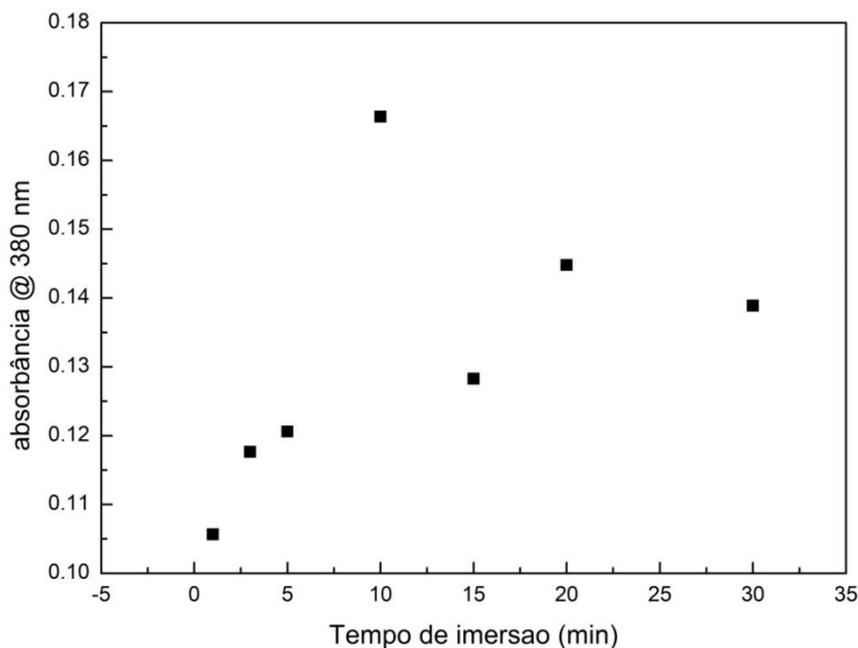


Figura 4.5. Espectros de UV-vis do NC (F127-1/cit-mgn)_n, com n variando de 1 a 5 bicamadas, para os tempos de imersão de 1, 3, 10 e 30 min. No painel à direita, tem-se a intensidade da absorbância em 380 nm em função do número de bicamadas.



4.6. Intensidade da absorbância @ 380 nm em função do tempo de imersão para o NC (F127-1/cit-mgn)₅.

Observa-se na Fig. 4.9 os espectros UV-vis obtidos a cada bicamada depositada para os tempos de imersão de 1, 3, 15 e 30 min do NC (F127-50/cit-mgn)_n, n variando de 1 a 5 bicamadas, e respectivo ombro característico da presença das IONs no NC. A intensidade em 380 nm em função do número de bicamadas, é apresentada nos paines da direita, para cada tempo de imersão.

Observa-se na maioria dos casos dos painés da direita um crescimento linear do NC com o aumento de bicamadas (Fig. 4.9). A intensidade da absorbância em 380 nm em função do tempo de imersão para a amostra (F127-50/cit-mgn) é mostrada na Fig. 4.10. Observa-se que o tempo de 3 min parece ser suficiente para atingir um valor de intensidade de absorbância 380 nm próximo ao valor médio que se obteria na faixa de 1 a 20 min. Nota-se que no caso de maiores concentração do copolímero (F127-20/cit-mgn) e (F127-50/cit-mgn) foi possível fazer a automontagem e a confirmação da presença das IONs no NC, obtendo-se assim NCs com sítios hidrofóbicos adequados para o ancoramento de fármacos ou fotossensibilizadores.

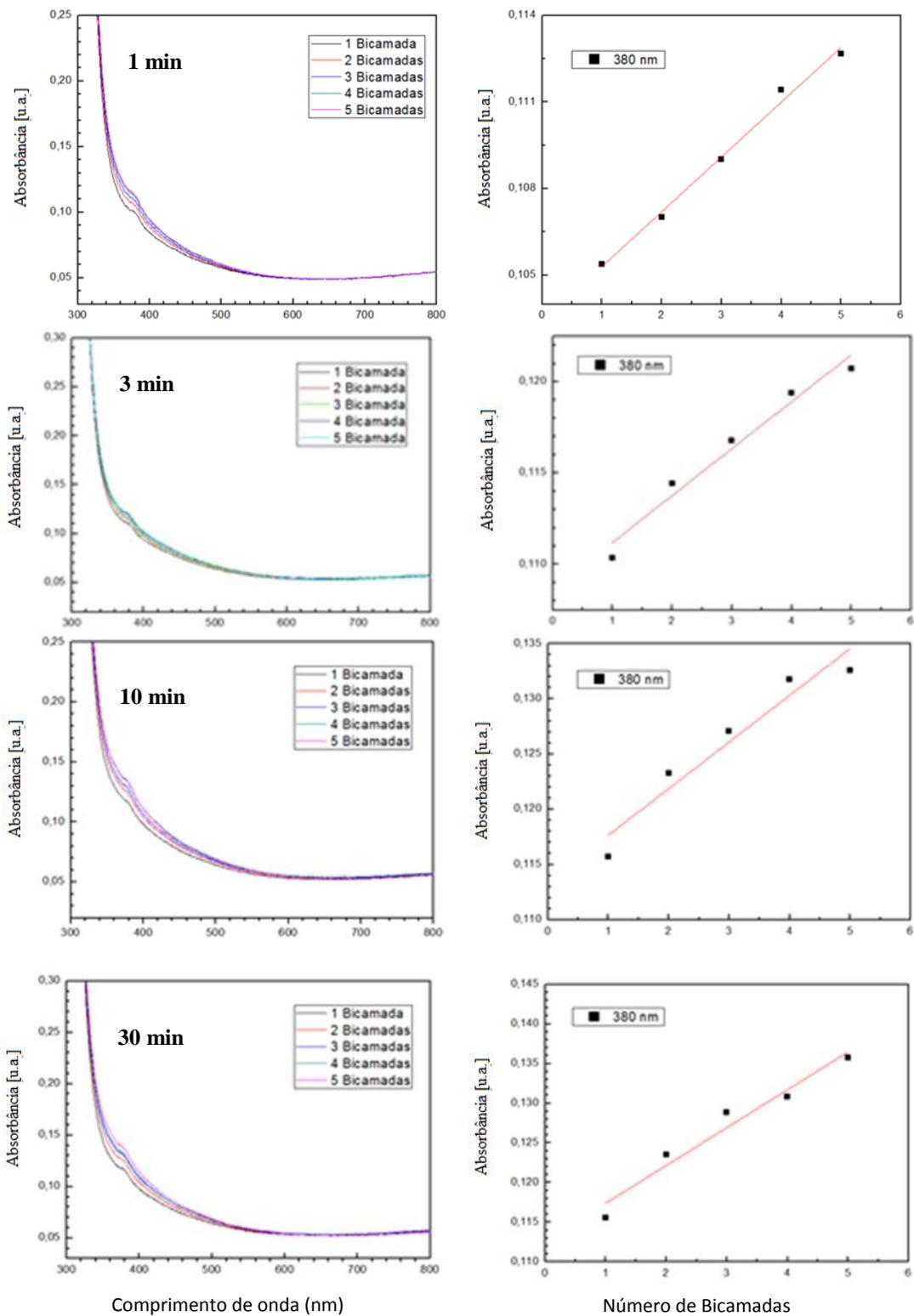


Figura 4.7. Espectros de UV-vis do NC (F127-20/cit-mgn)_n, com n variando de 1 a 5 bicamadas, para os tempos de imersão de 1, 3, 10 e 30 min. No painel à direita, tem-se a intensidade da absorvância em 380 nm em função do número de bicamadas.

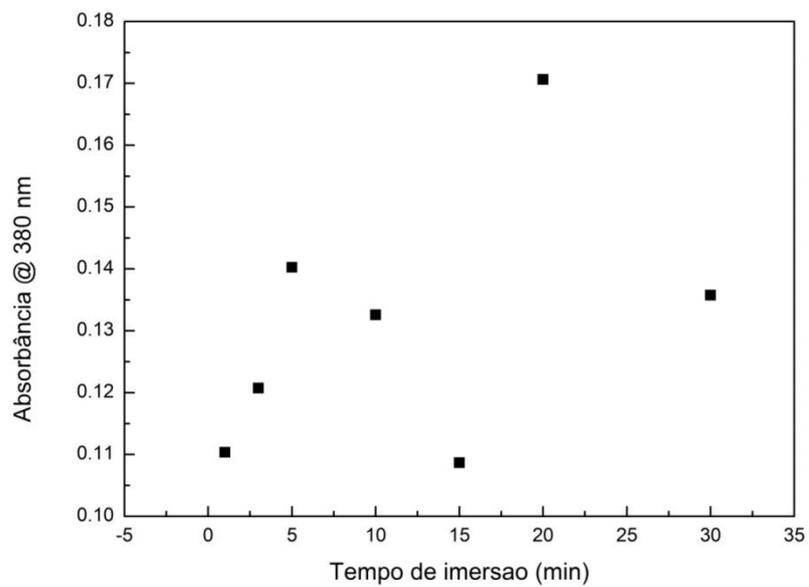


Figura 4.8. Intensidade da absorbância @ 380 nm em função do tempo de imersão para o NC (F127-20/cit-mgn)₅.

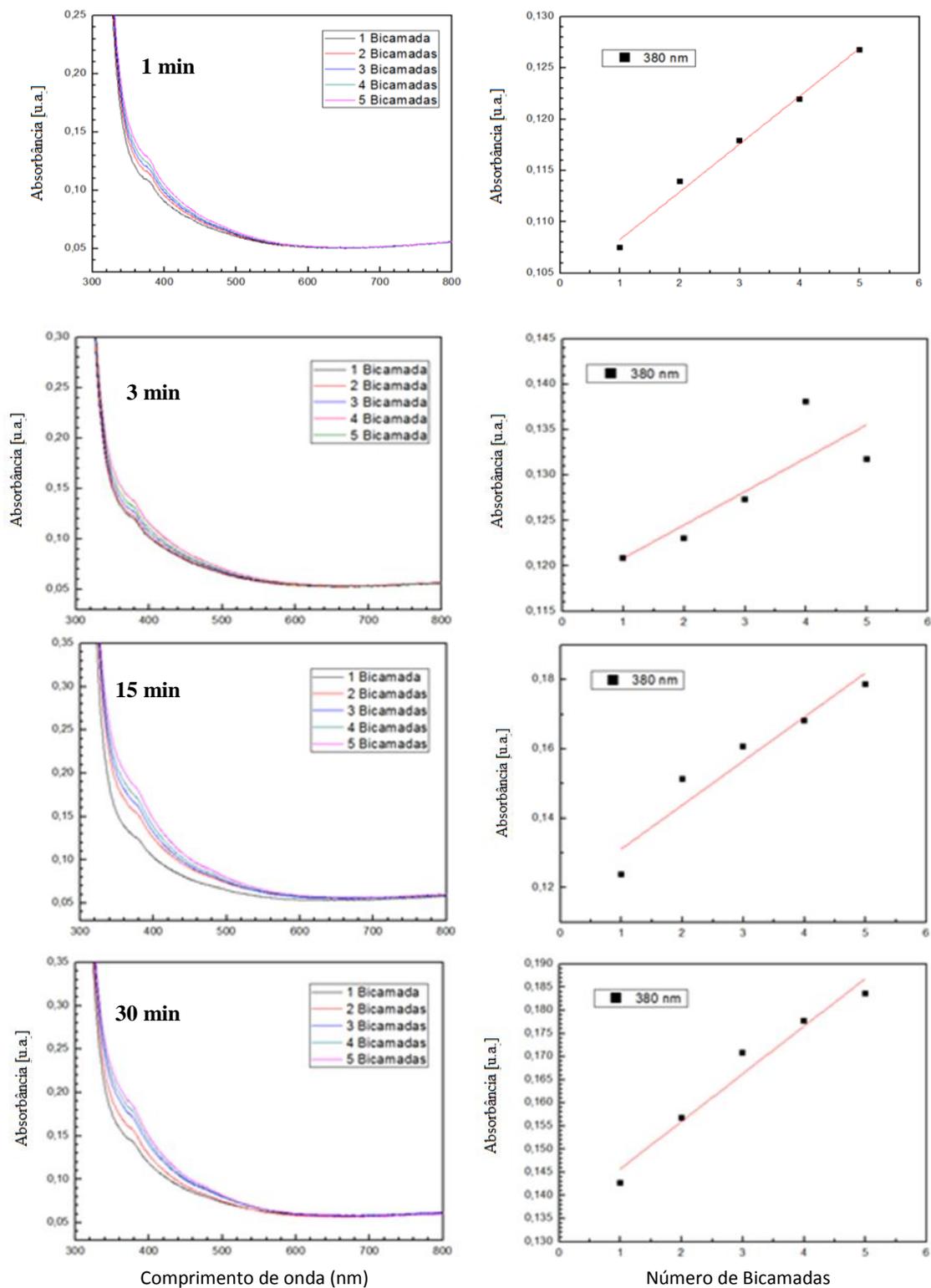


Figura 4.9. Espectros de UV-vis do NC (F127-50/cit-mgn)_n, com n variando de 1 a 5 bicamadas, para os tempos de imersão de 1, 3, 15 e 30 min. No painel à direita, tem-se a intensidade da absorbância em 380 nm em função do número de bicamadas.

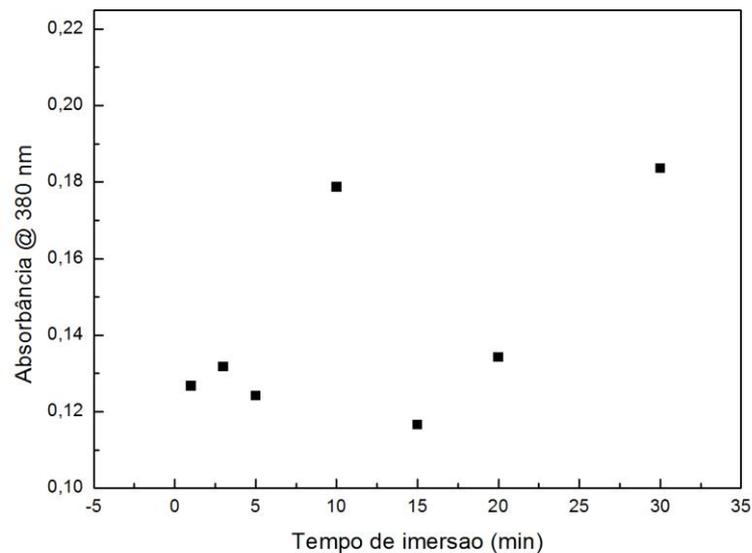


Figura 4.10. Intensidade da absorbância @ 380 nm em função do tempo de imersão para o NC (F127-50/cit-mgn)₅.

4.2.2 Estudo do tempo de imersão para os NCs com PVA

A Fig. 4.11 apresenta os espectros UV-vis obtidos para NC (PVA/cit-mgn)_n (n variando de 1 a 5), para os tempos de imersão de 1, 3, 10 e 30 min. Observa-se dois ombros em 380 e 480 nm, os quais foram empregados para monitorar o crescimento. Note que a intensidade da absorbância assume valores muito altos, quando comparados com aqueles obtidos para os NCs depositados com o F127. Para tempos maiores do que 1 min chega a ser uma ordem de grandeza maior. Os painéis da direita mostram a da absorbância (em 380 e 480 nm) em função do número de bicamadas. Observa-se que a variação da intensidade da absorbância em função do número de bicamadas é altamente linear, conforme se verifica para outros sistemas LbL crescidos via interação eletrostática (PATERNO, 2010).

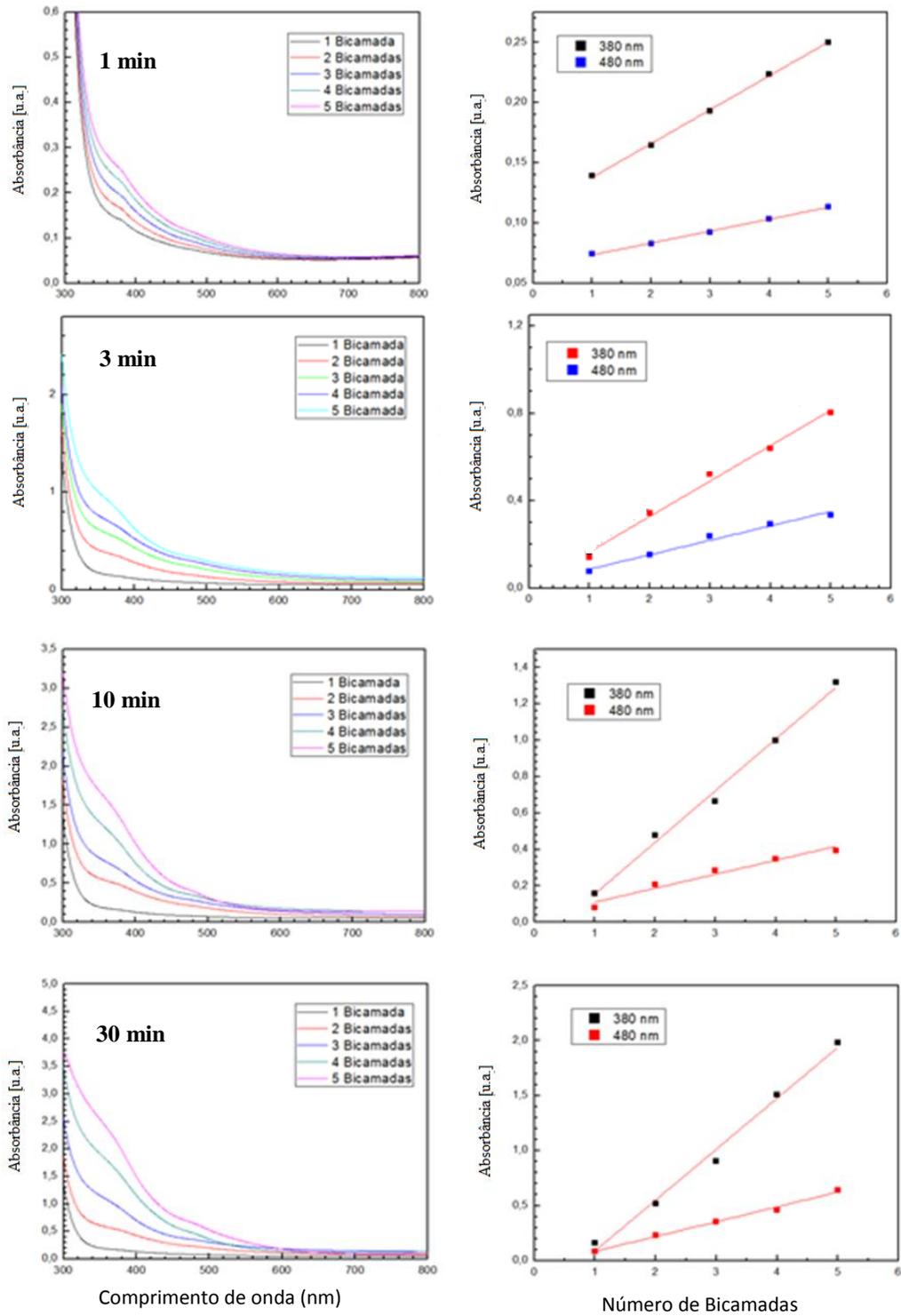


Figura 4.11. Espectros de UV-vis do NC (PVA/cit-mgn)_n, com n variando de 1 a 5 bicamadas, para os tempos de imersão de 1, 3, 10 e 30 min. No painel à direita, tem-se a intensidade da absorvância em 380 e 480 nm em função do número de bicamadas.

Os dados de intensidade da absorvância em 380 nm em função do tempo de imersão

para o NC (PVA/cit-mgn)₅ são apresentados na Fig. 4.12. Observa-se um aumento na intensidade da absorbância até 5 bicamadas, ocorrendo um patamar de saturação entre 5 e 20 bicamadas com um valor médio de intensidade igual a 1.3 ua, enquanto o valor para o tempo de 30 min aumenta. Os resultados indicam que um tempo de imersão de 5 min seria suficiente.

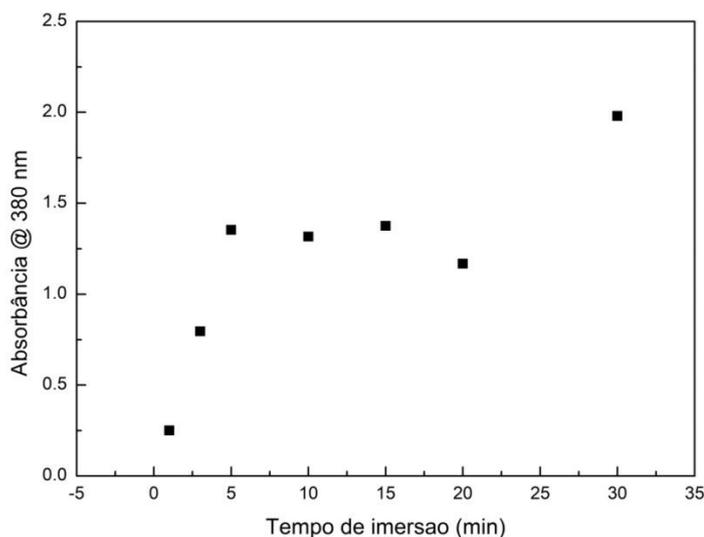


Figura 4.12. Intensidade da absorbância @ 380 nm em função do tempo de imersão para o NC (PVA/cit-mgn)₅.

Em seguida foi feito um estudo da deposição de NC com maior espessura, de 30 bicamadas. Com base nos resultados descritos, foi escolhido o tempo de imersão de 10 minutos para depositar os NCs (F127-20/cit-mgn)_n, (PVA/cit-mgn)_n, e (PVA/cit-mag-ro)_n com n variando de 1 a 30 (n = 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 25 e 30). A Fig. 4.13 (a) apresenta os espectros UV-vis dos NCs (F127-20/cit-mgn)_n; (b) (PVA/cit-mgn)_n e (c) (PVA/cit-mag-ro)_n. Nas Fig. 4.13 (a) e (b), os ombros característicos da presença da magnetita são observados em 380 e 480 nm, enquanto na Fig. 4.13 (c) são observados em 320 e 520 nm caracterizando a presença da maguemita. Nota-se que a maior quantidade de ION adsorvida se refere ao NC (PVA/cit-mgn)_n, em (b). Observa-se que a intensidade da absorbância aumenta linearmente com o número de bicamadas, conforme os dados dos painéis à direita relativos à intensidade da

absorbância em 380 e 480 nm ((a) e (b)) e em 320 e 520 nm para o NC contendo as NPs de citrato de ródio me (c). O comportamento linear evidencia um crescimento gradativo dos NCs no qual a quantidade de amostra de óxido de ferro adsorvida por bicamada é equivalente.

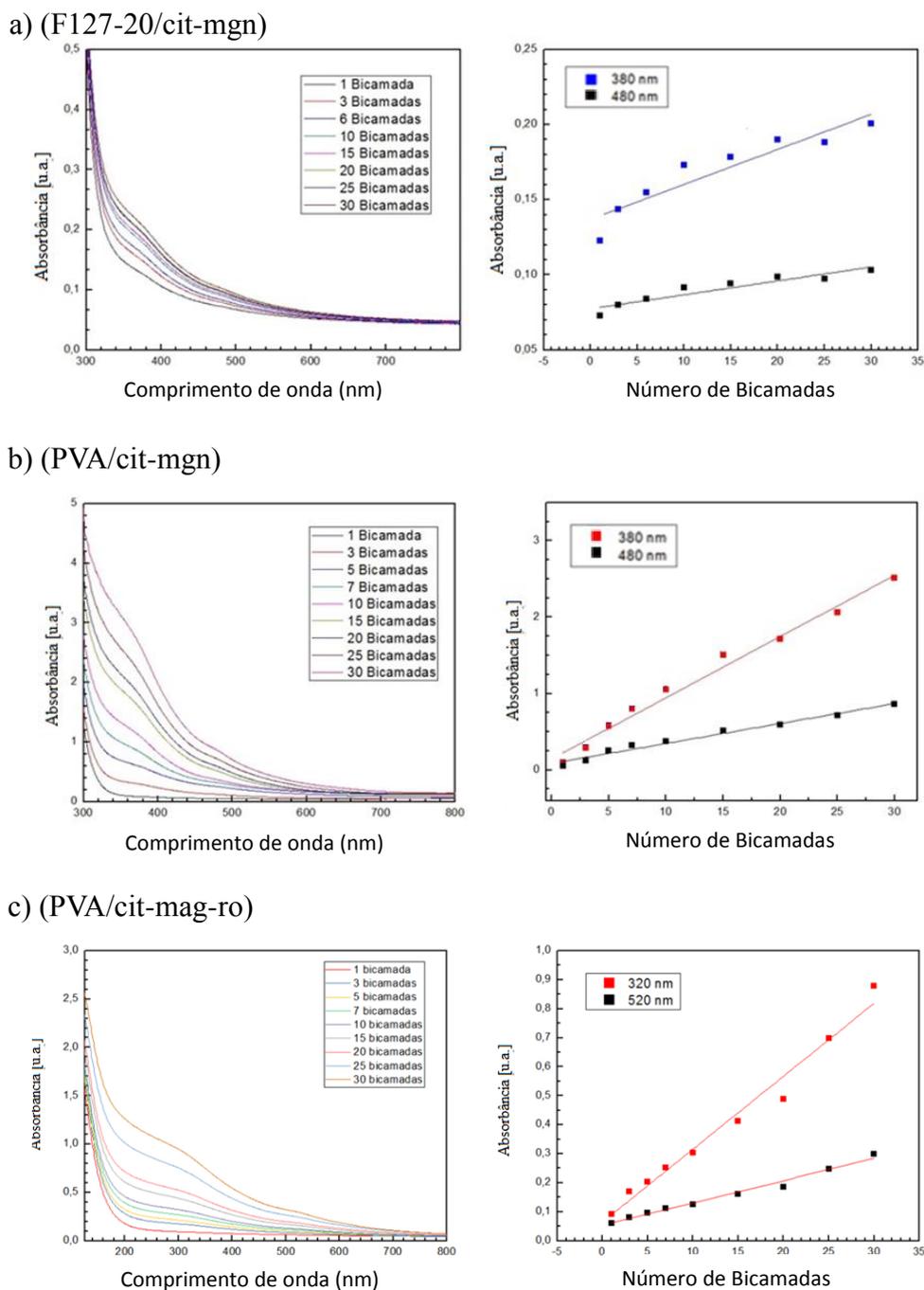


Figura 4.13. Espectros de UV-vis dos NCs em (a) (F127-20/cit-mgn)_n; (b) (PVA/cit-mgn)_n, e em (c) (PVA/cit-mag-ro)_n com n variando de 1 a 30 bicamadas. Nos painéis à direita, tem-se a intensidade da absorbância em 380 e 480 nm em (a) e (b) e em 320 e 520 nm em (c) em função do número de bicamadas.

4.2.3 Dados de espectroscopia Raman

A Fig. 4.14 apresenta o espectro Raman típico para o NC (PVA/cit-mag-ro)₁₀, com ajuste por meio de lorentzianas. Pode-se observar nos espectros bandas largas em torno de 350, 500 e 700 cm⁻¹, conforme foi obtido para as NPs cit-mag-ro (ver Fig. 4.3 (b)), confirmando a presença das NPs cit-mag-ro na estrutura do NC. É importante notar que mesmo em baixíssima quantidade da fase de óxido de ferro é possível detectá-la e identificá-la por meio da espectroscopia micro Raman.

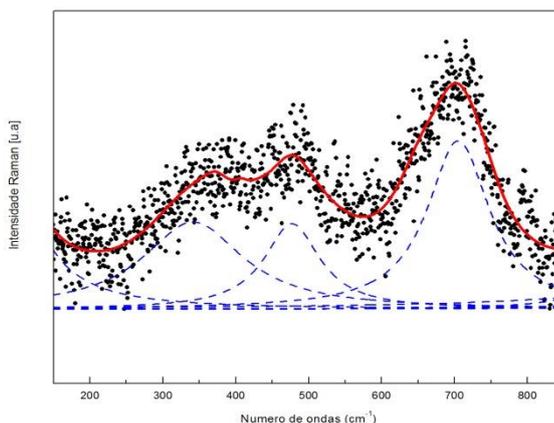


Figura 4.14. Espectro Raman obtido do NCs (PVA/cit-mag-ro)_n, onde contém 10 bicamadas, ajustado empregando-se funções lorentzianas.

4.2.4 Estudo da morfologia da superfície dos NCs

A morfologia da superfície dos NCs (PVA/cit-mag-ro)_n foi investigada por meio de imagens de MEV em função do número de bicamadas depositadas. A Fig. 4.14 mostra as imagens obtidas com os aumentos de 5.000x (painel esquerdo) e 25.000x (painel direito), para o controle (substrato de BK7). A Fig. 4.16 apresenta imagens MEV para os NCs (PVA/cit-

$\text{mag-ro})_n$ com $n= 1, 3, 5, 7, 9,5$. No caso de $n=9,5$ a última camada formada por PVA, enquanto os demais NCs terminam com NPs. Observa-se que conforme o número de bicamadas aumenta a cobertura torna-se cada vez mais uniforme, evidenciando uma camada densa e uniforme para o NC com 9,5 bicamadas. Comparando-se as imagens MEV dos NC que apresentam NPs como última camada com o $(\text{PVA/cit-mag-ro})_{9,5}$, observa-se a superfície deste último aparenta ser mais lisa.

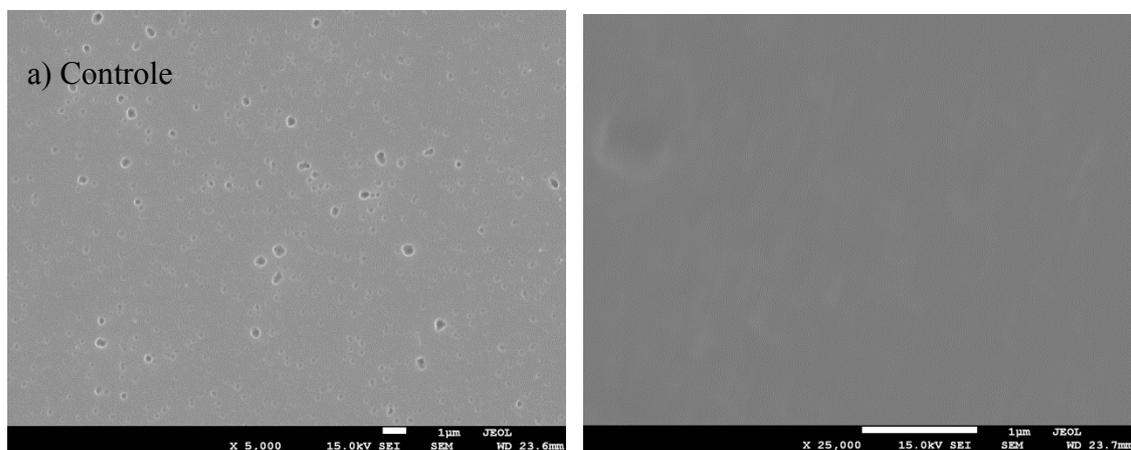


Figura 4.15. Imagem de MEV das amostras controles com substrato limpo (a). Nas resoluções de 5.000x (lado esquerdo) e 25.000x (lado direito).

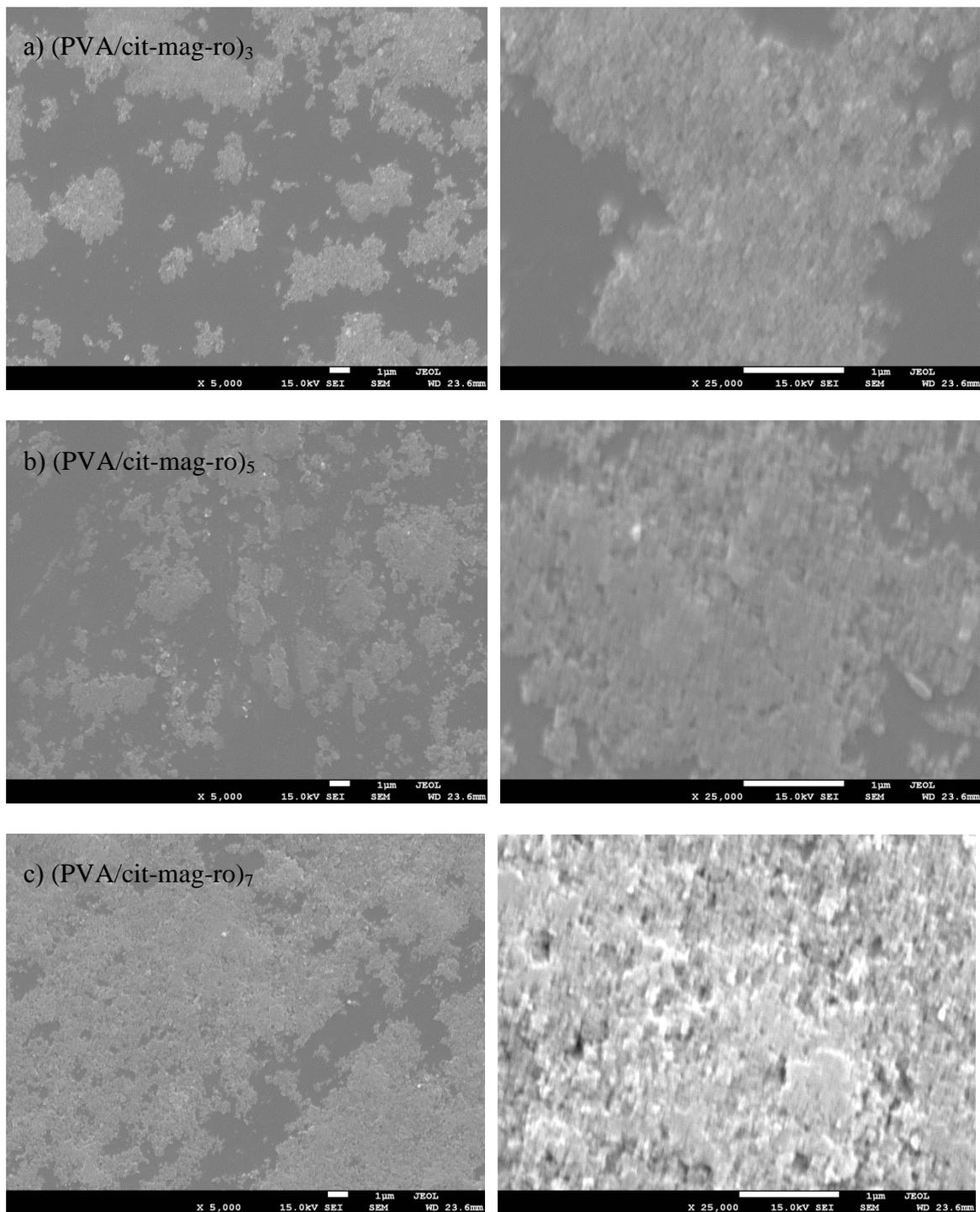


Figura 4.15. Imagens de MEV dos NCs (a) (PVA/cit-mgn-ro)₃; (b) (PVA/cit-mgn-ro)₅; (c) (PVA/cit-mgn-ro)₇. Resoluções de 5.000x (painel esquerdo) e 25.000x (painel direito), barra 1 μm.

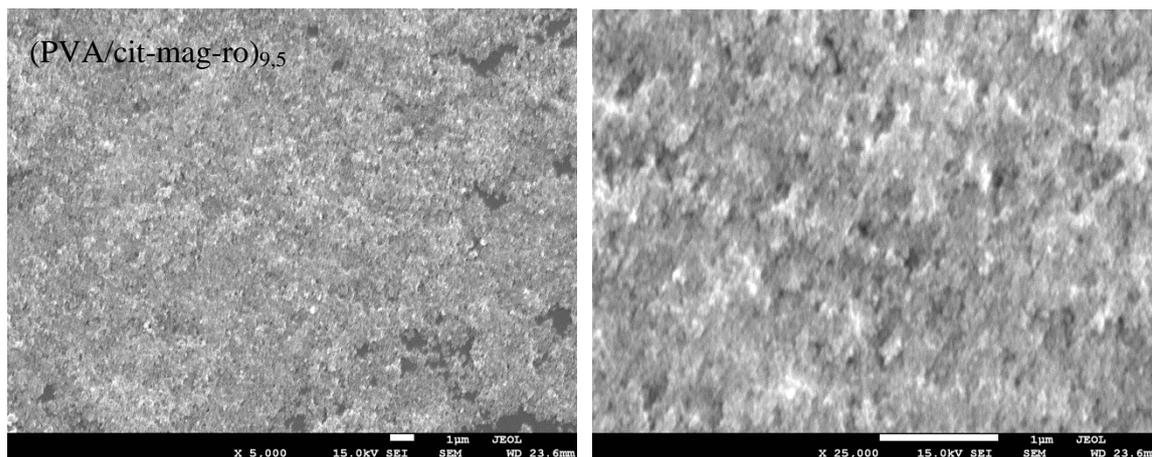


Figura 4.16. Imagens de MEV do NC (PVA/cit-mgn-ro)_{9,5}. Resoluções de 5.000x (painel esquerdo) e 25.000x (painel direito), barra 1 µm.

A morfologia da superfície dos NCs (PVA/cit-mag-ro)_n também foi investigada por meio de imagens de AFM de topografia e de fase, em função do número de bicamadas depositadas. A Fig. 4.17 mostra as imagens de topografia (painel esquerdo) e de fase (painel direito) dos NCs (PVA/cit-mag-ro)₁ (a e b) (PVA/cit-mag-ro)₃ (c e d); (PVA/cit-mag-ro)₅ (e e f); (PVA/cit-mag-ro)₇ (g e h); (PVA/cit-mag-ro)_{9,5} (i e j) e (PVA/cit-mag-ro)₁₀ (k e l). Observa-se nas imagens MFA estruturas esféricas que evidenciam a presença de aglomerados de NPs em maior quantidade nos NCs com maior número de bicamadas, enquanto as imagens de fase em acordo com as de topografia. Com o aumento do número de bicamadas observa-se uma cobertura mais densa indicando que o preenchimento dos espaços entre as NPs ocorre com polímero, em acordo com imagens de microscopia de transmissão de alta resolução (SOLER, 2012c).

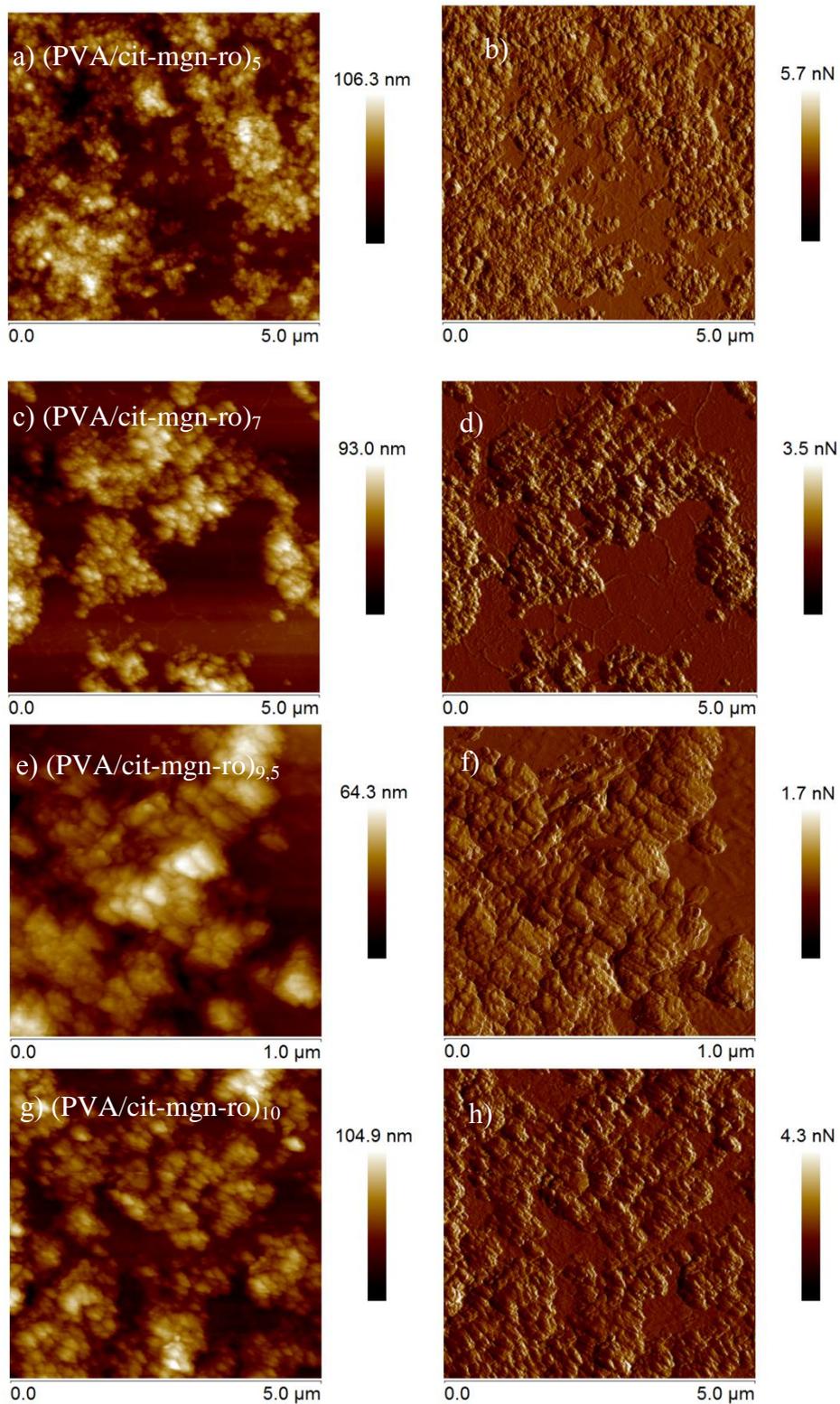


Figura 4.17. Imagens de MFA de topografia (painel esquerdo) e de fase (painel direito) para os NCs (PVA/cit-mgn-ro)₅ (a e b); (PVA/cit-mgn-ro)₇ (c e d); (PVA/cit-mgn-ro)_{9,5} (e e f); (PVA/cit-mgn-ro)₁₀ (g e h).

Observa-se na imagem de topografia 3D da amostra $(\text{PVA/cit-mag-ro})_{9,5}$ em (a); $(\text{PVA/cit-mag-ro})_{10}$ em (b) na Fig. 4.18, que as estruturas esféricas atribuídas às NPs de óxido de ferro são mais evidenciadas na Fig. 4.18 (b) onde o NC com 10 bicamadas termina com NPs. Enquanto que, na Fig 4.18 (a) com a última camada de PVA observa-se uma superfície mais lisa.

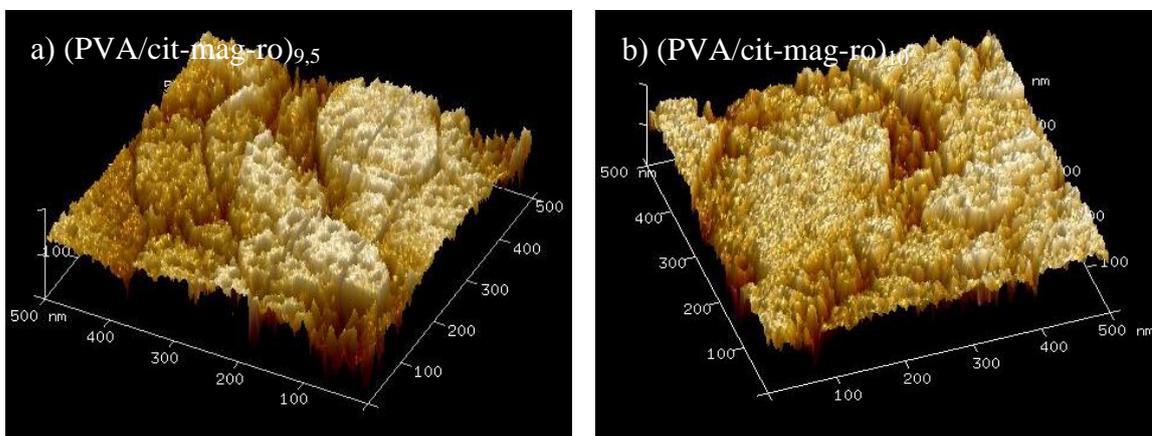


Figura 4.18. Imagem de MFA em três dimensões da topografia da amostra $(\text{PVA/cit-mag-ro})_{9,5}$ em (a) e $(\text{PVA/cit-mag-ro})_{10}$, em (b).

A Fig. 4.19. apresenta os dados de espessura obtidos por MFA para os NCs $(\text{PVA/cit-mag-ro})_n$, para n variando de 1 a 10 bicamadas.. Pode-se observar que a espessura para o NC com 10 bicamadas é de 85 nm, e que a espessura apresenta aumento linearmente com o número de bicamadas, similar ao comportamento que foi observado ao monitorar o crescimento dos NCs por meio dos espectros UV-vis.

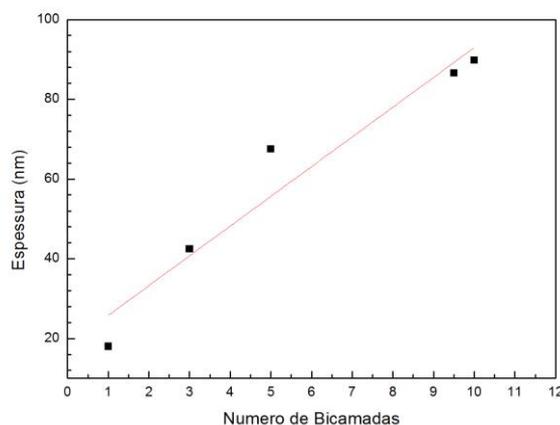


Figura 4.19. Dados dos valores de espessura dos NCs obtidos por meio das imagens de MFA em função do número de bicamadas, para as amostras (PVA/cit-mag-ro)_n, com n= 1, 3, 5, 9,5 e 10 bicamadas.

4.3. Teste de Viabilidade Celular

Os testes de Viabilidade Celular empregando o protocolo do MTT foram realizados em MCF-7 células tumorais mamárias, para a realização do teste em NCs produzidos (PVA/cit-mag-ro), com diferentes bicamadas, com a última camada formada por polímero ou nps, na qual as células devem aderir. A linhagem células tumorais MCF-7 expressam moléculas de adesão como a E-caderina e receptores de estrógeno e progesterona, o que a torna um modelo celular com baixa capacidade invasiva e, por esse motivo, baixa capacidade metastática, além de ser de origem humana e favorecer os estudos comparativos com linhagens murinas (KUREBAYASHI et al, 1993). Como controles negativos foram utilizados, em cultura de células, a substância DMSO (dimetil sulfóxido), solvente largamente utilizado em formulações farmacêuticas, além de ser usado para criopreservação de células devido à sua capacidade de permear pela membrana plasmática, e em baixas concentrações (menores que 1%) considerada atóxica (GALVÃO, 2014). A ambientação do cultivo celular

foi mantida em pH próximo de 7, na presença de proteínas, íons, verificando-se o efeito da estrutura dos ncs como um todo no teste de toxicidade.

O teste emprega um protocolo de MTT baseado na medida do dano induzido pelos NCs no metabolismo celular de glicídeos usualmente através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. Conseqüentemente, a viabilidade mitocondrial, é a quantificação por meio da redução do MTT (um sal de coloração amarelo e solúvel em água) ao formazan (sal de coloração arroxeada e insolúvel em água) devido à atividade daquelas enzimas. Portanto, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular.

A Fig. 4.20. apresenta a viabilidade celular para os grupos controles fibroblastos depositados sobre as lamínulas limpas (Controle) e para os NCs (PVA/cit-mag-ro)₃, (PVA/cit-mag-ro)₁₀, conforme foram listados na Tab. 3.3.

Os percentuais de viabilidade celular das amostras investigadas foram obtidos em comparação com os valores do grupo controle (Controle – igual a 100%), obtidos para o grupo de células tumorais, expostas aos NCs com bicamadas completas (PVA/cit-mag-ro)₃ foram iguais a 81,5% e (PVA/cit-mag-ro)₁₀ 63,2%, considerado um bom resultado para células tumorais (Tab. 4.2).

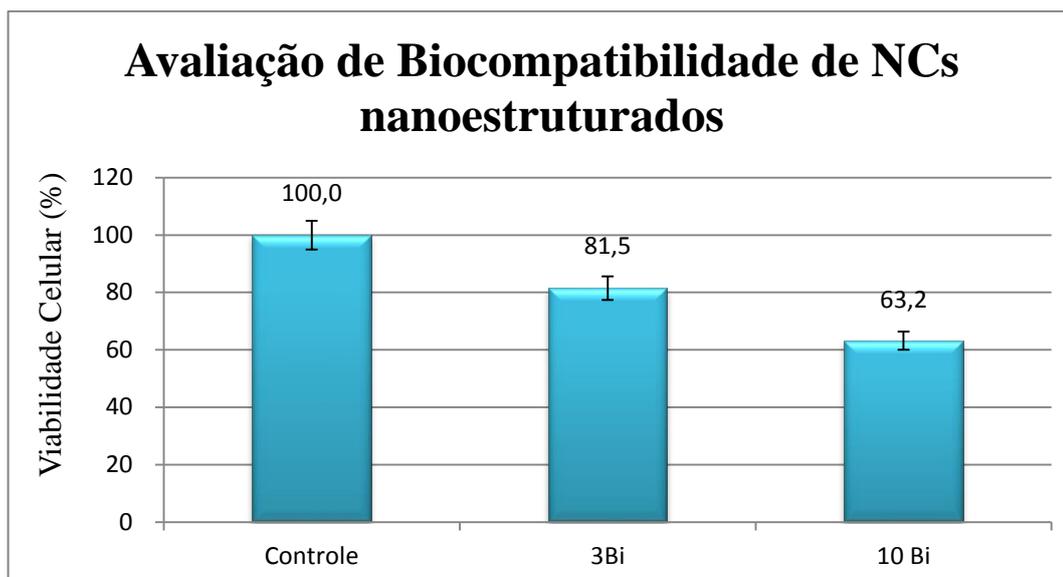


Figura 4.20. Ilustração dos resultados obtidos do estudo de viabilidade celular de células tumorais de carcinoma mamário da linhagem MCF-7, NCs com os NCs (PVA/cit-mag-ro)₃ e (PVA/cit-mag-ro)₁₀ e controles com tempo de exposição de 24 horas.

Tabela 4.2 – Relação dos valores obtidos para a viabilidade celular por meio da análise estatística.

CONTROLE	MCF-7	
	100	%
(PVA/cit-mag-ro) ₃ Bi	0,814815	81,5
(PVA/cit-mag-ro) ₁₀ Bi	0,632121	63,4

Os resultados mostraram variações na viabilidade celular para os diferentes tipos de amostras investigadas, indicando que NCs com maior número de bicamadas apresentam maior efeito citotóxico do que aquele com menor número de bicamadas.

Capítulo 5

Conclusões e Perspectivas

5.1 Conclusões

Neste trabalho, FMs estáveis contendo NPs funcionalizadas com citrato ou com citrato de ródio (II), foram empregados como fonte de NPs para automontagem de NCs com os biopolímeros PVA e Pluronic F127. Os espectros Raman mostraram que as NPs de óxido de ferro funcionalizada com citrato de ródio (II) são de maguemita, enquanto as funcionalizadas com citrato são magnetita parcialmente oxidadas.

O protocolo desenvolvido permitiu a deposição de multicamadas formadas com NPs de óxidos de ferro e Pluronic F127 com várias concentrações, abaixo e acima da concentração micelar crítica. Foram obtidos os tempos de imersão adequados para a deposição das multicamadas em função da concentração de F127, de modo a obter um aumento de massa depositada crescendo linearmente com o número de bicamadas. Portanto, os resultados obtidos permitiram a obtenção de NCs depositados em meio aquoso contendo sítios hidrofóbicos. Os espectros Raman obtidos dos NCs evidenciaram a presença das nanopartículas de óxidos de ferro e a respectiva fase.

As imagens de MEV e de MFA mostraram a presença das NPs na matriz polimérica sem segregação de fase. Por meio das imagens MFA foi estimada a espessura dos NCs em

função do número de bicamadas, obtendo-se a espessura do NC com 10 bicamadas igual a 85 nm.

Os testes de viabilidade celular *in vitro*, com incubação de células tumorais da linhagem MCF-7 durante 24 horas em conjunto com os NCs depositados apresentaram toxicidade significativa, conforme esperado, devido à presença do ródio (II), um composto quimioterápico, na superfície das NPs, efeito este que foi mais efetivo para o NC com maior número de bicamadas.

5.1 Perspectivas para trabalhos futuros

Por fim, como perspectivas do trabalho, sugere-se:

- Investigar a decomposição da estrutura (PVA/cit-mag-ro) em meio biológico;
- Realizar a automontagem dos NCs (PVA/cit-mag-ro) em substratos flexíveis, como celulose ou plástico biocompatível;
- Quantificar a concentração de ródio (II) presente nos NCs (PVA/cit-mag-ro) e avaliar

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

AI, H. et al. *Biocompatibility of layer-by-layer self-assembled nanofilm on silicone rubber for neurons*. J. Neurosci. Methods, v.128, p.1–8, 2003.

ALCANTARA, G. B. *Layer-by-layer assembled cobalt ferrite nanoparticles for chemical sensing*. Journal Of Nanofluids, v,2, n.3, p.175-183, 2013a.

ALCANTARA, G. B. ET AL. *Dielectric Properties of cobalt ferrite nanoparticles in ultrathin nanocomposite films*. Phys. Chem. Chem. Phys., p.v.15, p.19853 - 19861, 2013b

ALCANTARA, G. B. et al. *Adsorption of cobalt ferrite nanoparticles within layer-by-layer films: a kinetic study carried out using quartz crystal microbalance*. Phys. Chem. Chem. Phys., v. 13, n. 48, p. 21233-21242, DEZ. 2011a.

ALCANTARA, G. B. et al. *Morphology of cobalt ferrite nanoparticle–polyelectrolyte multilayered nanocomposites*. J. MAGN. MAGN. MATER., v. 323, p. 1372-1377, 2011b.

ANZAI, J.I.; et al. *“Layer-by-layer construction of multilayer thin films composed of avidin and biotin-labeled poly(amine)s.”* Langmuir, Washington, v.15, n.1, p.221-226, 1999.

ARRUEBO, M.; et al. *Magnetic nanoparticles for drug delivery*. NanoToday, v.2, n.3, p.22-32, 2007.

ASTRUC, D., et al. *Nanoparticles as recyclable catalysts: the frontier between homogeneous and heterogeneous catalysis*. Angew Chem Int, v.44, p.7852-7872, 2005.

BAEHNER RL, et al. *Respiration and glucose oxidation in human and guinea pig leukocytes comparative studies*. J Clin Invest; v.49: p.692-700, 1970.

BEAR, J. L.; et al. *A kinetic study of the reactions of rhodium(ii) acetate with trifluoroacetic acid*. Journal of inorganic nuclear chemistry, v. 33, p. 3479-3486, 1971.

BELLAMY, L.J.; *The Infrared Spectra Of Complex Molecules*, 3rd Ed. Canada: Chapman And Hall, 1975.

BERGNA, H.E., KIRKLAND, J.J. “*Process for preparing superficially porous supports for chromatography and catalysts*.”. Patente n° US 4477492 A, 1984.

BERNE, B., PECORA, R. *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. Dover Publications, Inc, Nova Iorque, 2000.

BINNING, G.; et al. *Atomic Force Microscope*. Phys. Rev. Lett., v.56, n.9, p.930-933, 1986.

BLATCHFORD, M.A., et al. *Raman Spectroscopic Evidence For Cooperative C–H...O Interactions In The Acetaldehyde–CO₂ Complex*. J. Am. Chem. Soc, v. 124, p.14818, 2002.

BOYAR, E.B., ROBINSON, S.D. *Rhodium(II) carboxylates*. Coordination Chemistry Reviews, v.50, p.109-208, 1983.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. *Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy*. Advanced Drug Delivery Reviews, v.56, n.11, p.1649-1659, 2004.

BRYNDA, E.; HOUSKA, M.J. “*Multiple alternating molecular layers of albumin and heparina on solid surfaces*.” J.Colloid Interface Sci., New York, v.183, n.1, p.18-25, 1996.

BUTTERWORTH, M.D., ILLUM, L., DAVIS, S.S. *Preparation of ultrafine sílica and peg-coated magnetite particles*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and

Engineering Aspects, v.179, p.93-102, 2001.

CAPARROS, T.; et al. *Early enteral nutrition in ill patients with a high-protein diet enriched with arginine, fiber and antioxidants compared with a standard high protein diet: the effect on nosocomial infections and outcome*. JPEN J Parenter Enteral Nutr.25(6): p.229-308, 2001.

CARNEIRO, M.L.B.; et al. *Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer*. Journal of Nanobiotechnology, Universidade de Brasília (UnB), Brasília-DF, p.11:4, 2013.

CARNEIRO, M.L.B; et al; *Free Rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate magnetic carriers as potential strategies for breast cancer therapy*. Journal of Nanobiotechnology. p.9-11, 2011.

CARUSO, F.; et al. *“Assembly of alternating polyelectrolyte and protein multilayer films for immunosensing.”* Langmuir, Washington, v.13, n.13, p3427-3433, 1997.

CASTILHO, Ana Paula de Oliveira Ricaldi de. **Nanonanocompósitos com óxidos de ferro nanoestruturados e biopolímeros depositados por automontagem**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de PósGraduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, 2014.

CHAVES, L N. **Estudo de morte celular em células mcf-7 tratadas com citrato de ródio associado a nanopartículas de maghemita**. Dissertação. Universidade de Brasília. p.21, 2013.

CHIFOTIDES, H. T.; DUNBAR, K. R. *Interactions of metal-metal-bonded antitumor active complexes with DNA fragments and DNA*. Acc Chem Res, v. 38, n. 2, p. 146-56, 2005.

CLEETER, M. W., et al. *Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases.* FEBS, v. 345, n. 23, p. 50-54, 1994.

CLOGSTON, J., PATRI, A. *Zeta potential measurement. In: characterization of nanoparticles intended for drug delivery.* Mcneil, S. Ed. Humana Press, 2011.

COLTHUP, N. *Introduction to infrared and Raman spectroscopy.* Ed. Academic Press Inc., Nova Iorque, 2012.

CORREA-DUARTE, M. A. et al. *Control of packing order of self-assembled monolayers of magnetite nanoparticles with and without sio2 coating by microwave irradiation.* Langmuir, v. 14, p. 6430-6435, Out. 1998.

COSGROVE, T. *Colloid science: principles, methods and applications.* Ed, Bristol: Blackwell Publishing, 2005.

COTTON, F.A., HILLARD, E.A., MURILLO, C.A. *The first dirhodium tetracarboxylate molecule without axial ligation.* Journal of the American Chemical Society, v.124, n.20, p.5658-5660, 2002.

DAVIS, F.; HIGSON, S.P.J. *“Structured thin film as functional componentes within biosensors.”* Biosens Biochem., New Your, v.31, p241-313, 1975.

De VILLIERS, M. M., et al. *Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly.* Advanced drug delivery reviews, v.63, p.701-715, 2011.

DECHER G., HONG J.D. *“Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process, I consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces.”* Chem. Macromol. Symp., v.46, p.321-327. 1991.

DECHER, G. *“Fuzzy nanoassemblies: toward layered polymeric multicomposites.”* Science, Washington, v.277, p.1232-1237, 1997.

DHANKHAR, R., et al. *Advances in novel drug delivery strategies for breast cancer therapy*. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, v.38, n.5, p.230-49, 2010.

DOUZIECH-EYROLLES, L., et al. *Nanovectors for anticancer agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles*. Int J Nanomedicine, v.2, n.4, p. 541-50, 2007.

DUMORTIER, G., et al. *A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics*. Pharm res v.23, p.2709–2728, 2006.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J., et al. *Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations*. J Pharm Pharm Sci v.9, p.339–358, 2006.

EVERETT, D. H. *Basic principles of colloid science*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1988.

FAUCONNIER, N., et al. *Adsorption of gluconic and citric acids on maghemite particles in aqueous médium*. Progress in Colloid and Polymer Science, v.100, p.212-216, 1996.

FAUCONNIER, N., et al. *Synthesis of aqueous magnetic liquids by surfasse complexation of maghemite nanoparticles*. Journal of Molecular Liquids, v.83, p.233-242, 1999.

FERRARO, J.; et al. *Introductory Raman Spectroscopy*. 2nd Ed. San Diego: Academic Press, 2002.

FUSCO, S., et al. *Perspectives on: PEO-PPO-PEO triblock copolymers and their biomedical applications*. J. Bioact. Compat. Polym. v.21, p.149–164, 2006.

GALVÃO, J., et al. *Unexpected Low-Dose Toxicity Of The Universal Solvent DMSO*. The Faseb Journal, v. 28, n. 3, p. 1317-1330, 2014.

GEPPERT, M., et al. *Accumulation of iron oxide nanoparticles by cultured brain astrocytes*. Journal Of Biomedical Nanotechnology, v.5, n.3, p.285-293, 2009.

GIL, M. H.; FERREIRA, P. **Polissacarídeos como Biomateriais.** BOLETIM SOCIEDADE PORTUGUESA DE QUÍMICA, v.100, p.72-74, 2006.

GÖLANDER, C.G., et al. *“Heparin surface film formation through adsorption of colloidal particles studied by ellipsometry and scanning electron microscopy.”* Colloids Surf. v.5, p.1-16, 1982.

GRIBANOV, N., et al. *Physico-chemical regularities of obtaining highly dispersed magnetite by the method of chemical condensation.* Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v.85, n.1-3, p.7-10, 1990.

GROSS, M., et al. *Reduced graphene oxide multilayers for gas and liquid phases chemical sensing.* Rsc advances, v.4, n.34, p.17917-17924, 2014.

GU, Y.J., et al. *Interaction of Myogenic Factors and the Retinoblastoma Protein Mediates Muscle Cell Commitment and Differentiation.* J. Am. Chem. Soc, v.276, p.9832, 2001.

GUPTA, A. K., GUPTA, M. *Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications.* Biomaterials, v.26, n.18, p.3995-4021, 2005.

HAIPEG ZHENG, et al. *Controlling Cell Attachment Selectively onto Biological Polymer–Colloid Templates Using Polymer-on-Polymer Stamping.* 2004.

HAMBLIN, M. R., et al. *Nanoscience in dermatology.* Academic Press, 2016.

HAMMOND, P. T. *Building biomedical materials layer-by-layer.* Mater. Today 15, 196–206 2012.

HILGER, I.; HERGT, R.; KAISER, W.A. *User of magnetic nanoparticle heating in the treatment of breast cancer.* IEE Proc-Nanobiotechnol, v.152, n.1, p.33-39, 2005.

HOWARD, R.A., et al. *The interaction of rhodium(II) carboxylates with enzymes.* Cancer Res, v.36, n.12, p.4402-5, 1976.

HUNTER, R.J. *Zeta potential in colloid Science: principles and applications*. Orlando: Academic Press, 1981.

HUSSAIN, R. F.; et al. *A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay*. J Immunol Methods, v.160, n.1, p.89-96, 1993.

ILER R.K. "*Multilayers of colloidal particles.*" J. Colloid Interface Sci., v.21, p.569-594, 1966.

JAFELICCI, M., VARANDA, L.C. *O mundo dos colóides*. Química Nova na Escola, n.9, p.9-13, 1999.

JÄNICKE, R. U. *Mcf-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3*. Breast Cancer Research And Treatment, v.117(1), p.219-221, 2009.

JEFFREY, G.A. *An Introduction to Hydrogen Bonding*. Oxford University Press, Oxford, 1997.

JOHNSTON, A. P., CORTEZ, C., ANGELATOS, A. S. & CARUSO, F. *Layer-by-layer engineered capsules and their applications*. Current opinion in colloid & interface science, 11, 203-209, 2006.

JOLIVET, J.P., HENRY, M., LIVAGE, J. *Metal oxide chemistry and synthesis: from solution to solid state*. 3 Ed. Paris, John Wiley & Sons, p.321, 2000.

JUAN MÉNDEZ GARZA, et al. *Multicompartment Films Made of Alternate Polyelectrolyte Multilayers of Exponential and Linear Growth*, 2004.

JUNIOR, M.R., VARANDA, L.C. *O mundo dos colóides*. Química Nova, n.9, p.9-13, 1999.

KANG, Y., RISBUD, S., RABOLT, J., STROEVE, P. *Synthesis and characterization of nanometer-size Fe_2O_4 and $\gamma-Fe_2O_3$ particles*. Chemistry of Materials, v.8, n.9, p.2209-2211, 1996.

KATSAROS, N; ANAGNOSTOPOULOU, A. *Rhodium and its compounds as potencial agents in cancer treatment*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, v.42, p.297-308, 2002.

KHOSHTARIYA, D.E. et al. *A Raman and ultraviolet diffuse reflectance spectroscopic investigation of alumina-supported molybdenum oxide*. J. Phys. Chem., v.95, n.22, p.8797-8804, 1991.

KIRKLAND, J.J. *“Superficially porous supports for chromatography”* Patente n° US 3505785 A, 1970

KIRKLAND, J.J. *“Porous thin-layer modified glass bead supports for gas liquid chromatography*. Anal. Chem, v. 37, p.1458-1461, 1965.

KOKTYSH, D. S. et al. *Biomaterials by Design: Layer-By-Layer Assembled Ion-Selective and Biocompatible Films of TiO₂ Nanoshells for Neurochemical Monitoring*. Adv. Funct. Mater. 12, 255 (2002).

KOTOV, N.A. *“Layer-by-layer self-assembly: the contribution of hydrophobic interactions.”* Nanostruct. Mater., Tarrytown, v.12, n.5-8, p.789-796, 1999.

KUREBAYASHI, J.; et al. *Quantitative demonstration of spontaneous metastasis by MCF-7 human breast cancer cells cotransfected with fibroblast growth factor 4 and LacZ*. Cancer Res, v.53, n.9, p.2178-87, 1993.

LAURENT, S., et al. *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for delivery of therapeutic agents: opportunities and challenges*. Expert Opin. Drug Deliv. 11, 1449–70, 2014.

LAURENT, S. & MAHMOUDI, M. *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promises for diagnosis and treatment of cancer*. Int. J. Mol. Epidemiol. Genet. 2, 367–90, 2011.

LAURENT, S., et al. *Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, And Biological Applications*. Chem Rev, v.108, p.2064-2110, 2008.

LETTI, C. J. et al. *The hole of Polymer films on the oxidation of magnetite nanoparticles*. Solid State Chemistry, v. 246, p. 57-64, 2017a.

LETTI, C. J. et al., *Synthesis, Morphology and Electrochemical Applications of Iron Oxide Based Nanocomposites*, Adv. Nano Res. v.5, p.215–230, 2017b.

LETTI, C. J. **Estudo de nanocompósitos formados por partículas de óxidos de ferro e polímeros por meio da espectroscopia Raman**. Dissertação (Mestrado Em Física). Instituto de Física, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

LOBO, R. F. M. et al. *In situ thickness measurements of ultra-thin multilayer polymer films by atomic force microscopy*. Nanotechnology, v. 10, n. 4, p. 389, 1999.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. *Zetasizer nano series user manual*. Malvern Instruments, 2005.

MAMEDOV, A. A, et al. *Stratified assemblies of magnetite nanoparticles and montmorillonite prepared by the layer-by-layer assembly*. Langmuir, v. 16, p. 3941- 3949, 2000.

MANSUR, H. S., et al. *Characterization of poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy*. Polymer (Guildf). v.45, p.7193–7202, 2004.

MCBAIN, S. C., YIU, H. H., DOBSON, J. *Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery*. Int J Nanomedicine. v.3, n.2, p.169-80, 2008.

MCCARTHY, J. R., WEISSLEDER, R. *Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy*. Adv Drug Deliv Rev, v.60, n.11, p.1241-51, 2008.

MELO, T, et al. *Investigation Of Surface Passivation Process On Magnetic Nanoparticles By Raman Spectroscopy*. Surface Science. , v.600, p.3642 - 3645, 2006.

MONOPOLI, M., et al. *Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials*. Nature Nanotechnology, v.7, n.12, p.779-786, 2012.

MORAIS, P., et al. *Preparation and characterization of ultra-stable biocompatible magnetic fluids using citrate-coated cobalt ferrite nanoparticles*. Thin Solid Films, v.515, n.1, p.266-270, 2006.

MYERS, D. *Surface, interfaces and colloids*. 2nd, Ed, New York: John Wiley & Sons, Inc, 1999.

NAKAMOTO, K. *Infrared and raman spectra of inorganic and coordination compounds, part a*. Ed. Wiley, 6 Ed., 2009.

NEUMANN, R.F., et al *Morphology and magnetism of multifunctional nanostructured - films: Simulation and experiments*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v.347, p.26 - 32, 2013.

NIE, S., et al. *Thermoreversible Pluronic F127-based hydrogel containing liposomes for the controlled delivery of paclitaxel: in vitro drug release, cell cytotoxicity, and uptake studies*. Int. J. Nanomedicine. v.6, p.151–166, 2011.

NORMAN, J. G.; KOLARI, H. J. *Strength and trans influence of rh-rh bond in rhodium(II) carboxylates dimmers*. Journal of The American Chemical Society, v.100, n.3, p.791-799, 1978.

NUNES, et al. *Colloid preparation of maghemite nanoparticles functionalized with dirhodium (II) citrate*. 8th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers. p.143, 2014a.

NUNES, E. S., et al. *Evidence of iron (III) reduction in γ -Fe₂O₃ nanoparticles due*

to meso-2,3-dimercaptosuccinic acid functionalization. Materials Research Express, v.1, p.01610, 2014b.

ODENBACH, S. *Recent progress in magnetic fluid research.* Journal of Physics: Condensed Matter, v.16, p.R1135-R1150, 2004.

OSSADNIK, M. *et al. Investigation of differences in follicular penetration of particle-and nonparticle-containing emulsions by laser scanning microscopy.* Laser Phys. v.16, p.747–750, 2006.

OSTROFF, R.M.; et al. “*Fixed polarizer ellipsometry for simple and sensitive detection of thin films generated by specific molecular interactions: applications in immunoassays and DNA sequence detection.*” Clin. Chem, Baltimore, v.44, p.2031-2035, 1998.

PANKHURST, Q. A., et al. *Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine.* J. Phys. D. Appl. Phys. v.36, p167–181, 2003.

PAPINI, CLAUDEMIR J. “**Estudo Comparativo de Métodos de Determinação do Tamanho de Partícula**”. 130f. (Dissertação para Título de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. São Paulo, 2003.

PATERNO, L. G. & SOLER, M. A. G. *Layer-by-Layer Enabled Nanomaterials for Chemical Sensing and Energy Conversion.* JOM, v.65, p.709–719 2013.

PATERNO, L. G. et al. *Tuning of magnetic dipolar interactions of maghemite nanoparticles embedded in polyelectrolyte layer-by-layer films.* J. Nanosci. Nanotechnol., v. 12, n. 8, p. 6672-6678, 2012.

PATERNO, L. G. et al. *Magnetic nanocomposites fabricated via the layer-by-layer approach.* J. Nanosc. Nanotech., v. 10, n. 4, p. 2679-2685, 2010.

PATERNO, L. G. et al. *Fabrication and characterization of nanostructured*

conducting polymer films containing magnetic nanoparticles. Thin Sol. Films, v. 517, p. 1753- 1758, 2009a.

PATERNNO, L. G. et al. *Layer-by-Layer Assembly of Bifunctional Nanofilms: Surface-Functionalized Maghemite Hosted in Polyaniline*. J. Phys. Chem. C, v. 113, p. 5087-5095, 2009b.

PEIXOTO, R.C.A., et al. *Antitumor effect of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles on mice bearing breast cancer: a systemic toxicity assay*. Tumor Biol. v. 36, p.3325–3336, 2015.

PEIXOTO, R.C.A. **Avaliação toxicológica e antitumoral do tratamento sistêmico com citrato de ródio (II) livre e associado a nanopartículas de maghemita em modelo experimental de câncer de mama**. Dissertação Pós-Graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília. p.17-28, 2012.

POPPELWELL, J.; SAKHNINI, L. *The dependence of the physical and magnetic properties of magnetic fluids on particle size*. J. Magn. Mater., v.149, n.1-3, p.72-78, 1995.

PY-DANIEL, K., et al. *Highly efficient photodynamic therapy colloidal system based on chloroaluminum phthalocyanine/pluronic micelles*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v.103, p.23-31, 2016.

RADTCHENKO, I. L., SUKHORUKOV, G. B. & MÖHWALD, H. *Incorporation of macromolecules into polyelectrolyte micro-and nanocapsules via surface controlled precipitation on colloidal particles*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 202, p.127-133, 2002.

RAMIREZ R.L.M. **Síntese de complexos nanoestruturados formados por óxidos de ferro e sulfato de condroitina**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília,

Instituto de Ciências Biológicas, Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, 2013.

RAO, YUE-FENG et al. *Epirubicin-Loaded Superparamagnetic Iron-Oxide Nanoparticles for Transdermal Delivery: Cancer Therapy by Circumventing the Skin Barrier*. Small, v. 11, n. 2, p. 239-247, 2015.

REIBSCHEID, E.M; et al. *Antitumor effects of rhodium (II) complexes on mice bearing Ehrlich tumors*. Braz J Med Biol Res, v.27, n.1, p.91-94, 1994.

REMPEL, G. A.; et al. *A. Tetrakis (acetato) dirhodum(II) and similar carboxylato compounds*. Inorganic Synthesis, v. 13, p. 90-91, 1972.

RIBEIRO, E., HONORIO-FRANÇA, A., FRANÇA, E., SOLER, M. *Design and Development of Nanoemulsion Systems Containing Interferon Gamma*. Protein and peptide letters, v.23, n.7, p.626-638, 2016.

ROCHA, M.C.O. **Modulação Da Expressão De Fibronectina E Laminina Por Nanopartículas De Maghemita Associadas Ao Citrato De Ródio II Em Carcinoma Mamário**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, DF, 2014.

ROGER, J., PONS, J.N., MASSART, R. *Behavior of aqueous ferrofluids in presence of aminoacids*. European Journal of Solid State and Inorganic Chemistry, v.26, p.475-488, 1989.

ROSENBUSCH, J.P., et al. *"Matrix Porin: a Periodically Arranged Pore Outer Membrane of Escherichia coli."* Livro Electron microscopy at molecular dimensions: state of the art and strategies for the future in proceedings in life sciences, Ed. By w. Baumeister, W. Vogell, Springer, Berlin, 1980.

ROSENSWEIG, R.E. *Ferrohydrodynamics*. 1st ed., New York: Dover, 1985.

SANTOS, J., et al. *Iron oxide nanostructured electrodes for detection of copper (ii)*

ions. Journal Of Nanoscience And Nanotechnology, Vol. 14, N. 9,P. 6614-6623, 2014.

SCHEINER, S. *Hydrogen Bonding: A Quantum Chemical Perspective*. Oxford University Press, 1997.

SCHMOLKA, IR. *Artificial skin i. Preparation and properties of pluronic F127 gels for treatment of burns*. J. Biomed Mater Res, v.6, p.571–582, 1972.

SCHULZ, MARK J., SHANOV, VESSELIN N. *Nanomedicine design of particles, sensors, motors, implants, robots, and devices*. Artech House, 2009.

SCHWERTMANN, U., CORNELL, R. *Iron oxides in the laboratory: preparation and characterization*. Ed. John Wiley & Sons, 2008.

SHAW, D. J. *Introduction to colloid and surface chemistry*. 4th ed. London: Butterworth-Heinemann, 1992.

SHEBANOVA, O., LAZOR, P. *Raman spectroscopic study of magnetite (FeFe₂O₄): a new assignment for the vibrational spectrum*. Journal of Solid State Chemistry, v. 174, n. 2, p.424-430, 2003.

SHI, D.; et al. *Engineered Multifunctional Nanocarriers for Cancer Diagnosis and Therapeutics*. Small, v.7, p. 2549-2567, 2011.

SHI, W, et al. *Layer-by-Layer Self-Assembly: Toward Magnetic Films with Tunable Anisotropy*. J. Phys. Chem. v.119, p.13215–13223, 2015.

SHIMAZAKI, Y.; et al. *“Preparation of the layer-by-layer deposited ultrathin film based on the charged-transfer interaction.”* Langmuir, Washington, v.13, n.6, p.1385-1387, 1997.

SILVA, S. W. et al. *Stability of citrate-coated magnetite and cobalt-ferrite nanoparticles under laser irradiation: a raman spectroscopy investigation*. Iee Trans. Magn., V. 39, N. 5, P. 2645-2647, Set. 2003.

SIMÕES, M. C. F., et al. *Skin cancer and new treatment perspectives: A review*. Cancer Lett. 357, 8–42 (2015).

SIMSTEIN, R., M. BUROW, ET AL. *Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: insights from the MCF-7 cell model system*. Experimental Biology and Medicine, v.228(9), p.995-1003, 2003.

SKOOG, D., et al. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. Ed., Editora Bookman São Paulo, 2002.

SOLER, M.A.G, PATERNO, L. **Nanomateriais magnéticos**. In: **nanociência e nanotecnologia: princípios e aplicações**, Ed. Elsevier, Vol. 1, Ed. Leite, F., Ferreira, M., Oliveira Jr, O. São Paulo, v.1, p.175-221, 2015.

SOLER, M.A.G., FANYAO Q. *Raman Spectroscopy of Iron oxide nanoparticles*. In: *Raman Spectroscopy for Nanomaterials Characterization*, ed. Springer-Verlag, Berlin, p. 379-417, 2012a.

SOLER, M.A.G., et al. *Layer-by-Layer Assembly of Magnetic Nanostructures*. *Journal of Nanofluids*. v.1, p.101-119, 2012b.

SOLER, M.A.G., et al. *Assembly of $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ /polyaniline nanofilms with tuned dipolar interaction*. Journal Of Nanoparticle Research, v.14, n.3, p.1-10, 2012c.

SOLER, M.A.G. & MORAIS, P. *Superparamagnetic iron oxides*. Encycl, 2011b.

SOLER, M.A.G., et al. *Spectroscopic Study of Maghemite Nanoparticles Surface-Grafted with DMSA*. J. Phys. Chem. A, v.115, p.1003-1008, 2011a.

SOLER, M.A.G. et al. *Aging investigation of cobalt ferrite nanoparticles in low ph magnetic fluid*. Langmuir, v. 23, p. 9611-9617, ago. 2007a.

SOLER, M.A.G. *et al. Study of molecular surface coating on the stability of maghemite nanoparticles*. Surf. Sci. 601, 3921–3925, 2007b.

SOLER M.A.G., et al. *Surface passivation and characterization of cobalt-ferrite nanoparticles*. Surface Science. , v.575, p.12 - 16, 2005.

SOLER, M.A.G. et al. *Structural stability study of cobalt ferrite-based nanoparticle using micro Raman spectroscopy*. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, v. 272, p. 2357-2358, 2004.

SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica**, vol. 1 e 2. 9 ed. LTC, 2009.

SOUZA, A.R.C. **Nanocompositos Biopoliméricos com Nanopartículas de Óxido de Ferro Obtidos por Automontagem**. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) - Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2016.

SOUZA, A.R.C; et al; *Water-Soluble Rhodium (II) Carboxylate Adducts: Cytotoxicity of the New Compounds*. Journal of Inorganic Biochemistry, v.64, p-1-5, 1996.

STAMOULI, Q.; et al. *The electron conduction of photosynthetic protein complexes embedded in a membrane*. Febs Letters, v.560, p.109-114, 2004.

STOCKTON, W.B.; RUBNER, M.F.; *“Molecular layer processing of polyaniline via the use of hydrogen bonding interactions.”* MRS Proceedings, Cambridge, v.369, p587-592, 1995.

SWISTON, A. J. *et al. Surface Functionalization of Living Cells with Multilayer Patches*. Nano Lett. v.8, p.4446–4453, 2008.

THOMPSON, M. T., et al. *Tuning compliance of nanoscale polyelectrolyte multilayers to modulate cell adhesion*. Biomaterials v.26, p.6836–6845, 2005.

THORNBERRY, N. A. & LAZEBNIK, Y. *Caspases: Enemies WitHIN*. Science v.281, p.1312- 1316, 1998.

VIALI, W., et al. *Investigation of the molecular surface coating on the stability of*

- insulating magnetic oils*. The Journal of Physical Chemistry C, v.114, n.1, p.179-188, 2010.
- WEINBERG, R.A. **A Biologia Do Câncer**. Porto Alegre: Artmed, p.844, 2008.
- WELCH, D., et al. *Understanding the role of solvation forces on the preferential attachment of nanoparticles in liquid*. ACS Nano, v.10, n.1, p.181-187, 2015.
- WILLARD, M., et al. *Chemically prepared magnetic nanoparticles*. International Materials Reviews, v.49, n.3-4, p.125-170, 2004.
- WOOD, K. C., et al. *Controlling interlayer diffusion to achieve sustained, multiagent delivery from layer-by-layer thin films*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. v.103, p.10207-12, 2006.
- WU, C.L., et al. *Tensile performance improvement of low nanoparticles filled-polypropylene composites*, Composite Science and Technology, v.62, p.1327-1340, 2002.
- ZHANG, J.; et al. *“Natural polyelectrolyte films based on layer-by-layer deposition of collagen and hyaluronic acid.”* Biomaterials, Surrey, v.26, n.16, p.3353-3361, 2005.
- ZHANG, M., SINGH, R. *Mechanical reinforcement of unsaturated polyester by Al₂O₃ nanoparticle*. Materials Letters, v.58, p.408-412, 2004.
- ZHANG, C. X. e S. J. LIPPARD. *New metal complexes as potential therapeutics*. Curr Opin Chem Biol, n.7, v.4, p.481-489, 2003.
- ZYNGIER, S., KIMURA, E., NAJJAR, R. *Antitumor effects of rhodium (II) citrate in mice bearing Ehrlich tumors*. Braz J Med Biol Res, v.22, n.3, p.397-401, 1989.
- ZYNGIER, S.; KIMURA, E.; NAJJAR, R. *Antitumor effects of rhodium (II) citrate in mice bearing Ehrlich tumors*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v.22, p397-401, 1989.