



ENCAPSULAMENTO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E CURCUMINA  
EM SÍLICA VISANDO APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Jamili Altoé da Cunha

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

Priscilla Vanessa Finotelli

Rio de Janeiro  
Fevereiro de 2018

ENCAPSULAMENTO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E CURCUMINA  
EM SÍLICA VISANDO APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Jamili Altoé da Cunha

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

---

Prof<sup>a</sup>. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Priscilla Vanessa Finotelli, D.Sc.

---

Prof<sup>o</sup>. Luiz Augusto Sousa de Oliveira, D.Sc.

---

Prof<sup>o</sup>. Emerson Schwingel Ribeiro, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

FEVEREIRO DE 2018

Cunha, Jamili Altoé da

Encapsulamento de nanopartículas magnéticas e curcumina em sílica visando aplicações biomédicas / Jamili Altoé da Cunha. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2018.

XX, 109 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

Priscilla Vanessa Finotelli

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2018.

Referências Bibliográficas: p. 95-102.

1. Nanopartículas magnéticas. 2. Curcumina. 3. Revestimento com sílica. 4. Funcionalidades biomédicas. I. Ferraz, Helen Conceição *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

*“Não existe alegria maior, nem recompensa maior, do que fazer uma diferença fundamental na vida de alguém.”*

Mary Rose McGeady

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus por ter me dado força e confiança em nunca desistir dos meus sonhos e sempre seguir em frente.

Aos meus pais, Gelson e Lucinda, pelos ensinamentos e exemplo de vida que sempre me deram. Por todo amor, incentivo, apoio, ajuda financeira, compreensão e dedicação que tiveram comigo durante meu mestrado e todos os outros momentos da minha vida.

Às minhas irmãs, Lara e Natali, pelo amor e cumplicidade que sempre tivemos. Lara obrigada pela torcida e por demonstrar felicidade e incentivo aos meus projetos, como este mestrado, e pelo exemplo de trabalhadora e pessoa que és. E Natali, agradeço por estar sempre presente na minha caminhada, tornando-a mais fácil, tranquila e prazerosa, pela compreensão, paciência, ajuda nos estudos, e que apesar das nossas briguinhas de irmãs, nunca perdemos nossa ligação de amizade e carinho que temos uma pela a outra.

Às minhas orientadoras Helen e Priscilla, por terem acreditado em mim e no meu trabalho, por todo conhecimento me concedido, por ter ajudado no meu crescimento intelectual, profissional e pessoal, e por serem exemplos de professoras, de dedicação à seus alunos e trabalhos, e de batalhadoras em alcançar o melhor para seus objetivos.

Aos meus familiares e amigos, por me alegrarem, apoiarem e terem orgulho das minhas escolhas e vitórias.

Aos meus amigos do PEQ, os quais dividi muitos momentos durante esse mestrado. Passamos por períodos difíceis, de adaptação à cidade e ao estilo PEQ de ser, que sem vocês minha caminhada não teria sido tão leve. Mas também tivemos fases de descontração durante nossos passeios, idas aos barzinhos e festas, conversas nos almoços do bandeirão e na salinha de alunos, comemorações no colóquio, nas festas Juninas, Natalinas, de final de ano, e nas conquistas de cada um. Nunca esquecerei de vocês.

Aos meus companheiros de laboratório, principalmente do Grifit (PEQ) e do Laboratório de Nanotecnologia Biofuncional (CCS), pelas conversas e compartilhamento de informações e conhecimentos. Em especial, ao Marcel por ter feito me encantar pela área do meu mestrado e pela ajuda durante os experimentos e discussões dos resultados.

À Lizandra por ter cedido e me ensinado muito sobre a curcumina. E à todos os outros alunos e trabalhadores que contribuíram de certa modo na realização deste trabalho.

Aos meus colegas do CBPF, pelo compartilhamento de ideias em nossas reuniões semanais, troca cultural, disposição em ajudar e amizade que construímos. Em destaque para os alunos Pablo, Richard, Bianca, Raquel e Larissa, e pelos professores Flávio, André e Luiz, os quais colaboraram imensamente na minha pesquisa, aprendizado e convívio.

Às amigas que conquistei na UFRJ, no GOU, e no Rio de Janeiro. Vocês me trouxeram paz, diversão, solidariedade, e gratidão.

À Fátima e Izabel, por terem me acolhido e suprido de alguma forma a falta que sentia da minha terra natal.

Aos professores que tive durante minha vida acadêmica, em especial aos docentes do Programa de Engenharia Química da Coppe/UFRJ, pela colaboração e aprendizado durante este mestrado.

À equipe de técnicos e servidores que me ajudaram seja na área administrativa, acadêmica, de pesquisa, e manutenção.

À Capes e CNPq pelo financiamento através da bolsa de estudos.

À todos quero dizer um MUITO OBRIGADA!!

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

## ENCAPSULAMENTO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E CURCUMINA EM SÍLICA VISANDO APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Jamili Altoé da Cunha

Fevereiro/2018

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

Priscilla Vanessa Finotelli

Programa: Engenharia Química

Nanopartículas específicas e multifuncionais estão cada vez mais presentes no meio biomédico e farmacêutico devido a suas diversas vantagens. Assim, o objetivo deste trabalho consiste em sintetizar e caracterizar nanopartículas magnético-fluorescentes recobertas com sílica e incorporadas com fármaco (curcumina), a fim de avaliar seu potencial como marcadores em imagem por ressonância magnética e em microscópio de fluorescência invertido, hipertermia magnética e direcionador para liberação de fármaco. As nanopartículas foram caracterizadas quanto a sua morfologia, superfície, tamanho, estrutura cristalina, propriedades magnéticas e fluorescentes, e liberação do fármaco. A síntese das nanopartículas de óxido de ferro foi realizada pelo método de coprecipitação e observou-se cristalinidade referente à magnetita/maghemita, características superparamagnéticas, tamanho em torno de 12 nm, e tendência a aglomeração. À medida que houve o encapsulamento dessas nanopartículas magnéticas pela sílica verificou-se que o valor da magnetização diminuiu de 65 A.m<sup>2</sup>/kg para 9 A.m<sup>2</sup>/kg. O estudo da interação entre as nanopartículas magnéticas e a curcumina mostrou que a ligação ocorreu sem a necessidade de um composto intermediário. Por fim, analisou-se o sistema completo proposto neste trabalho, ou seja, nanocápsulas de sílica contendo nanopartículas de óxido de ferro e curcumina. Conseguiu-se encapsular aproximadamente 28% de curcumina nesse sistema e visualizar no microscópio a fluorescência das nanopartículas, proporcionada pela curcumina. Portanto, os resultados demonstraram que essas nanopartículas tem características relevantes para um futuro uso no diagnóstico e tratamento de doenças como câncer e Alzheimer.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

ENCAPSULATION OF MAGNETIC NANOPARTICLES AND CURCUMIN IN  
SILICA AIMING BIOMEDICAL APPLICATIONS

Jamili Altoé da Cunha

February/2018

Advisors: Helen Conceição Ferraz

Priscilla Vanessa Finotelli

Department: Chemical Engineering

Specific and multifunctional nanoparticles are increasingly present in the biomedical and pharmaceutical environment because of their various advantages. Thus, the objective of this work is to synthesize and characterize magnetic-fluorescent nanoparticles coated with silica and incorporated with drug (curcumin) in order to assess its potential as markers in magnetic resonance imaging and inverted fluorescence microscopy, magnetic hyperthermia and targeted drug-delivery. Nanoparticles were characterized as to their morphology, surface, size, crystalline structure, magnetic and fluorescent properties, and drug release. The synthesis of the iron oxide nanoparticles was performed by the coprecipitation method and observed magnetite/maghemite crystallinity, superparamagnetic characteristics, size around 12 nm, and agglomeration tendency. As the nanoparticle was encapsulated by silica, it was found that the magnetization value decreased from 65 A.m<sup>2</sup>/kg to 9 A.m<sup>2</sup>/kg. The study of the interaction between magnetic nanoparticles and curcumin showed that the binding occurred without the need for an intermediate compound. Finally, the complete system proposed in this work was analyzed, that is, silica nanocapsules containing nanoparticles of iron oxide and curcumin. It was possible to encapsulate approximately 28% of curcumin in this system and to visualize in the microscope the fluorescence of the nanoparticles, provided by curcumin. Therefore, the results demonstrated these nanoparticles have relevant characteristics for a future use in the diagnosis and treatment of diseases such as cancer and Alzheimer.



# SUMÁRIO

<b>Capítulo I: Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 Considerações Iniciais.....	1
1.2 Objetivos .....	3
1.2.1 Objetivos Específicos.....	3
<b>Capítulo II: Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>4</b>
2.1 Magnetismo.....	4
2.2 Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro .....	9
2.3 Métodos de síntese de nanopartículas de óxido de ferro .....	11
2.4 Recobrimento das nanopartículas magnéticas .....	14
2.4.1 Sílica .....	16
2.5 Curcumina .....	18
2.6 Aplicações das nanoestruturas magnéticas em processos de bioengenharia .....	20
2.6.1 Contraste em imagem por ressonância magnética .....	22
2.6.2 Hipertermia magnética .....	25
2.6.3 Liberação controlada e sítio-dirigida .....	27
<b>Capítulo III: Metodologia.....</b>	<b>30</b>
3.1 Materiais.....	30
3.1.1 Reagentes e Soluções.....	30
3.1.2 Equipamentos.....	32
3.2 Métodos .....	34
3.2.1 Síntese das nanopartículas de óxido de ferro (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ) .....	34

3.2.2	Revestimento das nanopartículas magnéticas com sílica .....	36
3.2.3	Síntese de nanopartículas de sílica .....	37
3.2.4	Estudo da estabilização das nanopartículas de óxido de ferro com ácido cítrico .....	37
3.2.5	Estabilização das nanopartículas de óxido de ferro com ácido cítrico e posterior recobrimento com sílica .....	38
3.2.6	Adsorção da curcumina nas nanopartículas de óxido de ferro .....	39
3.2.6.1	Adsorção com e sem ácido cítrico .....	39
3.2.6.2	Cinética de adsorção .....	40
3.2.6.3	Isoterma de adsorção .....	41
3.2.6.4	Dessorção da curcumina nas nanopartículas de óxido de ferro .....	41
3.2.7	Adsorção da curcumina nas nanopartículas de óxido de ferro e posterior recobrimento com sílica .....	42
3.3	Caracterizações .....	44
3.3.1	Morfologia .....	44
3.3.2	Estrutura cristalina .....	45
3.3.3	Caracterização da superfície .....	45
3.3.4	Tamanho hidrodinâmico e distribuição do tamanho de partículas .....	46
3.3.5	Espectroscopia de absorção atômica .....	46
3.3.6	Análises no Espectrofotômetro UV-visível .....	46
3.3.7	Análises de fluorescência da curcumina .....	47
3.3.8	Magnetometria .....	48
3.3.9	Hipertermia magnética .....	49
3.3.10	Ensaio de liberação da curcumina .....	49
	<b>Capítulo IV: Resultados e Discussão.....</b>	<b>53</b>
4.1	Síntese de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro .....	53
4.2	Estabilização das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com ácido cítrico .....	57

4.3 Recobrimento das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com sílica .....	61
4.4 Adsorção da curcumina nas nanopartículas magnéticas de óxido de ferro .....	70
4.4.1 Adsorção com e sem ácido cítrico .....	70
4.4.2 Cinética de adsorção .....	71
4.4.3 Isoterma de adsorção .....	72
4.4.4 Dessorção da curcumina nas nanopartículas magnéticas de óxido de ferro ..	73
4.5 Sistema completo de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, curcumina e sílica.....	74
4.6 Análises de fluorescência da curcumina .....	79
4.6.1 Fluorímetro .....	79
4.6.2 Microscópio de fluorescência invertido .....	80
4.7 Magnetometria .....	82
4.8 Hipertermia magnética.....	85
4.9 Ensaio de liberação <i>in vitro</i> da curcumina .....	88
<b>Capítulo V: Conclusões e Sugestões.....</b>	<b>92</b>
5.1 Conclusões .....	92
5.2 Sugestões para trabalhos futuros.....	93
<b>Capítulo VI: Referências Bibliográficas .....</b>	<b>95</b>
<b>Capítulo IV: Apêndice.....</b>	<b>103</b>
Apêndice A.....	103
Apêndice B .....	107
Apêndice C .....	108

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Tipos de magnetismo, enfatizando o comportamento dos seus momentos magnéticos na presença ou não de campo magnético. Adaptado de KOLHATKAR e colaboradores (2013)..... 5
- FIGURA 2: Curvas de magnetização típicas de materiais ferromagnéticos, superparamagnéticos, paramagnéticos e diamagnéticos. Adaptado de KOLHATKAR e colaboradores (2013)..... 8
- FIGURA 3: Estrutura química dos curcuminóides: curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina. Adaptado de WILKEN et al. (2011)..... 19
- FIGURA 4: Equipamento utilizado para obter imagem por ressonância magnética. Adaptado de PARDELL (2017)..... 23
- FIGURA 5: Típica série de imagens de IRM de um rato tratado com NP de óxido de ferro em função do tempo de administração no corpo. O círculo representa o contraste negativo na região da coxa causada pela acumulação de NPM induzida por um ímã, e o retângulo ilustra a região do fígado e baço. Adaptado de UCHIYAMA et al. (2015)..... 25
- FIGURA 6: Esquema do tratamento de câncer por hipertermia magnética: a) introdução do fluido magnético no tumor e b) aplicação do campo magnético alternado próximo ao local debilitado para promover o aumento da temperatura. Adaptado de (FUNDECT, 2013)..... 26
- FIGURA 7: Esquema ilustrativo de liberação de fármacos utilizando NPM como direcionadores do alvo debilitado por meio de um campo magnético externo. Adaptado de ALVES (2012)..... 29
- FIGURA 8: Cromatogramas de HPLC do a) padrão da curcumina com tempo de retenção de 18,35 min; b) separação dos curcuminóides, com destaque para a curcumina (tempo de retenção = 18,79 min). Imagens cedidas pela aluna Lizandra Maurat..... 31
- FIGURA 9: Esquema das sintetizações dos sistemas nanoparticulados..... 44

FIGURA 10: a) suspensão de nanopartículas magnéticas obtidas por coprecipitação em água, b) morfologia dessas nanopartículas (imagem do MET).....	54
FIGURA 11: a) Difratoograma das nanopartículas magnéticas, em que $Y_{obs}$ representa a curva dos dados experimentais, $Y_{calc}$ são os dados após refinamento no WinPLOTR e $Y_{obs}-Y_{calc}$ é a diferença entre as curvas, e os traços rosas retratam as posições de Bragg da magnetita e maghemita. Distribuição de Scherrer do tamanho do cristalito da b) magnetita e c) maghemita.....	54
FIGURA 12: Distribuição do tamanho das nanopartículas de magnetita não estequiométrica, em escala logarítmica: a) amostra sem prévia sonicação e b) com prévia sonicação.....	56
FIGURA 13: Nanopartículas magnéticas tratadas com ácido cítrico e dispersadas em água ultrapura: (a) logo após a mistura e sonicação dos reagentes, (b) 2 h após a mistura, (c) 20 dias após a mistura. NPMac1, NPMac2 e NPMac3 representam as amostras com concentrações de ácido cítrico baixa, intermediária e alta, respectivamente.....	58
FIGURA 14: Nanopartículas magnéticas tratadas com ácido cítrico e dispersadas em etanol: (a) logo após a mistura e sonicação dos reagentes, (b) 1 h após a mistura, (c) 20 dias após a mistura. NPMac4, NPMac5 e NPMac6 representam as amostras com concentrações de ácido cítrico baixa, intermediária e alta, respectivamente.....	58
FIGURA 15: a) Difratoograma das nanopartículas magnéticas puras (NPM_A1) e revestidas com sílica (NPM_B1 e NPM_Bac3), e das nanopartículas de sílica (NPSi); b) Difração de elétrons da amostra NPM_B2.....	63
FIGURA 16: Microscopia eletrônica de transmissão das amostras a) e b) NPM_B1; c) e d) NPM_B2; e) e f) NPM_B3; g) e h) NPM_B4. A coluna 2 são imagens com amplitudes menores a fim de mostrar uma visão geral do tamanho das partículas. Ultrassom foi usado para dispersar as NPM na etapa inicial da síntese das amostras NPM_B1 e NPM_B3, e o sonicador das amostras NPM_B2 e NPM_B4.....	65

FIGURA 17: Espectroscopia por dispersão de energia de raios-X da nanopartícula magnética revestida com sílica (NPM_B2), revelando as distribuições elementares de Fe, Si e O.....	66
FIGURA 18: Microscopia eletrônica de transmissão no modo varredura da nanopartícula magnética revestida com sílica (NPM_B2). Escala de 0,1 $\mu\text{m}$ e 20 nm.....	66
FIGURA 19: Microscopia eletrônica de transmissão das amostras a) e b) NPM_Bac1; c) NPM_Bac3; e d) NPSi. Escala de 20 nm.....	67
FIGURA 20: Imagens das amostras após o revestimento das NPM/ácido cítrico pela sílica. a) NPM_Bac1 (0,25 g de ácido cítrico), e b) NPM_Bac3 (0,025 g de ácido cítrico).....	67
FIGURA 21: Comportamento das curvas de varredura no espectrofotômetro UV-visível das amostras NPM_C1, NPMac_C1 e curcumina pura. Picos em $\lambda = 426$ nm.....	71
FIGURA 22: Cinética de adsorção da curcumina nas nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .....	71
FIGURA 23: Isoterma de adsorção da curcumina nas nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .....	72
FIGURA 24: Adição do hidróxido de amônio na suspensão de curcumina, NPM, água e etanol. A base proporciona a mudança de cor da curcumina.....	74
FIGURA 25: Suspensões da etapa de revestimento da amostra NPM_D3. a) NPM, curcumina, água e etanol; b) NPM, curcumina, água, etanol e subsequente adição de hidróxido de amônio; c) NPM, curcumina, água, etanol e 24 h após adição de hidróxido de amônio.....	75
FIGURA 26: Soluções reacionais do preparo das amostras: a) NPM_C1 (amarela clara) e NPMac_C1 (amarela escura); b) NPM_D1; c) NPMac_D1; d) NPM_D2; e) NPM_D3.....	76
FIGURA 27: Comportamento das curvas de varredura no espectrofotômetro UV-visível das amostras com curcumina, NPM e revestimento com sílica; curcumina	

pura e uma concentração da curva de calibração em meio básico.....	76
FIGURA 28: Microscopia eletrônica de transmissão da amostra NPM_D3 focalizada: a) nas NPM encapsuladas e b) na morfologia esférica das nanoestruturas...	77
FIGURA 29: Distribuição do tamanho das nanopartículas, em escala logarítmica: a) NPM_D2 e b) NPM_D3.....	78
FIGURA 30: Espectro da curcumina em etanol obtido pelo fluorímetro. O primeiro pico refere-se ao $\lambda_{excitação}$ e o segundo ao $\lambda_{emissão}$ .....	79
FIGURA 31: Espectro da curcumina em etanol em diversas concentrações.....	80
FIGURA 32: Imagens do microscópio de fluorescência invertido em $\lambda_{excitação} = 488$ nm das amostras: a) sílica pura (NPSi); b) curcumina pura; c) NPM revestida por sílica (NPM_B2); d) NPM e curcumina revestida por sílica (NPM_D3). As imagens a), b) e c) tiveram aumento de 63x e a imagem d) de 100x. Tempo de exposição à luz foi de 20 ms para as imagens a) e b), e 1,5 s para c) e d).....	81
FIGURA 33: a) Suspensão com nanopartículas magnéticas de óxido de ferro sendo atraídas pelo imã (amostra NPM_A1), b) suspensão com nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com sílica após a aproximação do imã no tubo falcon (NPM_B1).....	82
FIGURA 34: Curvas de magnetização <i>versus</i> campo magnético aplicado à 300 K das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro a) puro (NPM_A1) e b) revestidas por sílica (NPM_B1, NPM_B2 e NPM_Bac3).....	84
FIGURA 35: Perfil da liberação de calor das amostras com diferentes formulações, sob aplicação de campo magnético alternado a 16 kA/m (200 Gauss) e 307 kHz. As amostras estavam na concentração de 10 mg/mL.....	86
FIGURA 36: Solubilidade de 1 mg/mL de curcumina em meio de PBS e SDS. As porcentagens indicam a proporção de SDS (m/v).....	89
FIGURA 37: Comportamento das curvas de varredura no UV-visível referente ao teste de solubilidade da curcumina na solução de PBS/SDS. A porcentagem	

(m/v) relaciona a quantidade de SDS no volume de PBS. Diluição de 50x.....	89
FIGURA A.1: Distribuição de tamanho da amostra NPMac1.....	103
FIGURA A.2: Distribuição de tamanho da amostra NPMac2.....	103
FIGURA A.3: Distribuição de tamanho da amostra NPMac3.....	103
FIGURA A.4: Distribuição de tamanho da amostra NPMac4.....	104
FIGURA A.5: Distribuição de tamanho da amostra NPMac5.....	104
FIGURA A.6: Distribuição de tamanho da amostra NPMac6.....	104
FIGURA A.7: Distribuição de tamanho da amostra NPM_B1.....	105
FIGURA A.8: Distribuição de tamanho da amostra NPM_B2.....	105
FIGURA A.9: Distribuição de tamanho da amostra NPM_B3.....	105
FIGURA A.10: Distribuição de tamanho da amostra NPM_B4.....	106
FIGURA A.11: Distribuição de tamanho da amostra NPM_Bac1.....	106
FIGURA A.12: Distribuição de tamanho da amostra NPM_Bac2.....	106
FIGURA C.1: Curva de calibração da curcumina em meio 50-50 % H <sub>2</sub> O-EtOH, $\lambda = 426$ nm.....	108
FIGURA C.2: Curva de calibração da curcumina em meio 25-75 % H <sub>2</sub> O-EtOH, $\lambda = 426$ nm.....	108
FIGURA C.3: Curva de calibração da curcumina em meio de H <sub>2</sub> O, EtOH e NH <sub>4</sub> OH, $\lambda = 502$ nm.....	109
FIGURA C.4: Curva de calibração da curcumina em meio de PBS-SDS (0,5 %), $\lambda = 426$ nm.....	109
FIGURA C.5: Curva de calibração da curcumina em meio ácido (pH = 4,5 – 5), $\lambda = 426$ nm.....	109



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Quantidade dos reagentes para o revestimento com sílica das nanopartículas de magnetita.....	36
TABELA 2: Quantidade dos reagentes e condições da etapa de estabilização.....	38
TABELA 3: Condições experimentais das sínteses do sistema completo de nanopartículas.....	42
TABELA 4: Parâmetros e componentes dos ensaios de liberação da curcumina.....	50
TABELA 5: Relação entre as amostras e suas respectivas caracterizações.....	52
TABELA 6: Tamanho das nanopartículas magnéticas.....	56
TABELA 7: Potencial zeta da nanopartícula magnética.....	57
TABELA 8: Potencial zeta e tamanho das nanopartículas magnéticas estabilizadas com ácido cítrico.....	60
TABELA 9: Potencial zeta das amostras revestidas com sílica.....	61
TABELA 10: Tamanho das partículas revestidas com sílica.....	68
TABELA 11: Quantificação de nanopartículas magnéticas nas amostras.....	69
TABELA 12: Quantidade de curcumina desorvida das nanopartículas magnéticas em meio ácido (HE) e básico (HEN), e em cada tempo da desorção.....	73
TABELA 13: Quantidade de curcumina encapsulada em sílica.....	76
TABELA 14: Potencial zeta e tamanho das nanopartículas do sistema completo.....	78
TABELA 15: Magnetização de saturação extraída das curvas de MxH.....	84
TABELA 16: Resultados da hipertermia magnética após 20 min de aplicação de um campo magnético alternado. R <sup>2</sup> refere-se ao coeficiente de correlação das retas para o cálculo do SAR.....	87
TABELA 17: Ensaio de liberação da curcumina da amostra NPM_D3.....	91

## NOMENCLATURA

Ac	Ácido cítrico
Biomol	Laboratório de biotecnologia molecular
CBPF	Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CCS	Centro de Ciências da Saúde da UFRJ
Cur	Curcumina
DLS	Dynamic light scattering – Espalhamento de luz dinâmico
DRX	Difração de raios-X
EDS	Espectroscopia por dispersão de energia de raios-X
EtOH	Etanol
f	Frequência
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe <sub>3-x</sub> O <sub>4-y</sub>	Magnetita não estequiométrica
H	Intensidade de um campo magnético externo
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência ( <i>High performance liquid chromatography</i> )
ILP	Perda intrínseca de potência ( <i>Intrinsic loss power</i> )
IMA	Instituto de Macromoléculas
IRM	Imagem por ressonância magnética
LaBiME	Laboratório de Biologia Molecular Estrutural
LABNANO	Laboratório de Nanotecnologia Biofuncional
m	massa
MAG-MATMULT	Laboratório de Magnetometria da Infraestrutura de Pesquisa Multiusuária para Materiais Avançados do CBPF
MET	Microscópio eletrônico de transmissão
MFI	Microscópio de fluorescência invertido
Ms	Magnetização de saturação
NP	Nanopartículas
NPM	Nanopartículas magnéticas
PBS	Tampão fosfato-salino ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
SAR	Taxa de absorção específica ( <i>specific absorption rate</i> )
SDS	Dodecilsulfato de sódio ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
Si	Sílica

SQUID	Magnetometria - <i>Superconducting Quantum Interference Device</i>
STEM	Microscopia eletrônica de transmissão de varredura
t	Tempo
T	Temperatura
T <sub>c</sub>	Temperatura de Curie ferromagnética
T <sub>1</sub>	Relaxação longitudinal
T <sub>2</sub>	Relaxação transversal
T <sub>2</sub> *	Curto tempo de relaxação transversal
TEOS	Tetraetilortossilicato
UV-visível	Espectroscopia de absorção no UV-visível
v	volume
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-x
W	Potência

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\zeta$	Potencial zeta
$\lambda$	Comprimento de onda
$\rho$	Massa específica
$\sigma$	Desvio padrão

# CAPÍTULO I

## *Introdução*

### **1.1 Considerações iniciais**

A capacidade de manipular as propriedades dos materiais em escala muito pequena faz com que a nanotecnologia tenha aplicações em diversos setores tecnológicos. Em medicina, a nanotecnologia pode atuar, por exemplo, na reparação celular, como biomateriais e em técnicas terapêuticas; em energia, na construção de células combustíveis e baterias; em eletrônica, no armazenamento de dados; em meio ambiente, nos processos de reciclagem; e em indústria automobilística/aeronáutica, na criação de sistemas miniaturizados de observação (BEDÊ, 2010).

Atualmente, a medicina apresenta-se como uma das mais promissoras áreas de aplicação nanotecnológica, devido principalmente à busca por novos tratamentos de doenças que estão cada vez mais presentes na vida da população. Tem-se como exemplo o câncer, o qual é uma das principais causas de morte no mundo e, segundo a Organização Mundial da Saúde, o número de casos vem crescendo de forma preocupante, podendo chegar em duas décadas a um aumento de 70 % de pacientes debilitados por esta doença. Enfermidades relacionadas à saúde mental também atingem uma grande parcela da sociedade, sendo cerca de 40 milhões de pacientes por todo o mundo. Nessa quantidade, o Alzheimer corresponde à 60 – 80 % dos casos, o que acarreta uma maior preocupação, já que ainda não se conhece muitas formas de prevenção e cura (CHENG et al., 2015).

Neste cenário, cientistas do mundo inteiro vem pesquisando e desenvolvendo tecnologias capazes de diagnosticar com maior precisão e tratar essas doenças de maneira menos invasiva e com uma diminuição e/ou ausência dos efeitos colaterais. Além disso, a tendência é uma democratização desses serviços, ou seja, busca-se materiais e terapias que forneçam qualidade de vida e saúde com menores encargos financeiros, para que assim, esses serviços possam atender toda população. Dessa forma, pesquisas que visam alternativas baratas, seguras e acessíveis para o diagnóstico e tratamento de várias doenças são de grande valia para alcançar uma melhora na expectativa de vida da sociedade.

Dentre os materiais nanoestruturados utilizados para atender as necessidades e

dificuldades enfrentadas pela área médica, as nanopartículas magnéticas merecem destaque. Essas nanopartículas vem sendo amplamente utilizadas em direcionamento e controle de fármacos, técnicas de diagnóstico e imagem, magnetohipertermia, biosseparação, entre outros. Nanopartículas de óxido de ferro, como a magnetita, podem apresentar comportamento superparamagnético, magnetização de saturação e susceptibilidade magnética elevadas, os quais propiciam seu uso em tais propósitos. Entretanto, essas nanopartículas tendem a se agregarem e, por isso é comum recobri-las com um material não magnético.

Entre os possíveis revestimentos, a sílica tem vantagens consideráveis, como por exemplo, promover a dispersão das nanopartículas em meio líquido, ser biocompatível e ter a facilidade de funcionalização (FERREIRA, 2009; OLIVEIRA et al., 2016). E para agregar mais valor à esses tipos de nanopartículas, a adição e/ou funcionalização destas com outras moléculas, como por exemplo, fármacos, direcionadores celular e fluoróforos, pode ser implementada. Uma molécula interessante para tal vantagem é a curcumina, a qual apresenta diversas propriedades medicinais, como exemplo, ser antioxidante, agente quelante, anti-inflamatória e anticancerígena, além de ser um fluoróforo natural, podendo ser usada para aumentar o contraste do nanomaterial em imagens de fluorescência (NGUYEN et al., 2016). Tais características ajudam a tornar esse sistema nanoparticulado ainda mais específico e multifuncional.

Sendo assim, este trabalho consistiu em sintetizar e caracterizar nanopartículas magnético-fluorescentes recobertas com sílica e incorporadas com fármaco, a fim de avaliar seu potencial como agentes de contraste em IRM (imagem por ressonância magnética) e em MFI (microscópio de fluorescência invertido), como direcionadores para liberação de fármaco, e uso em magnetohipertermia. Este trabalho utilizou nanopartículas de óxido de ferro como o material magnético e curcumina como o fármaco e o agente fluorescente. Em vista disso, contou-se com o suporte dos seguintes laboratórios: Grifit (PEQ/UFRJ), Laboratório de Nanotecnologia Biofuncional (CCS/UFRJ), LABNANO (CBPF), MAG-MATMULT (CBPF), Laboratório de Bioquímica (CCS/UFRJ), Laboratório de Biotecnologia Molecular (Biomol) (PEQ/UFRJ), Laboratório de Biologia Molecular Estrutural (LaBiME) (CCS/UFRJ) e Laboratório de Doenças Neurodegenerativas da Biofísica (CCS/UFRJ).

## 1.2 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi a obtenção de nanopartículas magnético-fluorescentes recobertas com sílica e incorporadas com fármaco, a fim de atuarem como agentes de contraste e de hipertermia magnética e como direcionadores para liberação de fármaco.

### 1.2.1 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas magnéticas (NPM) de óxido de ferro que tenham cristalinidade semelhante à magnetita e estejam estáveis em suspensão, com característica superparamagnética e funcionais para uso em hipertermia magnética.
- Desenvolver e caracterizar um sistema composto por NPM e curcumina (como fármaco e fluoróforo) revestidos por sílica.
- Avaliar a interação da curcumina com a NPM e a sílica, verificando sua liberação em testes *in vitro*.
- Investigar o uso dessas nanopartículas como contraste na imagem de instrumentos magnéticos e fluorescentes.

## Capítulo II

### *Revisão Bibliográfica*

Esse capítulo inicia abordando diversos conceitos relacionados aos materiais magnéticos a fim de oferecer um embasamento teórico para o próximo tópico: nanopartículas magnéticas de óxido de ferro. Apresenta-se também algumas metodologias utilizadas na síntese desses materiais. Em seguida, é discutido o recobrimento dessas nanopartículas por meio de outros compostos, dando ênfase à sílica. Além disso, são retratadas as propriedades farmacológicas e fluorescentes da curcumina. E por último, são expostas as possíveis aplicações do nanomaterial produzido neste trabalho, em especial no contraste em imagem por ressonância magnética, hipertermia magnética e liberação controlada e sítio-dirigida de fármaco.

#### 2.1 Magnetismo

As propriedades magnéticas dos materiais surgem devido ao movimento das partículas que apresentam massa e cargas elétricas, tais como elétrons, prótons e íons positivos e negativos (AKBARZADEH; SAMIEI; DAVARAN, 2012). Este fenômeno acontece pelo fato de existir momentos magnéticos ( $\mu$ ), os quais, dependendo do ordenamento e comportamento coletivo dos mesmos, possibilitam o surgimento dos tipos de estados magnéticos dos materiais (FARIA; LIMA, 2005; FILHO, 2014).

Os momentos magnéticos atômicos têm seu comportamento alterado quando estão na presença de um campo magnético externo de intensidade  $\vec{H}$ , apresentando como resposta a indução magnética,  $\vec{B}$ , (FERREIRA, 2009), a qual é elucidada pela Equação 1:

$$\vec{B} = \vec{H} + 4.\pi.\vec{M} \quad \text{Eq. (1)}$$

onde  $\vec{M}$  é a magnetização do material, interpretada como uma manifestação macroscópica da média volumétrica de um conjunto de momentos magnéticos.

De acordo com essa resposta ao campo magnético externo, os materiais podem ser classificados em cinco tipos básicos: diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos, antiferromagnéticos e ferrimagnéticos. A Figura 1 ilustra os dipolos magnéticos (menor unidade fundamental do magnetismo) e o comportamento dos



momentos magnéticos desses tipos básicos, na presença ou ausência de um campo externo aplicado.

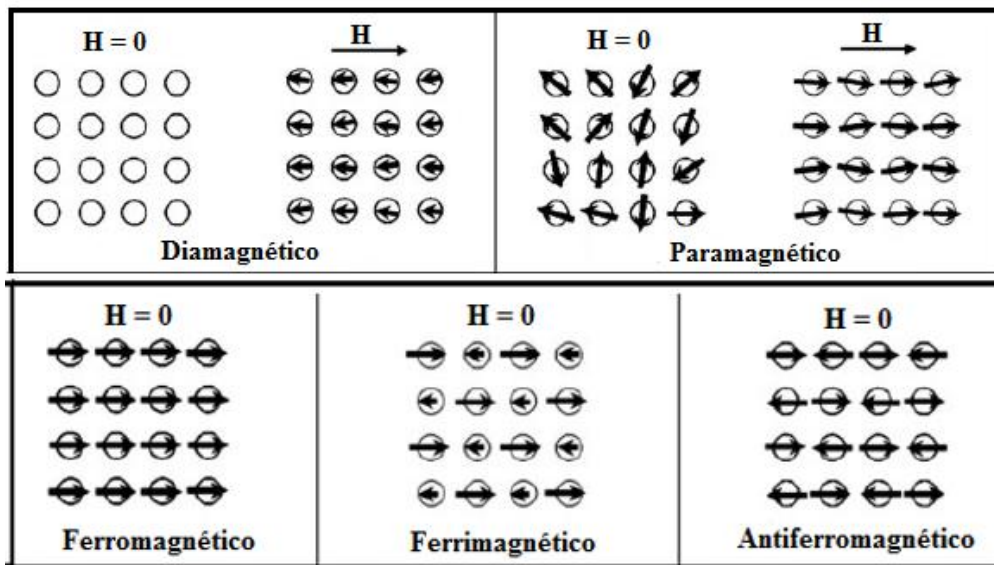


Figura 1: Tipos de magnetismo, enfatizando o comportamento dos seus momentos magnéticos na presença ou não de campo magnético. Adaptado de KOLHATKAR e colaboradores (2013).

O diamagnetismo é observado principalmente em materiais que possuem subníveis eletrônicos completos, os quais seus momentos magnéticos estão emparelhados e se cancelando um com outro. Por este motivo, não possuem magnetização na ausência de campo, sendo considerado uma forma muito fraca de magnetismo. Entretanto, quando em presença de um campo magnético externo, os momentos de dipolo magnético se alinham no sentido contrário do campo, ocasionando uma força de repulsão (FERREIRA, 2009; KOLHATKAR et al., 2013). Esta forma de magnetismo pode aparecer em todos materiais que tem cargas em movimento na presença de um campo magnético, porém se o material possuir qualquer outra forma de magnetismo, este será mais efetivo e esconderá o efeito da repulsão (AKBARZADEH; SAMIEI; DAVARAN, 2012). Os materiais diamagnéticos mais notáveis são os metais bismuto, chumbo, prata e cobre, além disso, tem-se a água, madeira, compostos orgânicos e outros.

Os outros comportamentos magnéticos são observados em materiais que possuem elétrons não emparelhados nos níveis eletrônicos, principalmente quando eles estão nas camadas 3d e 4f de cada átomo (AKBARZADEH; SAMIEI; DAVARAN, 2012). O paramagnetismo ocorre em materiais cujos átomos apresentam momentos magnéticos intrínsecos (momento de spin) que não interagem entre si, e por isso, se orientam de forma

aleatória na ausência de um campo externo, não havendo magnetização macroscópica líquida. Todavia, na presença de um campo magnético, os momentos tendem a se alinhar na direção e sentido deste campo (FERREIRA, 2009; KOLHATKAR et al., 2013). Tem-se como exemplos de materiais paramagnéticos o titânio, alumínio e oxigênio. Como no diamagnetismo, o paramagnetismo também pode ser encoberto por outros efeitos magnéticos quando em temperaturas baixas (FARIA; LIMA, 2005).

Diferentemente dos comportamentos diamagnéticos e paramagnéticos, os quais apresentam magnetização apenas na presença de um campo magnético externo, nos materiais ferromagnéticos e ferrimagnéticos é observado uma magnetização também na ausência de campo externo, ou seja, apresentam um magnetismo espontâneo e permanente. Nestes casos, os momentos de dipolos magnéticos podem ser espontaneamente alinhados devido a presença de um campo magnético interno, denominado campo molecular, o qual é melhor explicado pela mecânica quântica. Já o antiferromagnetismo ocorre em materiais que não tem magnetização espontânea macroscópica a baixas temperaturas, mas possuem momentos magnéticos ordenados (FARIA; LIMA, 2005).

Os materiais ferromagnéticos, em geral, possuem momentos atômicos magnéticos alinhados e de mesma magnitude, e suas estruturas cristalinas possibilitam interações de acoplamento paralelo entre os momentos. Quando próximos de um campo externo, os dipolos alinham-se na direção deste campo, e ao remover o campo aplicado, o material continua mantendo grande parte da magnetização (AKBARZADEH; SAMIEI; DAVARAN, 2012; KOLHATKAR et al., 2013). A magnetização desses materiais varia com a temperatura, pois a energia térmica provoca um desvio do alinhamento, diminuindo assim, a magnetização. Esta mudança de magnetização varia de um valor máximo à  $T = 0$  K até o valor zero na temperatura denominada Temperatura de Curie ferromagnética ( $T_c$ ). Em  $T_c$  o alinhamento dos dipolos magnéticos desaparece e, acima dela, o material se comporta como paramagnético (FARIA; LIMA, 2005; FERREIRA, 2009). O material ferromagnético mais conhecido é o próprio ferro.

Os materiais que apresentam momentos magnéticos de mesma magnitude, porém rearranjados de forma antiparalela são conhecidos como antiferromagnéticos, e como exemplo tem-se a hematita ( $\alpha$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). Pelo fato dos momentos assumirem orientações antiparalelas, esses materiais possuem magnetização totalmente nula. Por sua vez, os

materiais ferrimagnéticos, como a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), também possuem íons magnéticos que se orientam antiparalelamente, entretanto, estes têm magnitudes diferentes, o que proporciona uma magnetização total não nula. Esses dois tipos de comportamentos magnéticos podem se comportar como paramagnéticos em temperaturas acima da Temperatura de Néel (AKBARZADEH; SAMIEI; DAVARAN, 2012; FARIA; LIMA, 2005).

Certos materiais (ferromagnéticos ou ferrimagnéticos), quando estão com uma dimensão muito pequena (na ordem de nanômetros), podem apresentar um outro comportamento magnético, denominado de superparamagnetismo. Este comportamento é caracterizado por exibir respostas magnéticas similares aos materiais paramagnéticos, uma vez que não apresenta magnetização na ausência de um campo magnético externo, porém, em contato com um campo externo, promove uma mudança mais rápida nos momentos magnéticos quando comparado com os paramagnéticos, tornando a partícula espontaneamente magnetizada na direção do campo (ESTELRICH, 2015; KOLHATKAR et al., 2013). Este fenômeno ocorre por meio da influência das flutuações térmicas sobre os momentos magnéticos de partículas monodomínio menores que um certo diâmetro crítico, e é prevaletido acima de uma temperatura denominada de Temperatura de Bloqueio ( $T_B$ ) e abaixo da Temperatura de Curie ( $T_B < T < T_C$ ) (FERREIRA, 2009; FRANCISQUINI; SCHOENMAKER; SOUZA, 2016). Tal comportamento magnético é visado em aplicações biomédicas pelo fato das nanopartículas superparamagnéticas perderem a magnetização quando o campo magnético é removido, dessa forma, elimina-se a principal força motriz responsável pela agregação. Além disso, este comportamento possibilita um efetivo controle das propriedades magnéticas, o que é de grande valia no uso em medicina (KOLHATKAR et al., 2013).

Uma maneira de constatar as propriedades magnéticas dos materiais é por meio das curvas de magnetização, as quais são criadas a partir da relação da magnetização ( $M$ ) com o campo magnético aplicado ( $H$ ), como mostrado na Figura 2. Estas curvas costumam ser representadas por curvas de histerese, como acontece em materiais ferromagnéticos e ferrimagnéticos, e neste caso, alguns termos magnéticos são evidenciados durante a magnetização e desmagnetização do material (KOLHATKAR et al., 2013). Inicialmente, na ausência de um campo magnético externo, os momentos

magnéticos se encontram desorientados, possuindo magnetização mínima ou nula. Ao aplicar um campo, os momentos de cada domínio (pequena região onde os momentos se alinham e formam uma magnetização espontânea) se alinham na direção do campo até que todos os dipolos magnéticos estejam alinhados, promovendo uma magnetização máxima, conhecida como magnetização de saturação ( $M_s$ ). Reduzindo a zero o campo aplicado, percebe-se que há uma magnetização remanescente no material ( $M_r$ ), a qual é o máximo valor de magnetização que este material pode ter na ausência desse campo. Para zerar a magnetização, é necessário aplicar um campo invertido ou desmagnetizante, denominado de campo coercivo ( $H_c$ ). Aumentando-se o campo desmagnetizante, alcança-se uma magnetização máxima de polaridade oposta, e repetindo o processo no sentido contrário, obtém-se uma curva fechada, conhecida como ciclo de histerese (FARIA; LIMA, 2005; FERREIRA, 2009).

A Figura 2 também ilustra as curvas de magnetização dos materiais superparamagnéticos, paramagnéticos e diamagnéticos. O superparamagnetismo é representado por uma curva sigmoideal, porém não apresenta histerese e, por isso, o campo coercivo e a magnetização remanescente são nulos. Essas características possibilitam o uso desse tipo de material em diversas aplicações, principalmente biomédicas, uma vez que as nanopartículas perdem a magnetização ao remover a aplicação do campo magnético externo, diminuindo assim, o principal meio de agregação das mesmas, e também apresentam uma forte resposta ao campo aplicado, possibilitando um melhor controle de suas propriedades magnéticas (KOLHATKAR et al., 2013).

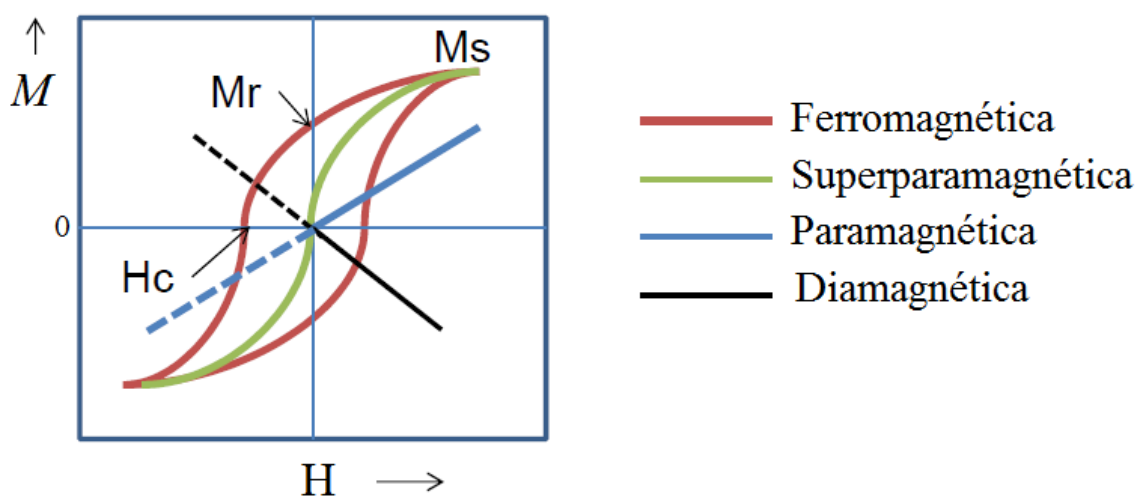


Figura 2: Curvas de magnetização típicas de materiais ferromagnéticos, superparamagnéticos, paramagnéticos e diamagnéticos. Adaptado de KOLHATKAR e colaboradores (2013).

## 2.2 Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro

A nanotecnologia vem se expandindo nas mais diversas áreas de conhecimento por apresentar características únicas, não presentes em materiais massivos (“*bulk*”) (WU; HE; JIANG, 2008). A dimensão diminuta das nanopartículas (NP) e suas propriedades ópticas, elétricas e magnéticas tornam-nas muito atrativas na nanoengenharia de superfícies e produção de nanoestruturas funcionais, em especial, relacionadas à biociência e medicina. Dentre as NPs aplicadas no meio biomédico, destacam-se as nanopartículas magnéticas, as quais, por meio de suas características magnéticas, possibilitam técnicas de diagnóstico e terapêuticas menos invasivas que as convencionais (ALVES, 2012).

Nanopartículas magnéticas possuem elementos magnéticos que podem ser manipulados por um campo externo, apresentam tamanhos que variam de 1 à 100 nm, tem superfície hidrofílica e alta razão superfície/volume, podem estar em estado superparamagnético, entre outras características físicas e químicas que são fortemente influenciadas pelo seu tamanho, morfologia e estrutura cristalina (BEDÊ, 2010; FRANCISQUINI, SCHOENMAKER, SOUZA, 2016). Os principais elementos que podem formar esse tipo de nanopartícula são o ferro, cobalto, níquel e seus compostos. As nanopartículas de óxido de ferro apresentam certas vantagens em relação aos outros metais, uma vez que exibem biocompatibilidade, estabilidade, simples síntetização, boas propriedades magnéticas, biodegradabilidade, não toxicidade, baixo custo de produção, entre outras (ALVES, 2012; SUN; LEE; ZHANG, 2008; TOMBÁ CZ et al., 2015). Em contrapartida, nanopartículas feitas a partir de outros compostos, tais como Co e FePt, apesar de terem valores mais elevados de magnetização de saturação e melhor resposta magnética, possuem natureza tóxica, o que os impossibilitam de estarem presentes nas aplicações nanobiomédicas (TOMBÁ CZ et al., 2015).

Os minerais de óxidos de ferro encontrados na natureza se apresentam geralmente em oito arranjos cristalográficos distintos. Dentre eles, a hematita ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) e maghemita ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) vem sendo mais visadas no ramo de bionanomedicina, devido à suas propriedades bioquímicas, magnéticas e catalíticas, as quais conferem características únicas aos produtos e técnicas desenvolvidos para esta área científica (WU et al., 2015).

A hematita é um óxido estável de cor preta à marrom avermelhada, e possui grande utilidade em catálise, pigmentação e sensores gasosos devido à sua alta resistência à corrosão, característica semicondutora e baixo custo (WU et al., 2015). A magnetita é um dos minérios mais empregados na obtenção do ferro, apresenta coloração preta e uma estrutura cúbica de espinélio invertido, e se difere dos demais óxidos por ser um óxido misto, ou seja, contem em sua estrutura o ferro em dois estados de oxidação (divalente e trivalente) e, por isso, também pode ser representada como  $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ . Já a maghemita tem coloração amarronzada e possui a mesma composição que a hematita, entretanto, sua estrutura cristalina se assemelha a da magnetita, sendo conhecida como espinélio defeituoso, já que carece de íons  $\text{Fe}^{2+}$  necessários para o preenchimento completo dos sítios tetraédricos e octaédricos da estrutura e, por essa característica, a maghemita pode ser considerada uma magnetita totalmente oxidada (BEDÊ, 2010; WU et al., 2015).

O estudo desses óxidos em escala nanométrica vem ganhando destaque devido as suas propriedades magnéticas e a vasta aplicabilidade que estas características proporcionam ao material. Geralmente, a  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  apresenta fraco ferromagnetismo ou antiferromagnetismo em temperatura ambiente e baixa magnetização de saturação ( $M_s$ ), os quais impossibilitam seu uso em nanomedicina com magnetismo. Em contrapartida, a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e a  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  exibem comportamento ferrimagnético em temperatura ambiente, possuem  $M_s$  relativamente alto e podem manifestar o superparamagnetismo mesmo em temperatura ambiente, sendo que para a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  este comportamento ocorre quando as partículas dispõem de um tamanho menor que 15 nm, dessa forma, uma maior aplicabilidade no setor biomédico e biológico é disponibilizada (TOMBÁČZ et al., 2015; WU; HE; JIANG, 2008).

Para a utilização *in vivo*, busca-se que essas nanopartículas sejam estáveis em solução fisiológica, tenham baixa adsorção proteica e permaneçam tempo suficiente no organismo para viabilizar sua funcionalidade. Uma importante característica dessas nanopartículas magnéticas, a qual interfere tanto essas situações citadas quanto sua absorção celular, distribuição no organismo e farmacocinética envolvida, é seu tamanho adquirido após a síntese. De acordo com o tamanho da partícula, é possível estimar sua localização e tempo de meia-vida dentro do organismo (ALVES, 2012). Por exemplo, nanopartículas menores que 6 nm (diâmetro hidrodinâmico) tendem a ser eliminadas pelo sistema renal, as com dimensão de 20 à 100 nm permanecem na corrente sanguínea por mais tempo e podem ser acumuladas em tecidos tumorais, já as acima de 100 nm são

capturadas pelo sistema reticuloendotelial (RES) e levadas para o fígado e baço (MARTINS, 2017). De modo geral, quanto menor o tamanho das nanopartículas, mais rápidas serão sua reatividade e biodegradação pelo corpo (ZHANG et al., 2010).

Normalmente, o metabolismo das nanopartículas de óxido de ferro inicia-se por sua captura pelos macrófagos presentes no fígado, baço, linfonodos e medula óssea. No caminho da endocitose celular, as nanopartículas são confinadas nos lisossomos, em que são submetidas à efeitos de pH ácido, hidrolases lipossomais e retidas por quelantes de ferro. Quando estão em pH fisiológico e na presença de oxigênio molecular, as nanopartículas de óxido de ferro oxidam-se para que todos os íons de ferro estejam no estado de ferro III, sendo este, o estado de oxidação fisiológico preferencial do ferro. Entretanto, o  $\text{Fe}^{3+}$  é altamente reativo e pode induzir atividade catalítica e, por isso, proteínas e quelantes carregadores de ferro se ligam fortemente ao ferro a fim de limitar sua reatividade e reduzir a formação de produtos hidrolíticos, os quais podem causar danos nas células. Tais ligações permitem uma transferência de ferro mais segura e garantem um estoque adequado de ferro intracelular. Vale ressaltar também que a ligação do ferro nessas proteínas é reversível e, portanto, havendo necessidade fisiológica, o ferro pode ser recuperado novamente. Essas peculiaridades biológicas do ferro tornam as nanopartículas de óxido de ferro menos tóxicas quando comparadas a outros nanocristais inorgânicos (SOUZA; MOHALLEM; SOUSA, 2011).

### **2.3 Métodos de síntese de nanopartículas de óxido de ferro**

A síntese de nanopartículas magnéticas vem sendo estudada por vários anos, a fim de obter metodologias mais simples, eficientes no controle do tamanho e da forma, e que forneçam nanopartículas estáveis, biocompatíveis, monodispersas, com boa cristalinidade e propriedades magnéticas diferenciadas (MARTINS, 2017; WU; HE; JIANG, 2008). Os procedimentos químicos são os mais utilizados para garantir essas características citadas acima. Dentre os mais comuns, pode-se mencionar a decomposição térmica, microemulsão, síntese hidrotermal, sol-gel e coprecipitação (ALVES, 2012).

O procedimento da decomposição térmica consiste na decomposição de precursores, como  $\text{Fe}(\text{acac})_3$  (acetilacetato de ferro III),  $\text{Fe}(\text{CO})_5$  (pentacarbonil de ferro) ou complexos de  $\text{Fe}(\text{oleato})_3$ , em um meio contendo uma solução orgânica e

surfactantes, sob elevada temperatura. As nanopartículas formadas são monodispersas, com estreita distribuição de tamanho e de alta qualidade. No entanto, para aplicações biomédicas, as NPMs devem ser submetidas a um tratamento de purificação (ALVES, 2012; WU et al., 2015; WU; HE; JIANG, 2008). Já o processo de microemulsão baseia-se na mistura líquida de óleo, água e surfactante, em que metais ou sais, usados para formação das NPMs, ficam retidos na fase aquosa, e na fase oleosa normalmente contém uma mistura de diferentes hidrocarbonetos e oleofinas. Apesar deste método necessitar de um tratamento para estabilizar as NPMs formadas, nele é possível controlar o tamanho e forma das NPMs ao variar a natureza do surfactante e a concentração dos reagentes, por exemplo (WU et al., 2015). Na síntese hidrotermal as nanopartículas de óxido de ferro podem ser produzidas por duas rotas: hidrólise e oxidação ou neutralização de hidróxidos de metais. Em ambas as rotas, as reações acontecem em meio aquoso e sob temperatura e pressão elevadas (entre 130 e 250 °C, e 0,3 e 4 MPa). As NPMs sintetizadas por este método apresentam excelente cristalinidade e por isso, podem ter melhores propriedades magnéticas (LAURENT et al., 2008; WU; HE; JIANG, 2008). No processo sol-gel ocorre reações de hidrólise e condensação de precursores, tais como alcóxidos de ferro e sais de ferro, para a formação das nanopartículas. Devido a estas reações acontecerem em temperatura ambiente, é necessário que as nanopartículas sejam submetidas à tratamentos térmicos ao final, a fim de adquirirem cristalinidade desejada. Por apresentar vários ligantes hidrofílicos em sua superfície, as NPMs sintetizadas por este método podem ser dispersadas tanto em meio aquoso quanto em solventes polares (LAURENT et al., 2008; WU et al., 2015). O método de coprecipitação foi o escolhido para sintetizar as NPMs usadas neste trabalho e, por isso, será mais detalhado a seguir.

A coprecipitação é provavelmente a técnica mais simples, rápida, barata e eficiente para sintetizar nanopartículas de óxido de ferro. Basicamente, a metodologia empregada consiste em misturar sais de ferro ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ ) e colocá-los em uma solução alcalina à temperatura baixa (geralmente até 70°C) e sob agitação, promovendo, assim, a formação e precipitação das partículas (ALVES, 2012). Neste processo, dois estágios aparecem: a nucleação e o crescimento. O ápice da nucleação ocorre quando a concentração das espécies atinge a supersaturação crítica. Em seguida, decorre a outra etapa, na qual há um crescimento lento dos núcleos para a superfície do cristal por meio da difusão dos solutos. Visando uma monodispersividade das partículas, é preferível que



essas etapas aconteçam separadamente (LAURENT et al., 2008). O mecanismo de reação deste procedimento está descrito simplificadaamente na Equação 2.



Neste processo diversos parâmetros experimentais influenciam o tamanho, forma, composição, comportamento magnético e homogeneidade das nanopartículas magnéticas. Podem-se citar como exemplos, o pH reacional, razão molar dos íons de ferro, tipo de base utilizada e velocidade de agitação (FERREIRA, 2009). De acordo com o pH do meio, uma das etapas da síntese é favorecida, ou seja, em pH menores que 11 a nucleação é mais presente, enquanto que acima desse valor o crescimento que é beneficiado (WU et al., 2015). Também não é comum realizar a coprecipitação em meio ácido, pois há a formação de goetita ao invés de magnetita (ALVES, 2012). Já a razão molar  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  indica um maior grau de pureza da magnetita quando se respeita a estequiometria desses íons. Para a magnetita, essa razão estequiométrica equivale à 1:2, porém como o  $\text{Fe}^{2+}$  é instável, sua concentração vai diminuindo no decorrer do experimento e, por isso muitos trabalhos sugerem seu uso em excesso para manter a estequiometria correta. A natureza da base utilizada influencia principalmente a característica magnética da nanopartícula, uma vez que bases fortes, como o hidróxido de sódio, promovem um pH mais elevado, facilitando a geração de complexos de ferro hidratado e assim, impedindo a formação da magnetita. A dimensão das nanopartículas, de certo modo, pode ser controlada por meio da velocidade de agitação, em que velocidades mais altas produzem partículas com diâmetros menores (FERREIRA, 2009).

A coprecipitação é um dos métodos de síntese de nanopartículas magnéticas mais utilizados, pois apresenta inúmeras vantagens, tais como: grande quantidade de partículas podem ser sintetizadas e, por isso, a produção em larga escala é possível; a síntese é realizada em baixas temperaturas; o processo é de baixo custo; e as nanopartículas apresentam homogeneidade química, biocompatibilidade, solubilidade em água, alta magnetização de saturação e superfície com propriedades hidrofílicas, características relevantes para aplicações biomédicas (FERREIRA, 2009; WU et al., 2015; WU; HE; JIANG, 2008). Entretanto, este procedimento ainda se depara com alguns desafios, incluindo a larga distribuição do tamanho da partícula, agregação, pouco controle da forma e baixa cristalinidade (ALVES, 2012; WU; HE; JIANG, 2008).

## 2.4 Recobrimento das nanopartículas magnéticas

Para o emprego de nanopartículas magnéticas em aplicações biomédicas é essencial que essas nanopartículas estejam adequadas ao meio biológico e mantenham estabilidade de suas propriedades magnéticas. Para tal, utiliza-se o revestimento com outros materiais como forma de proteção de suas superfícies e garantia de aplicabilidade nesta área.

As nanopartículas magnéticas apresentam certas limitações práticas quando utilizadas em aplicações biológicas e farmacológicas. Dentre esses empecilhos, destacam-se a tendência de se aglomerarem a fim de minimizar a energia livre superficial; baixas estabilidade e dispersividade em determinados solventes (em especial, em água); alta atividade química; facilidade em ser oxidada em ar (principalmente a magnetita) e, conseqüente perda de propriedades magnéticas; absorção pelo corpo; e biodegradação em meio biológico, ocasionando perda de suas propriedades originais (JIANG et al., 2012; WU et al., 2015; WU; HE; JIANG, 2008). Dessa forma, proporcionar um recobrimento apropriado das mesmas mostra-se como uma boa alternativa para amenizar e/ou eliminar essas barreiras.

Em nanopartículas híbridas (materiais magnético e de recobrimento) aplicadas em biomedicina, o revestimento apresenta diversas funções (TOMBÁ CZ et al., 2015), como descritas a seguir:

- Promove a estabilização coloidal em condições fisiológicas, ou seja, evita a agregação em pH biológico e meio salino;
- Inibe a corrosão e oxidação das nanopartículas de óxido de ferro ao formar uma camada passiva sobre o núcleo magnético;
- Favorece a adsorção específica de proteínas no meio biológico, facilitando assim, a biodistribuição das nanopartículas pelo corpo;
- Fornece grupos reativos em sua superfície, os quais promovem a funcionalização com fármacos e moléculas de direcionamento;
- Controla as interações biointerfaciais, tais como, absorção pelo sistema reticuloendotelial, tempo de circulação na corrente sanguínea, eficiência na interiorização das nanopartículas, toxicidade e biocompatibilidade.

Existem diversos materiais capazes de realizar, em sua maioria, tais tarefas descritas acima. Em geral, materiais orgânicos ou inorgânicos são comumente utilizados para revestir a superfície de nanopartículas de óxido de ferro. Os materiais orgânicos possibilitam a preservação das características magnéticas das nanopartículas, são biocompatíveis e biodegradáveis, e providenciam grupos funcionais reativos (carboxila, amino, aldeído, etc.). Exemplos desses materiais são moléculas pequenas e surfactantes, como ácido oleico, ácido cítrico, fosfanatos, aminoácidos e silanos; polímeros naturais e sintéticos, como dextran, quitosana, alginato, poli(etilenoglicol), poli(metilmacrilato); e biomoléculas, como proteínas e anticorpos. Os materiais inorgânicos providenciam às nanopartículas estabilização, biocompatibilidade, funcionalização e antioxidação. Pode-se citar como exemplos a sílica; metais e não-metais (ouro, prata, carbono); e óxidos metálicos e sulfetos (ZnO, CaO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ZnS) (LAURENT et al., 2008; WU; HE; JIANG, 2008).

A literatura vem retratando vários estudos relacionados às nanopartículas magnéticas recobertas com diversos materiais. SOARES e colaboradores (2016) trabalharam com nanopartículas de óxido de ferro e as estabilizaram por meio de uma bicamada de ácido oleico. Os resultados de potencial zeta e MET evidenciaram que, na concentração de 96% de ácido oleico, as NPM se mostraram menos agregadas e mais estáveis em pH fisiológico, além disso, concluíram que as NP formadas apresentavam pouca toxicidade (em concentrações baixas) e tinham potencial para uso em magnetohipertermia e em imagem por ressonância magnética (IRM). Por sua vez, ZHANG e colaboradores (2010) sintetizaram NP de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> por coprecipitação, e as mantiveram desagregadas através do revestimento com poli(vinilpirrolidona) (PVP). Como resultados, os autores obtiveram NP dispersas e homogêneas, observaram que o PVP serviu como estabilizador e controlador do tamanho das partículas e, em testes *in vivo*, as NPs puderam ser concentradas no alvo escolhido por meio da aplicação de um ímã permanente, e exibiram contraste negativo em IRM. Já LEE e colaboradores (2013) integraram NP de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e PDDF (polímero fluorescente) juntamente com sílica para formar uma nanoestrutura *core-shell* com propriedades magnéticas e fluorescentes, além disso, funcionalizaram a superfície da sílica com ácido fólico, a fim de direcionar as NP para células cancerígenas. As NPs obtidas apresentaram boa monodispersividade e tamanho uniforme, as propriedades magnéticas e ópticas foram preservadas, e a funcionalização foi eficiente, uma vez que as NPs exibiram baixa citotoxicidade, alta

permeabilidade intracelular e direcionaram-se para o tumor. E LEE e colaboradores (2008) desenvolveram nanopartículas magnéticas de ferritas de cobalto, incorporaram isotiocianato de rodamina (fluorescente) e revestiram com sílica, por fim, modificaram a superfície desse conjunto com poli(etilenoglicol) (PEG), com intuito de tornar essas NP mais biocompatíveis e solúveis em água. Os resultados mostraram nanopartículas com alto valor de relaxação e longa meia-vida ( $T_{1/2}$ ) de ~2,5 h, características estas alcançadas devido à modificação da superfície com sílica e PEG.

Em vista dos recobrimentos citados acima, esta dissertação optou por abordar a sílica como material de revestimento, a qual será discutida no próximo tópico.

### **2.4.1 Sílica**

A sílica é um composto inorgânico originado a partir da combinação de silício e oxigênio, e é constituído de grupos siloxanos (Si-O-Si) em seu interior e grupos silanóis (Si-OH) na superfície (ALFAIA, 2015). A sílica possui diversas propriedades relacionadas à sua superfície que a tornam uma substância versátil e de grande aplicabilidade como revestimento para outras partículas, como as NP magnéticas.

O recobrimento de nanopartículas de óxido de ferro com sílica é bastante visado principalmente pelo fato da sílica possibilitar a estabilização dessas nanopartículas em condições aquosas/fisiológicas. Esta estabilização decorre de duas formas: a sílica reduz as interações dipolo-magnético entre as nanopartículas magnéticas ao formar uma camada ao redor delas; e, por ser carregada negativamente, a sílica aumenta a repulsão coulombiana das nanopartículas (LAURENT et al., 2008). Além dessa característica, a sílica possui outras propriedades que a faz ainda mais atrativa como um material de revestimento. A sílica é um material de custo relativamente baixo, de fácil sintetização, exibe baixa ou nenhuma citotoxicidade, é compatível com várias substâncias químicas e moléculas para uso em bioconjugação, a espessura e tamanho de sua estrutura são relativamente fáceis de se controlar no momento de sua preparação, tem uma superfície inerte e capaz de ser funcionalizada, é capaz de encapsular moléculas funcionais, protege as NPM contra degradação química e oxidação, entre outras vantagens (HUI et al., 2011; JIANG et al., 2012; SUN, LEE, ZHANG, 2008; WU, HE, JIANG, 2008).

Atualmente, as abordagens mais utilizadas para revestimento de sílica sobre nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> incluem os métodos de microemulsão e processo sol-gel (também conhecido como método de Stöber). O método de microemulsão utiliza três componentes principais: água, óleo e surfactante. Este método emprega micelas ou micelas inversa para confinar e controlar o recobrimento das NPs, e produz, normalmente, partículas com estrutura *core-shell* (núcleo-casca), o qual possui um núcleo magnético e um envoltório de sílica e surfactante. No método de Stöber, a sílica é formada através da hidrólise e condensação de um precursor sol-gel, e ocorre no próprio meio reacional onde se encontram as nanopartículas magnéticas. Também produz estrutura *core-shell*, porém com a superfície da sílica mais pura, a qual favorece bioaplicações (HUI et al., 2011; JIANG et al., 2012). Este último procedimento será adotado neste trabalho e, por isso, mais detalhes do processo estão descritos a seguir.

No método de Stöber, o diâmetro das partículas de sílica é controlado pelas contribuições dos processos de nucleação e crescimento, os quais apresentam espécies precursoras e a supersaturação necessária para a formação das partículas (IBRAHIM; ZIKRY; SHARAF, 2010). Geralmente, o precursor inicial é o composto orgânico tetraetilortosilicato, ou formalmente, tetraetoxissilano (TEOS - Si(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>), o qual é hidrolisado em solução etanólica. Neste método as principais reações que ocorrem são a hidrólise (Equação 3) e condensação (Equação 4), as quais representam a nucleação e o crescimento, respectivamente (NEVES, 2014).



Durante a hidrólise, o grupo etóxi do TEOS reage com a água para formar o intermediário ((RO)<sub>3</sub>Si-OH), substituindo o grupo etóxi por hidroxila. Imediatamente, a reação de condensação acontece e, nesta etapa, a hidroxila do intermediário reage tanto com a hidroxila de outro intermediário (Equação 4a), fazendo a “condensação aquosa”, quanto com o grupo etóxi de outra molécula de TEOS (Equação 4b), proporcionando a “condensação alcoólica”. Ambas reações formam pontes de Si-O-Si, porém a taxa de reação da “condensação aquosa” é muito maior que a “condensação alcoólica” (IBRAHIM; ZIKRY; SHARAF, 2010).

A reação global da síntese de nanopartículas de sílica, considerando o TEOS como precursor, é dada a seguir:



As reações que ocorrem durante a síntese são bastante lentas, por isso é muito comum adicionar catalisadores, sendo estes, ácidos ou básicos. Em suma, quando as reações são realizadas em meio ácido, a sílica se forma como uma matriz compacta com baixo volume de poros (microporos). Já em meio básico, as partículas de sílica crescem mais esfericamente e com maior porosidade (mesoporosas) (BENVENUTTI; MORO; COSTA, 2009). Analisando esses critérios, este trabalho optou por realizar a síntese em meio básico, utilizando o hidróxido de amônio como catalisador, já que se pretende obter um conjunto *core-shell* (núcleo-casca) com as nanopartículas de óxido de ferro e sílica.

## 2.5 Curcumina

A curcumina é um composto polifenólico natural derivado do rizoma da planta *Curcuma longa*, comumente conhecida como açafrão-da-índia. Esta planta contém uma classe de compostos conhecida como curcuminóides, a qual inclui a curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina, cujas estruturas químicas estão esquematizadas na Figura 3. Dentre esses curcuminóides, a curcumina é o principal composto e o responsável por fornecer a esta especiaria cor amarelada e propriedades terapêuticas (WILKEN et al., 2011). Em relação à composição química, a curcumina exibe tautomerismo ceto-enol, no qual prevalece a forma ceto em soluções ácidas ou neutras, e a forma enol em meios alcalinos (ANAND et al., 2007). Além disso, suas subunidades estruturais, metileno  $\alpha$  próximo às carbonilas e hidroxilas fenólicas, promovem sua ação antioxidante, e a presença dos átomos de oxigênio em distância adequada a configura como um potencial agente quelante de metais (SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas com intuito de investigar as atividades biológicas e farmacológicas da curcumina e a aplicação deste composto no tratamento de inúmeras doenças. As propriedades terapêuticas visadas em medicina incluem ações anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígena, antidiabética, antifúngica, antiviral, antifibrótica, analgésica e antisséptica, as quais auxiliam no tratamento de doenças

neurológicas (como Alzheimer), inflamatórias e cardiovasculares, além de diabetes, câncer, entre outras (GANGWAR et al., 2013; HATAMIE et al., 2015; KITTURE et al., 2012; MULIK; MAHADIK; PARADKAR, 2009). O trabalho de BHANDARI e colaboradores (2016) abordou a propriedade anti-inflamatória da curcumina. Os autores funcionalizaram nanopartículas de magnetita com curcumina e observaram a ação anti-inflamatória dessas nanopartículas contra o agente inflamatório bifenilo policlorado (PCB) em células endoteliais da veia umbilical humana. Os resultados mostraram que a curcumina serviu tanto como estabilizador das nanopartículas de magnetita quanto como protetor celular contra inflamação. Já SAIKIA e colaboradores (2016) avaliaram a ação da curcumina em células saudáveis e cancerígenas. O trabalho consistiu em sintetizar nanopartículas de óxido de ferro, ligá-las com curcumina e revesti-las com amido com ajuda de reticulantes. As análises de citotoxicidade realizadas em linfócitos humanos (células saudáveis) e em células cancerígenas (câncer de mama e de fígado) mostraram que a curcumina apresentava toxicidade apenas nas células tumorais.

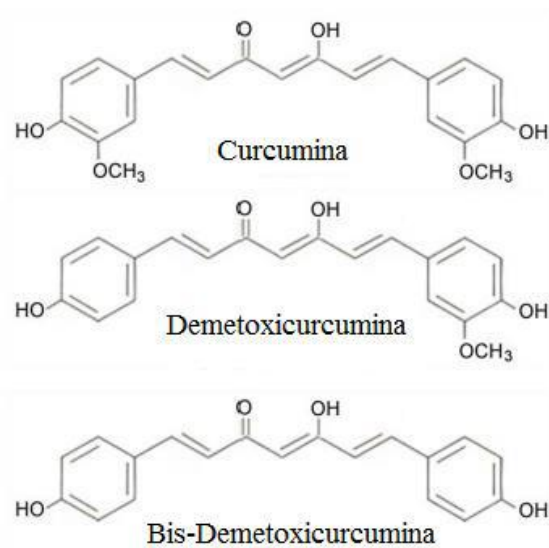


Figura 3: Estrutura química dos curcuminóides: curcumina, demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina. Adaptado de WILKEN et al. (2011).

Além das características supracitadas, a curcumina ainda possui propriedades fluorescentes, em que apresenta comprimento de onda de excitação ( $\lambda$ ) entre 405 e 430 nm e  $\lambda$  de emissão entre 480 e 540 nm. Dessa forma, há a possibilidade de utilizá-la como agente de contraste em equipamentos de imagem por fluorescência (LACHOWICZ et al., 2017). Alguns autores também vêm abordando essa propriedade em seus trabalhos. Como exemplo, tem-se os trabalhos de NAGAHAMA; SANO; KUMANO (2015) e NGUYEN et al., (2016), os quais utilizaram a curcumina encapsulada como marcador de células

cancerígenas. Os resultados evidenciaram a presença da curcumina especialmente dentro do citoplasma dessas células e sua forte fluorescência, observada nas imagens por fluorescência. Pesquisadores da USP de São Carlos vem estudando o uso da curcumina no combate às larvas do mosquito transmissor da dengue. O estudo tem como base a propriedade fotodinâmica da curcumina, a qual, em ambientes luminosos, induz a curcumina a produzir espécies tóxicas para as larvas. Dessa forma, a ideia é adicionar esse fluoróforo na água de criadouro do mosquito, possibilitando sua ingestão pelas larvas e, na presença de luz solar, ocasionar a liberação dessas toxinas dentro do intestino das larvas, extinguindo-as (TOLEDO, 2015).

A eficiência da curcumina como fármaco ainda enfrenta alguns desafios devido, principalmente, à sua natureza hidrofóbica. Esta peculiaridade implica baixas biodisponibilidade, absorção e atividade, degradação em pH alcalino, fotodegradação, alta taxa de metabolismo pelo sistema reticuloendotelial e rápida eliminação pelo corpo (ANAND et al., 2007; GANGWAR et al., 2013; MULIK; MAHADIK; PARADKAR, 2009). Para superar esses obstáculos, muitos estudos vem focando na estratégia de “aprisionar” a curcumina em outras estruturas, tais como, polímeros, micelas e sílica (WANI et al., 2011). Uma dessas pesquisas foi desenvolvida por OLIVEIRA e colaboradores (2016), o qual formularam um sistema de nanopartículas contendo curcumina e sílica aminofuncionalizada com folato (agente de alvo), e verificaram a citotoxicidade dessas nanopartículas em células normais e cancerígenas. Os resultados mostraram que a sílica foi eficiente como portadora da curcumina e suporte para o folato, permitindo que a curcumina e o folato fizessem seus papéis corretamente, ou seja, respectivamente, eliminasse preferencialmente as células cancerígenas e guiasse as nanopartículas até as células tumorais.

## **2.6 Aplicações das nanoestruturas magnéticas em processos de bioengenharia**

Os primeiros trabalhos relatando a aplicação biomédica de partículas magnéticas começaram a ser desenvolvidos a partir da década de 60. Desde então, muitos outros avanços tecnológicos e pesquisas nesta área se sucederam, visando, principalmente, a utilização *in vitro* e *in vivo* desses materiais (MEDEIROS, 2010).



As propriedades magnéticas únicas das nanopartículas de óxido de ferro aumentaram ainda mais o enfoque desses tipos de nanoestruturas em aplicações farmacológicas e em bioengenharia, especialmente, relacionadas à separação de compostos, terapia e diagnóstico de doenças. Por apresentar um tamanho reduzido, esses materiais são favorecidos como carregadores de fármacos, já seu comportamento superparamagnético proporciona uma melhora nas imagens por ressonância magnética, e sua resposta à um campo externo propicia seu uso em uma terapia denominada hipertermia magnética. Além dessas serventias, as nanopartículas de óxidos de ferro também podem ser administradas em reparação de tecidos, separação de biomoléculas e poluentes, imunoenaios, desintoxicação de fluidos biológicos, imobilização celular e enzimática, entre outras (HOLA et al., 2015; MEDEIROS, 2010; NAQVI et al., 2010).

Vários pesquisadores vêm retratando em seus trabalhos a aplicabilidade das nanopartículas magnéticas, mostrando ser bastante diversificada. No trabalho de CHERTOK e colaboradores (2008), por exemplo, os autores utilizaram as nanopartículas magnéticas como carregadoras e direcionadoras de fármaco, e as monitoraram por meio de IRM para que pudessem alcançar tumores cerebrais através da aplicação de um campo magnético externo. Os testes *in vitro* e *in vivo* mostraram que essas nanopartículas puderam ser acumuladas nas células cancerígenas e monitoradas dentro do organismo por um método não invasivo (IRM). Já SUNG e colaboradores (2009) investigaram a marcação de células-tronco mesenquimais humanas com nanopartículas magnético-fluorescentes em monitoramento por imagem de ressonância magnética (IRM) e imagens ópticas. Os autores conseguiram produzir nanopartículas com propriedades superparamagnéticas e fluorescentes, as quais foram úteis no monitoramento das células-tronco transplantadas. Além disso, observou-se que essas nanopartículas se acumulavam no citoplasma das células-tronco e não causavam toxicidade à elas. CHENG e colaboradores (2015) investigaram a capacidade de nanopartículas compostas por óxido de ferro e curcumina de diagnosticar a doença de Alzheimer, por meio de ressonância magnética. Neste caso, a curcumina serviu para ligar-se às placas amilóides do cérebro, comumente encontradas em pacientes com a doença, e as nanopartículas magnéticas para aumentar o contraste dessas placas nas imagens da ressonância. Os resultados evidenciaram que as partículas sintetizadas possuíam baixa toxicidade e eficácia na penetração da barreira hematoencefálica em teste de permeabilidade *in vitro*.

Recentemente, pesquisadores da *University of Minnesota* desenvolveram um método para auxiliar o transplante de órgãos. Este método consiste em utilizar o mesmo processo de vitrificação já usado na preservação de órgãos transplantados, porém na etapa de reaquecimento do órgão, ao invés de empregar um método convencional, como o convectivo, utiliza-se uma solução de crioprotetor e nanopartículas de óxido de ferro revestidas com sílica como forma de armazenamento e transferência de calor para o órgão. Esta mudança proporcionou uma melhora no armazenamento de tecidos em volumes de amostras maiores, aumentou a viabilidade do tecido, diminuiu o risco de cristalização do tecido durante o reaquecimento, entre outras vantagens capazes de otimizar o traslado entre a doação e implementação do órgão no corpo humano (MANUCHEHRABADI et al., 2017).

Atualmente, o termo teranóstico vem ganhando destaque tanto nos estudos biomédicos quanto nas aplicações clínicas. Esse conceito equivale à combinação de terapia e diagnóstico em um mesmo procedimento médico, o qual torna a investigação e o tratamento de certas doenças menos invasivos, mais precocemente, e assim, mais efetivos (NGUYEN et al., 2016). Além disso, é considerado uma medicina personalizada, uma vez que a dosagem e distribuição da droga pode ser adaptada de acordo com a resposta do paciente ao procedimento (KNEŽEVIĆ et al., 2013). Dessa forma, no contexto de um sistema magnético, pode-se aplicar a imagem por ressonância magnética no monitoramento e diagnóstico da doença e, em seguida e/ou simultaneamente, utilizar um procedimento de tratamento da doença, como a magnetohipertermia e a liberação controlada e localizada de um medicamento. Essas aplicações serão melhor discutidas a seguir.

### **2.6.1 Contraste em imagem por ressonância magnética**

A imagem por ressonância magnética foi desenvolvida por Lauterbur na década de 70, e desde então muitos outros estudos vem sendo dissertados, a fim de entender e aprimorar essa técnica (MEDEIROS, 2010). A IRM é um método baseado nos princípios da ressonância magnética nuclear e muito aplicada na área médica, principalmente por ser uma forma de diagnóstico não invasivo, o qual consegue fornecer imagens com contraste entre diferentes tecidos moles do corpo, sendo, portanto, muito útil em exames neurológicos, musculoesqueléticos, cardiovasculares e oncológicos (BEDÊ, 2010). O

diagnóstico é obtido por meio da imagem do paciente gerada por um equipamento semelhante ao da Figura 4.

A imagem por ressonância magnética tem como princípio as propriedades de relaxação dos átomos de hidrogênio da água quando estes estão sob ação de um campo magnético externo. O corpo do ser humano é composto por várias moléculas de água, as quais contem prótons do hidrogênio. Dessa forma, quando é aplicado um forte campo magnético próximo a uma pessoa, como é no caso de um equipamento de IRM, os momentos magnéticos desses prótons conseguem se alinhar ao campo. Entretanto, à medida que pulsos de radiofrequência são empregados no sistema, o alinhamento desses prótons em relação ao campo vai sendo alterado e energia vai sendo absorvida. Ao desligar o campo, os momentos magnéticos desses prótons retornam ao seu estado original, liberando energia na forma de radiação eletromagnética, sendo esta capaz de ser detectada e convertida em uma imagem (BEDÊ, 2010; FERREIRA, 2009; SUN; LEE; ZHANG, 2008). A distinção entre os tecidos nas imagens geradas pelo equipamento é possível, pois os prótons de cada tecido do corpo retornam ao seu estado de equilíbrio à taxas diferentes (BEDÊ, 2010; FERREIRA, 2009).

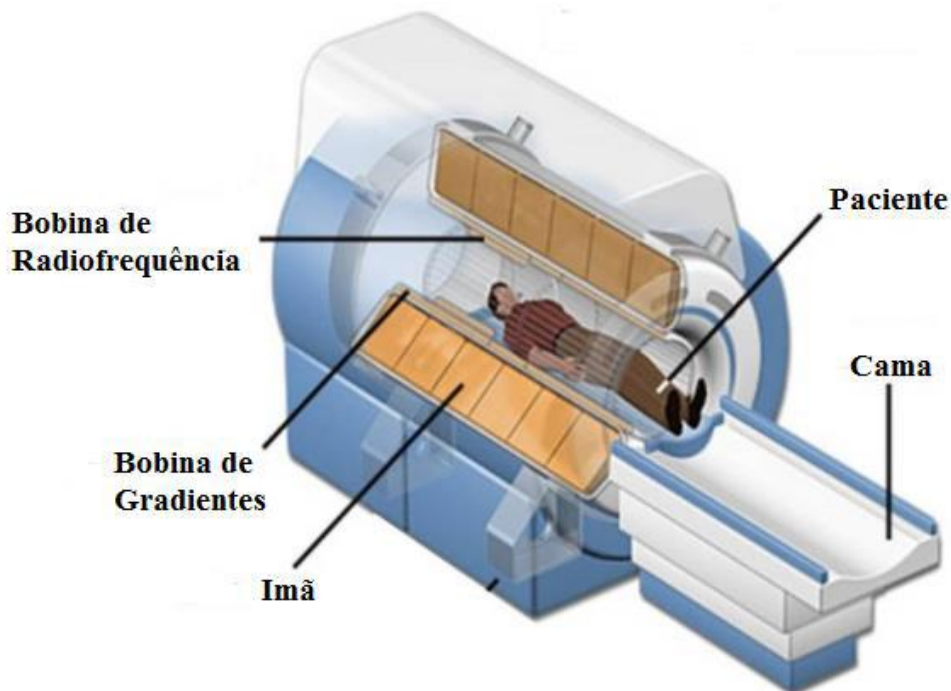


Figura 4: Equipamento utilizado para obter imagem por ressonância magnética. Adaptado de PARDELL (2017).

O fenômeno de relaxação é dito como o processo pelo qual os prótons retornam ao seu estado inicial, sendo que dois tipos desse fenômeno estão presentes na IRM: a relaxação longitudinal ( $T_1$ ) e relaxação transversal ( $T_2$ ) (FERREIRA, 2009).

Para obter imagens com melhores contrastes entre os tecidos, é comum utilizar agentes que realçam este contraste, facilitando assim, o diagnóstico requerido. Nanopartículas de óxido de ferro são um excelente exemplo de agente de contraste para IRM, devido às suas propriedades de encurtamento de  $T_1$ ,  $T_2$  e  $T_2^*$  (curto tempo de relaxação transversal), as quais distorcem o campo magnético local e alteram os tempos de relaxação dos prótons do hidrogênio da água da vizinhança (SOUZA; MOHALLEM; SOUSA, 2011; SUN; LEE; ZHANG, 2008). O processo de diminuição do  $T_1$  requer uma interação próxima entre os prótons e os agentes de  $T_1$ , porém a espessura do revestimento das nanopartículas pode impedir essa aproximação. Já o efeito das nanopartículas magnéticas no  $T_2$  é ocasionado pela grande diferença de susceptibilidade entre as partículas de óxido de ferro e a vizinhança, a qual proporciona um gradiente de campo magnético microscópico. A difusão dos prótons por esse gradiente gera uma perda irreversível da coerência de fase, ocasionando a diminuição de  $T_2$  (SUN; LEE; ZHANG, 2008). Como resultado dessa redução de intensidade de sinal, o local do corpo onde contém as NPM fica mais escuro que a vizinhança, e sendo assim, as NPM atuam como contraste negativo na IRM (CHERTOK et al., 2008; SOUZA; MOHALLEM; SOUSA, 2011).

No trabalho de UCHIYAMA e colaboradores (2015) foi possível verificar a melhora das imagens de ressonância magnética por meio da aplicação de nanopartículas de óxido de ferro no corpo. Os autores injetaram nas veias de ratos uma solução contendo nanopartículas magnéticas funcionalizadas com grupos hidrofílicos. Eles constataram que as NPM não apresentaram toxicidade e foram concentradas espontaneamente no fígado, rins e baço, resultando em forte contraste negativo nas IRM. Além disso, observaram que as NPM foram eliminadas dos rins e bexiga em poucos dias, já no fígado e baço em 30 dias percebia-se o desaparecimento e em 140 dias, a ausência foi completa. Outra averiguação feita pelos autores foi a possível concentração das NPM na coxa do rato por meio da aplicação por 2 horas de um ímã na região, mostrando seu potencial como carregadores magnéticos de drogas em alvos específicos. A Figura 5 ilustra esses resultados supracitados.

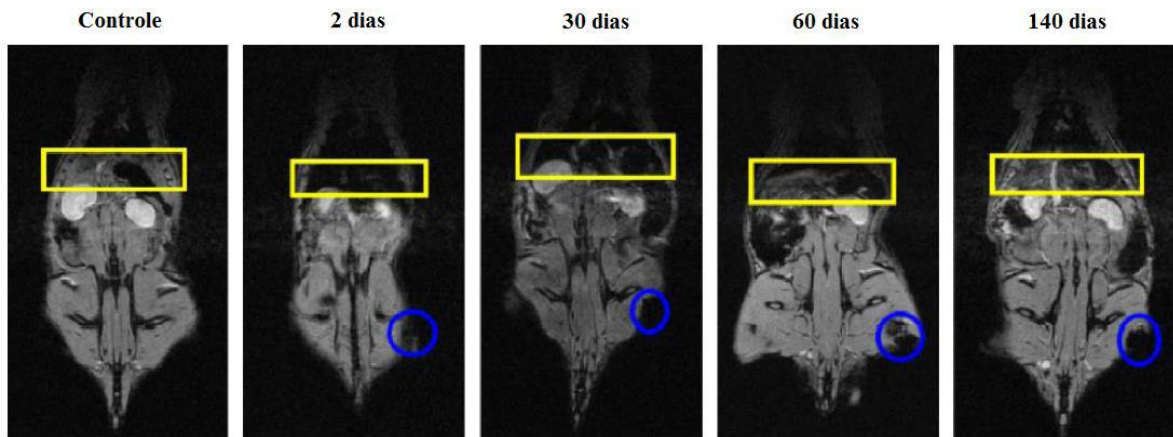


Figura 5: Típica série de imagens de IRM de um rato tratado com NP de óxido de ferro em função do tempo de administração no corpo. O círculo representa o contraste negativo na região da coxa causada pela acumulação de NPM induzida por um imã, e o retângulo ilustra a região do fígado e baço. Adaptado de UCHIYAMA et al. (2015).

Em geral, a administração das nanopartículas magnéticas no corpo é intravenosa, pois assim todas as células vitais conseguem receber esses agentes de contraste através da circulação sanguínea. Entretanto, para o caso de imagens das articulações é preferível que as NPM sejam injetadas direto na articulação almejada (ALVES, 2012; BEDÊ, 2010). Em relação ao tempo de permanência no organismo, as NPM continuam nos tecidos por períodos mais longos quando comparadas com agentes de contraste comuns, e além disso, por serem superparamagnéticas, produzem uma melhor relaxação de prótons do que os materiais paramagnéticos. Ambas características possibilitam que uma menor dosagem de NPM no corpo humano seja suficiente para obter bons contrastes nas imagens de ressonância, diminuindo assim, a probabilidade do surgimento de efeitos tóxicos adversos (AKBARZADEH; SAMIEI; DAVARAN, 2012; ALVES, 2012).

### 2.6.2 Hipertermia magnética

Nas últimas décadas, o número de casos de pessoas com câncer vem crescendo constantemente, fazendo com que essa doença se torne a segunda causa de morte no mundo (DIAS et al., 2017). Por esse motivo, muitas técnicas de tratamento vêm sendo desenvolvidas a fim de obter uma eficácia clínica e um tratamento com o mínimo de efeitos colaterais nos pacientes. Uma linha muito promissora é a terapia por meio do aquecimento dos tumores, a qual inclui a hipertermia magnética, tratamento com água quente, radiação infravermelha e ultrassom. Dentre estas, a hipertermia magnética é a

mais eficiente em destruir seletivamente as células cancerígenas, mesmo em locais profundos do corpo, e causar menos efeitos adversos (SOUZA; MOHALLEM; SOUSA, 2011).

O tratamento de câncer por magnetohipertermia consiste em aplicar na região do tumor um campo magnético alternado externo capaz de promover um aumento de temperatura entre 41 e 45 °C por interação com nanopartículas magnéticas (DIAS et al., 2017). Geralmente, nanopartículas magnéticas, como as de óxido de ferro, são utilizadas neste procedimento. Por esses materiais apresentarem característica superparamagnética, à medida que estão na presença de um campo alternado de alta frequência, a direção de sua magnetização altera entre as orientações paralelas e antiparalelas, permitindo que a energia magnética das partículas se converta em calor e, conseqüentemente, originando o aquecimento do local (AKBARZADEH; SAMIEI; DAVARAN, 2012; MARTINS, 2017), como esquematizado na Figura 6.

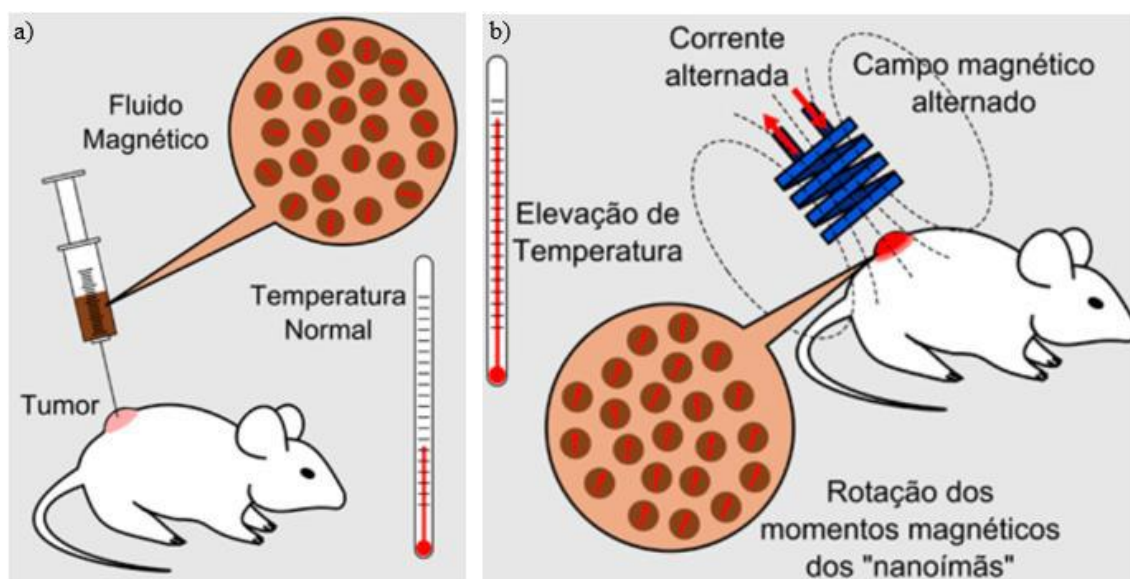


Figura 6: Esquema do tratamento de câncer por hipertermia magnética: a) introdução do fluido magnético no tumor e b) aplicação do campo magnético alternado próximo ao local debilitado para promover o aumento da temperatura. Adaptado de (FUNDECT, 2013).

A faixa de temperatura que o processo de hipertermia magnética induz, de certo modo, não é prejudicial às células saudáveis do corpo, havendo somente casos de danos reversíveis à elas. Por outro lado, os tecidos tumorais são mais sensíveis às mudanças de temperatura, sendo que um aquecimento em torno de 43 °C já possibilita a morte dessas células. Esse fato acontece, pois as células cancerígenas são mais facilmente aquecidas do que as células vizinhas, já que os vasos sanguíneos e nervosos do tumor são pouco

desenvolvidos (SOUZA; MOHALLEM; SOUSA, 2011). Além disso, os tumores vivem em condições de baixa quantidade de oxigênio (hipóxia), a fim de permanecerem em pH ácido, porém quando a temperatura é elevada, essas células não conseguem manter este pH adequado e perecem (ALVES, 2012).

A eficiência do tratamento por magnetohipertermia depende da capacidade do material magnético gerar calor suficiente para destruir as células cancerígenas. Um indicador utilizado para avaliar esse potencial é a taxa de absorção específica (SAR – termo inglês para *specific absorption rate*). A Equação 6 define essa grandeza como a potência gerada pela nanopartícula, normalizada pela massa desse material.

$$\text{SAR} = \frac{W}{m} = C \frac{m'}{m} \left( \frac{dT}{dt} \right) \quad \text{Eq. (6)}$$

onde C é a capacidade calorífica do conjunto (nanopartícula + solvente), m' é a massa do conjunto e  $\frac{dT}{dt}$  é taxa de variação da temperatura (T) em função do tempo (t).

Para aplicação em hipertermia magnética, é desejável utilizar nanopartículas que forneçam uma SAR elevada, e com isso, uma menor quantidade desse nanomaterial será necessária para obter uma boa eficácia na terapia. Alguns parâmetros, tais como estrutura e propriedades magnéticas da partícula, e condições do campo magnético alternado, podem influenciar no valor do SAR. Dessa forma, a otimização desse indicador pode ser realizada controlando esses parâmetros no momento da síntese das nanopartículas e/ou na etapa de aplicação do campo magnético externo (MARTINS, 2017).

### **2.6.3 Liberação controlada e sítio-dirigida**

Diversas doenças requerem um tratamento muito rigoroso e que gera nos pacientes muitos efeitos colaterais, uma vez que os medicamentos convencionais administrados geralmente atingem também os órgãos saudáveis. Por esse motivo, desde a década de 50, vários estudos vem sendo feitos para conhecer e aprimorar a técnica de liberação controlada de fármacos (ALVES, 2012; SOUZA; MOHALLEM; SOUSA, 2011). Nesse método, o agente ativo é liberado de forma gradual, independente de fatores externos e com uma cinética de liberação bem definida (BEDÊ, 2010).

Na liberação de drogas no organismo pela forma convencional, os agentes ativos circulam por toda parte do corpo e sua concentração sofre um aumento até atingir um máximo e, então, decai exponencialmente à medida que é excretada e/ou convertida metabolicamente, necessitando, assim, de doses mais altas e/ou administradas em menos espaço de tempo. Esse comportamento ocasiona oscilações dos níveis da droga, os quais podem ultrapassar a faixa de concentração ótima e, conseqüentemente, o medicamento pode causar efeitos tóxicos ou tornar-se terapêuticamente ineficaz. Por sua vez, a liberação controlada promove uma distribuição do fármaco de maneira mais ponderada e uma concentração dentro da faixa de efeito terapêutico ótima (BEDÊ, 2010; MEDEIROS, 2010).

Outras vantagens do sistema de liberação controlada são: liberação localizada do fármaco para uma região específica do corpo; manutenção dos níveis do medicamento por um tempo mais prolongado; diminuição significativa da toxicidade; menor número de administrações; melhor interação com a parede celular e bacteriana; substâncias hidrofílicas e lipofílicas podem ser incorporadas; preservação dos fármacos que são rapidamente destruídos pelo corpo, como proteínas; aumento do conforto do paciente (BEDÊ, 2010; MEDEIROS, 2010; SOUZA; MOHALLEM; SOUSA, 2011).

As nanopartículas magnéticas trabalham como excelente aliadas no aperfeiçoamento da técnica de liberação controlada, uma vez que auxiliam no transporte e direcionamento do fármaco, promovem um aumento da liberação, e servem como contraste em imagem de IRM, localizando o medicamento dentro do corpo.

A função de carregadores e direcionadores do fármaco é realizada por meio da aplicação de um campo magnético externo, o qual arrasta o fluido magnético com o medicamento para o alvo específico, como mostrado na Figura 7, proporcionando a concentração do fármaco no local exato da patologia e a liberação sítio-dirigida (FERREIRA, 2009; KNEŽEVIĆ et al., 2013; SUN; LEE; ZHANG, 2008). Esse direcionamento também pode ser feito por meio da ligação do sistema NPM e fármaco com um agente-alvo, como por exemplo o ácido fólico, em que é receptado por células cancerígenas e leva consigo as NPM e o medicamento para dentro do tumor (FRANCISQUINI; SCHOENMAKER; SOUZA, 2016; NAQVI et al., 2010). Em geral, a efetividade do transporte dentro do organismo depende de parâmetros físicos como a intensidade do campo magnético aplicado e características das nanopartículas, de



parâmetros hidrodinâmicos, como taxa de fluxo de sangue e concentração do ferrofluido, e de parâmetros fisiológicos, como a profundidade do tecido alvo e da força de ligação entre a molécula e o carregador (FERREIRA, 2009). Essas limitações são amenizadas quando o tamanho das partículas é inferior à 300 nm (ALVES, 2012).

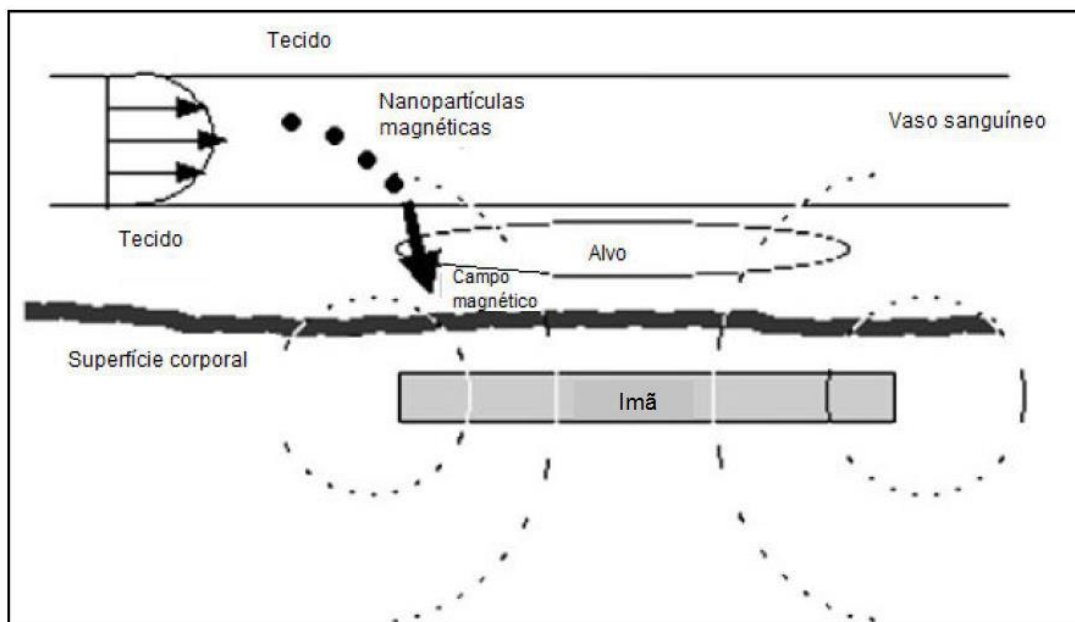


Figura 7: Esquema ilustrativo de liberação de fármacos utilizando NPM como direcionadores do alvo debilitado por meio de um campo magnético externo. Adaptado de ALVES (2012).

A liberação do fármaco ligado às NPM ocorre por difusão, devido ao gradiente de concentração entre as nanopartículas e o sistema biológico do corpo. Entretanto, esta liberação pode ser acelerada e com uma maior quantidade de medicamento ao se aplicar um campo magnético externo oscilante no sistema, uma vez que este promoverá um movimento das partículas e, assim, facilitará o desprendimento das moléculas farmacológicas para o meio (BEDÊ, 2010). Além dessas características positivas de sistemas com materiais magnéticos, a propriedade de aumentar o contraste negativo das imagens de ressonância faz com que essas nanopartículas possam ser usadas também para diagnosticar doenças, como discutido no item 2.6.1. Dessa forma, ao combiná-las com as aplicações de carregamento de fármaco e liberação controlada e sítio-dirigida, possibilita que esse sistema seja um promissor produto teranóstico.

# CAPÍTULO III

## *Metodologia*

Nesse capítulo será apresentada a etapa experimental executada na pesquisa. Inicialmente, apresenta-se a síntese das nanopartículas de óxido de ferro, tal como seu recobrimento com sílica. Uma análise de estabilidade das nanopartículas magnéticas com adição de ácido cítrico também é investigada, juntamente com seu posterior recobrimento com sílica. Além disso, aborda-se o estudo da adsorção da curcumina nas nanopartículas magnéticas, investigando depois o encapsulamento desse conjunto em sílica. E por fim, descreve-se as caracterizações das amostras quanto à morfologia, estrutura cristalina, superfície, tamanho de partículas, propriedades magnéticas, fluorescência, hipertermia magnética e liberação do fármaco.

### **3.1 Materiais**

#### **3.1.1 Reagentes e soluções**

Os materiais utilizados ao longo do trabalho, com suas devidas especificações, estão descritos a seguir:

##### **a) Síntese das nanopartículas de óxido de ferro:**

- Água deionizada ultrapura Milli-Q®;
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , sulfato de ferro (II) heptahidratado, Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR;
- $\text{H}_2\text{SO}_4$ , ácido sulfúrico, Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR;
- Ferro metálico ( $\text{Fe}^0$ ), origem desconhecida;
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , cloreto de cálcio dihidratado, Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR;
- $\text{FeCl}_2$ , cloreto de ferro (II), 0,5 M, sintetizado no laboratório;
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , cloreto de ferro (III) hexahidratado, Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR;
- $\text{NH}_4\text{OH}$ , hidróxido de amônio, 10 à 35% de amônia, Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR.

##### **b) Revestimento das nanopartículas magnéticas com sílica**

- Água deionizada ultrapura Milli-Q®;
- TEOS,  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ , tetraethyl orthosilicate,  $\geq 99,0\%$  (GC), Aldrich Chemistry, St Louis, USA;
- EtOH, ethyl alcohol, álcool absoluto 200 Proof, Tedia, Fairfield, OH, USA;
- $\text{NH}_4\text{OH}$ , hidróxido de amônio, 10 à 35% de amônia, Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR.

c) Estabilização das nanopartículas com ácido cítrico

- Água deionizada ultrapura Milli-Q®;
- EtOH, álcool etílico 95, P.A., Sigma Aldrich Brasil, Duque de Caxias, RJ, Br;
- Ácido cítrico, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O, PM = 210,14 g/mol, Merck.

d) Adsorção da curcumina nas nanopartículas de óxido de ferro e posterior encapsulamento em sílica

- Água deionizada ultrapura Milli-Q®;
- TEOS, Si(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>, tetraethyl orthosilicate, ≥ 99,0% (GC), Aldrich Chemistry, St Louis, USA;
- EtOH, ethyl alcohol, álcool absoluto 200 Proof, Tedia, Fairfield, OH, USA;
- NH<sub>4</sub>OH, hidróxido de amônio, 10 à 35% de amônia, Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR.
- Curcumina utilizada foi gentilmente cedida pela mestrandia Lizandra Maurat (IMA/UFRJ). A curcumina foi extraída do rizoma do açafrão pelo método convencional, o qual se deu por arraste do solvente etanol, sendo a metodologia baseada nos trabalhos de FERNÁNDEZ, A. et al. (2017) e NASCIMENTO et al. (2016). Após a extração, a solução foi colocada na capela para evaporação e secagem. A análise da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – *High performance liquid chromatography*) confirmou a presença da curcumina (Figura 8.b), pois a amostra obteve o mesmo tempo de retenção do padrão da curcumina (Figura 8.a). Os outros dois picos da Figura 8.b são possivelmente referentes ao curcuminóides demetoxicurcumina e bis-demetoxicurcumina. Como a curcumina representava a maior parte do produto extraído, este trabalho a adotou para representar os curcuminóides;

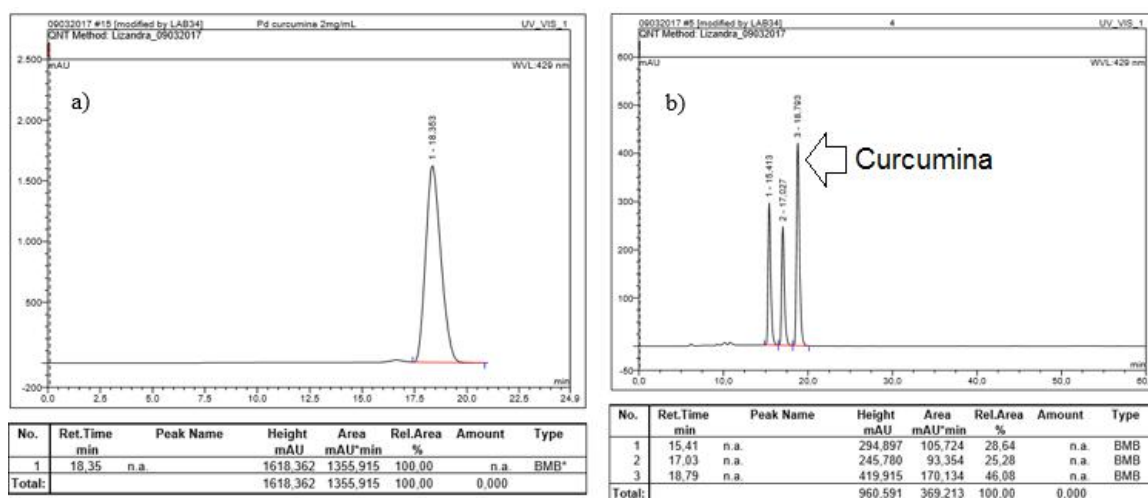


Figura 8: Cromatogramas de HPLC do a) padrão da curcumina com tempo de retenção de 18,35 min; b) separação dos curcuminóides, com destaque para a curcumina (tempo de retenção = 18,79 min). Imagens cedidas pela aluna Lizandra Maurat.

#### e) Testes de liberação

- Amostras sintetizadas previamente;
- Solução tampão fosfato-salino (PBS - *phosphate-buffered saline*), pH 7,2, preparado a partir de fosfato monossódico, fosfato dissódico, cloreto de sódio e água.
- SDS, C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>45</sub>, lauril sulfato de sódio ultra puro (dodecilsulfato de sódio - *sodium dodecyl sulfate*), Vetec Química Fina, Duque de Caxias, RJ;
- HCl, ácido clorídrico P.A., Vetec Química Fina, Duque de Caxias, RJ.

#### 3.1.2 Equipamentos

- Agitador mecânico, Fisatom, utilizado na reação de síntese das nanopartículas de óxido de ferro;
- Agitador magnético simples, Fisatom, utilizado na purificação do FeSO<sub>4</sub>;
- Agitador magnético múltiplo, Fisatom, usado na etapa do revestimento;
- Agitador de tubos, Scientific Industries, Roto-shake Genie, usado na etapa de adsorção;
- Balança analítica, usada para pesagem dos materiais requeridos em cada etapa;
- Bomba a vácuo, Fisatom, modelo 820, auxiliou a filtração;
- Banho Maria, Novatecnica, controle de temperatura durante a síntese das nanopartículas;
- Centrífuga, Eppendorf, Centrifuge 5810R, com rotor A-4-81, utilizada na separação dos produtos das reações realizadas;
- Difratorômetro de Raios-X (DRX), PANalytical, X'Pert Pro, do CBPF, averiguação da estrutura cristalina;
- Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Zeta PALS, Zeta Potential Analyzer, Brookhaven, pertencente ao Laboratório de Bioquímica da professora Débora Foguel (CCS/UFRJ). Ele foi usado para medir o potencial zeta ( $\zeta$ ) e a distribuição do tamanho das partículas.
- Espectrofotômetro de absorção atômica (Atomic Absorption Spectrophotometer), SHIMADZU, modelo 6800, pertencente ao CBPF e utilizado para mensuração de Fe encapsulado nas nanopartículas;
- Espectroscópio de absorção no UV-visível, Bel Photonics, UV-vis spectrophotometer, UV-M51, pertencente ao laboratório Grifit e usado para verificar a presença de curcumina nas soluções analisadas e quantificá-la;
- Estufa de secagem, Quimis, empregado para secagem das amostras;

- Fluorímetro, JASCO, Spectrofluorometer FP-8200, do Laboratório LaBiME (CCS) da professora Yraima Cordeiro, usado para medir a fluorescência da curcumina;

- Magnetômetro SQUID (*Superconducting Quantum Interference Device*), pertencente ao Laboratório de Magnetometria da Infraestrutura de Pesquisa Multiusuária para Materiais Avançados do CBPF (MAG-MATMULT), utilizado nas medidas de magnetização de saturação;

- Microscópio de Fluorescência Invertido (MFI), Zeiss, Observer.Z1, acoplado com um Aptome, pertencente ao Laboratório de doenças neurodegenerativas da Biofísica (CCS) do professor Sérgio T. Ferreira, utilizada para fazer imagens da fluorescência da curcumina;

- Microscópio Eletrônico de Transmissão de alta resolução (MET), JEOL JEM-2100F, 200kV, vácuo na câmara de  $10^{-7}$  Pa, do Laboratório Multiusuário de Nanociência e Nanotecnologia do CBPF (LABNANO). Este equipamento também pode ser operado em modo de microscopia eletrônica de transmissão de varredura (STEM) – detector de alto ângulo e feixe de 0,7nm, além disso, possui um sistema de espectroscopia por dispersão de energia de raios-X (EDS) e sistema de mapeamento de nanodifração com precessão NANOMEGAS Digistar. Foi utilizado para analisar a morfologia, composição e o tamanho das nanopartículas;

- NanoScale Biomagnetic, modelo DM100 Series, do Laboratório de Magnetometria da Infraestrutura de Pesquisa Multiusuária para Materiais Avançados (CBPF), usado nas medidas de hipertermia magnética;

- Shaker com agitação orbital, TECNAL, TE-420 Incubadora, pertencente ao laboratório Biomol (UFRJ), empregado nos testes de liberação;

- Sonicador, Hielscher, Modelo UP100H, utilizado para homogeneizar as soluções referentes ao recobrimento das nanopartículas com sílica;

- Turrax, Novatecnica, agitador utilizado para homogeneizar as soluções com ácido cítrico;

- Ultrassom, Maxiclean 750, homogeneizador usado na etapa de revestimento;

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Síntese das nanopartículas de óxido de ferro (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro foram obtidas pelo método de coprecipitação a partir da mistura de sais de ferro usando uma solução básica. Os procedimentos utilizados basearam-se nos trabalhos de BEDÊ (2010) e MORALES et al. (2008).

A obtenção das nanopartículas foi dividida em quatro etapas, descritas a seguir:

#### a) Purificação do sulfato de ferro II:

A purificação do sulfato de ferro II foi necessária para garantir a obtenção do íon Fe<sup>2+</sup> e não do Fe<sup>3+</sup>. Para isso, foi realizada uma reação de oxirredução utilizando ferro metálico.

Inicialmente, foram preparados 300 mL da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25% (v/v). Em seguida, foram adicionados 60 g de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O à esta solução, sob agitação e aquecimento (60 – 70 °C). Após a solubilização do FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, acrescentou, aos poucos, ferro metálico à solução até que não ocorresse mais reação e observasse a saturação da solução. A seguir, foi realizada a filtração a vácuo e a quente da solução, e o filtrado obtido foi colocado em banho de gelo para facilitar a cristalização e, em seguida, foi posto no freezer por aproximadamente 24 h (*overnight*) para a recristalização do FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O purificado.

Após esse tempo, os cristais de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O purificados foram lavados com água gelada sob filtração a vácuo para remoção do excesso de gelo formado durante o resfriamento. O reagente purificado foi então armazenado no freezer.

#### b) Obtenção da solução de cloreto de ferro II:

O cloreto de ferro II foi obtido a partir da reação do sulfato de ferro (II) heptahidratado com o cloreto de cálcio dihidratado, conforme a Equação 7:



Para a obtenção de 100 mL de solução 0,5 M de FeCl<sub>2</sub>, foram necessários, conforme a estequiometria da reação, aproximadamente 15 g de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

previamente purificado e 7,351 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Antes de misturá-los, cada reagente foi solubilizado com água Milli-Q® até completar 40 mL. Após a mistura das duas soluções, a solução final foi centrifugada por 10 min à 4000 rpm (equivalente à velocidade de 3220 x g na centrífuga Eppendorf 5810R). O sobrenadante ( $\text{FeCl}_2$ ) foi reservado e o precipitado ( $\text{CaSO}_4$ ) foi lavado com o restante da água (20 mL) e centrifugado novamente para resgatar todo  $\text{FeCl}_2$  formado. Após a segunda centrifugação, seu sobrenadante foi colocado junto ao sobrenadante já recolhido, e o precipitado foi descartado.

**c) Preparo da solução de cloreto de ferro III:**

Foi preparada uma solução de 100 mL, 0,5 M de  $\text{FeCl}_3$ . Para tal, pesou-se aproximadamente 14 g do reagente  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e completou com água Milli-Q® até atingir 100 mL.

**d) Reação dos sais de ferro para obtenção das nanopartículas magnéticas:**

A formação de nanopartículas magnéticas de magnetita pelo método de coprecipitação em meio alcalino foi dado pela Equação 8:



Primeiramente, as soluções de  $\text{FeCl}_3$  e  $\text{FeCl}_2$  preparadas anteriormente (razão 1:1), foram misturadas em um balão e colocadas em banho de água à temperatura de 60 °C e sob agitação mecânica de 800 rpm. Após a homogeneização, adicionou-se lentamente 100 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , deixando reagir por 30 min e mantendo a agitação e temperatura constantes, e o pH na faixa de 10-11.

Ao final da reação, resfriou a suspensão à temperatura ambiente. Em seguida, a centrifugou por 5 min à 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado (nanopartículas de magnetita) foi lavado exaustivamente com água Milli-Q® para remoção do amônio e ajuste do pH, sendo submetido novamente à centrífuga até que a solução atingisse o pH da água ( $\approx \text{pH} = 6$ ).

As nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetita) formadas, denominadas NPM\_A1, foram armazenadas em solução aquosa e temperatura ambiente para evitar a oxidação e transformação da magnetita em maghemita.

Os procedimentos adotados foram capazes de produzir nanopartículas magnéticas com pureza desejada para realização deste trabalho.

### 3.2.2 Revestimento das nanopartículas de óxido de ferro com sílica

O revestimento das nanopartículas de óxido de ferro com sílica foi realizado pelo método de Stöber modificado, como descrito nos trabalhos de FERREIRA (2009) e STÖBER; FINK; BOHN (1968). Este método possibilita um revestimento conhecido como núcleo-casca (*core-shell*), sendo as nanopartículas o núcleo, e a sílica o recobrimento externo.

De acordo com HUI et al. (2011), a razão molar TEOS/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> é o parâmetro que mais influencia na espessura da camada de sílica. Dessa forma, neste trabalho propôs-se analisar duas razões molares diferentes. A quantidade utilizada de cada reagente em cada amostra está descrita na Tabela 1:

Tabela 1: Quantidade dos reagentes para o revestimento com sílica das nanopartículas de magnetita.

<b>Amostras</b>	<b>H<sub>2</sub>O (mL)</b>	<b>NH<sub>4</sub>OH (mL)</b>	<b>EtOH (mL)</b>	<b>Nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (g)</b>	<b>TEOS (mL)</b>	<b>Razão Molar TEOS/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>
NPM_B1	40	5	160	0,040	1	26
NPM_B2	40	5	160	0,040	1	26
NPM_B3	40	5	160	0,045	0,8	18
NPM_B4	40	5	160	0,045	0,8	18

Inicialmente, em quatro erlenmeyers foi adicionado etanol e, em seguida, as nanopartículas de magnetita. A homogeneização se deu em banho de ultrassom por 45 min para as amostras NPM\_B1 e NPM\_B3, e em sonificador (ultrassom de ponta) à 50% de amplitude por 50 min para as amostras NPM\_B2 e NPM\_B4.

Na dispersão formada, foram acrescentados os outros reagentes na seguinte ordem: água Milli-Q®, NH<sub>4</sub>OH, e por último, o TEOS, gotejando-o. Após a adição dos reagentes, os erlenmeyers foram tampados com parafilme e colocados sob agitação magnética (840 rpm) por 24 h.



Os produtos obtidos foram centrifugados por 10 min à 4000 rpm, sendo eliminado o sobrenadante, e o precipitado submetido à três lavagens com etanol. A cada lavagem, os precipitados eram acrescidos de 20 mL de etanol e passados pela centrífuga à 4000 rpm por 5 min. Ao final, os precipitados foram deixados em suspensão de etanol.

### **3.2.3 Síntese de nanopartículas de sílica**

As nanopartículas de sílica pura foram usadas como amostra comparativa. O procedimento adotado foi adicionar em um erlenmeyer 160 mL de etanol, 40 mL de água deionizada e 5 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , e agitar no sonicador por 3 min. Em seguida, gotejou-se 1 mL de TEOS na solução contida no erlenmeyer, tampando-o com parafilme e agitou-se magneticamente a solução durante 24 h em temperatura ambiente. Parte da solução com as partículas de sílica foi colocada na capela para evaporar os reagentes e obter as partículas secas. O produto foi denominado de NPSi.

### **3.2.4 Estudo da estabilização das nanopartículas de óxido de ferro com ácido cítrico**

O estudo de estabilização teve como objetivo averiguar qual concentração de ácido cítrico e em qual dispersante (água deionizada ou etanol) seriam capazes de estabilizar e promover a desaglomeração das nanopartículas de óxido de ferro. Para tal, adicionou-se 40 mg das nanopartículas magnéticas produzidas anteriormente (NPM\_A1) em béqueres contendo 20 mL de água ou etanol. Em outros béqueres, dispersou-se três concentrações diferentes de ácido cítrico em 20 mL de água ou etanol. Em seguida, misturou-se as soluções de ácido cítrico com as de nanopartículas magnéticas, totalizando um volume de 40 mL, e a sonicou por 5 min. A Tabela 2 descreve a quantidade utilizada dos reagentes e o pH final de cada amostra.

A confirmação da estabilização baseou-se na observação visual das amostras no decorrer no tempo.

Tabela 2: Quantidade dos reagentes e condições da etapa de estabilização.

<b>Amostras</b>	<b>Nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (g)</b>	<b>Ác. cítrico (g)</b>	<b>Ác. cítrico (mol/L)</b>	<b>Dispersante (40 mL)</b>	<b>pH</b>
NPMac1	0,040	0,025	0,003	Água	3,8
NPMac2	0,040	0,1375	0,1636	Água	2,8
NPMac3	0,040	0,25	0,03	Água	2,5
NPMac4	0,040	0,025	0,003	Etanol	5
NPMac5	0,040	0,1375	0,1636	Etanol	5
NPMac6	0,040	0,25	0,03	Etanol	5

### **3.2.5 Estabilização das nanopartículas de óxido de ferro com ácido cítrico e posterior recobrimento com sílica**

Com intuito de diminuir a agregação das nanopartículas de óxido de ferro e estabilizá-las em suspensão, propôs-se tratá-las primeiramente com ácido cítrico e, em seguida, fazer o recobrimento com a sílica.

Inicialmente, a dispersão das nanopartículas de óxido de ferro e ácido cítrico foi realizada em água deionizada e em etanol. Para a primeira amostra, adicionou-se 40 mg das nanopartículas NPM\_A1 em 20 mL de água, e em outro béquer acrescentou 0,25 g de ácido cítrico em 20 mL de água. Agitou-se com um bastão de vidro ambos os béqueres para aumentar a dispersão. Em seguida, misturou-se as duas soluções e as homogeneizou no turrax por 20 min em velocidade baixa. A segunda amostra procedeu da mesma maneira, porém a água foi substituída por etanol.

A partir das soluções acima descritas, procedeu-se o revestimento com sílica pelo método de Stöber modificado, semelhante ao detalhado no item 3.2.2. A quantidade total dos reagentes foi igual às amostras NPM\_B1 e NPM\_B2. Resumidamente, a solução dispersa de ácido cítrico e nanopartículas magnéticas foi adicionada ao erlenmeyer com etanol e, em seguida, acrescentou-se o restante dos reagentes, colocando o TEOS por último. Os erlenmeyers foram tampados com parafilme e submetidos à agitação magnética por 24 h. Após este período, realizou-se a lavagem das amostras com etanol.

A amostra formada a partir da dispersão inicial em água foi denominada NPM\_Bac1, e a outra, feita a partir da dispersão em etanol, foi denominada NPM\_Bac2.

Após a análise da estabilização com ácido cítrico, item 4.2 nos resultados, percebeu-se que a concentração de ácido cítrico adequada para seu propósito foi a de 0,003 mol/L e a melhor dispersão sendo feita em água, ou seja, a amostra NPMac1. Dessa forma, procedeu-se a realização do revestimento com sílica a partir dessas condições. Em suma, em um béquer adicionou 40 mg das nanopartículas NPM\_A1 em 20 mL de água, e acrescentou uma pequena quantidade de hidróxido de amônio para deixar o meio com pH em torno de 7,5. Em outro béquer, colocou-se 0,025 g de ácido cítrico em 20 mL de água, agitando com um bastão de vidro para dispersar completamente. Após isto, misturou-se essas duas soluções e sonicou-se por 5 min. O revestimento com a sílica seguiu o mesmo procedimento adotado pelas nanopartículas NPM\_Bac1 e NPM\_Bac2. As nanopartículas formadas foram denominadas de NPM\_Bac3.

### **3.2.6 Adsorção da curcumina nas nanopartículas de óxido de ferro**

O estudo da adsorção da curcumina nas nanopartículas magnéticas foi realizada a fim de obter melhores condições para seu posterior recobrimento com sílica (item 3.2.7). As curvas de calibração no espectrofotômetro UV-visível, utilizadas para o cálculo da porcentagem de curcumina adsorvida/dessorvida, encontram-se no Apêndice C.

#### **3.2.6.1 Adsorção com e sem ácido cítrico**

A adsorção na presença e ausência de ácido cítrico foi realizada com intuito de verificar se o sistema curcumina/nanopartículas de óxido de ferro necessitava de algum intermediário para facilitar a ligação.

O preparo da amostra sem ácido cítrico, denominada NPM\_C1, foi efetuado em um béquer, em que se adicionou 40 mL de água deionizada e 40 mg das nanopartículas magnéticas (NPM\_A1), agitando-os com um bastão de vidro para facilitar a dispersão. Em um outro béquer, colocou-se 8 mg de curcumina e 40 mL de etanol, e agitou-se até que toda curcumina estivesse dispersada no etanol. Em seguida, misturou-se os dois conjuntos e sonicou-os por 5 min. O procedimento da amostra com ácido cítrico foi semelhante. Resumidamente, juntou-se uma suspensão com 20 mL de água deionizada e

40 mg das NPM com uma solução de 20 mL de água e 25 mg de ácido cítrico, em seguida, agitou-se esse sistema no sonicador por 5 min. Em um outro recipiente, dispersou-se 8 mg de curcumina em 40 mL de etanol. Por fim, uniu e agitou no sonicador por 5 min os sistemas com NPM, ácido cítrico e curcumina. Essa amostra recebeu o nome de NPMac\_C1.

Após a síntese das amostras NPM\_C1 e NPMac\_C1, os sistemas reacionais foram submetidos à centrifugação à 4000 rpm por 10 min. Os sobrenadantes foram reservados para análise no espectrofotômetro UV-visível a fim de medir a concentração de curcumina adsorvida (%). Nessa análise, os sobrenadantes foram diluídos 5 vezes com uma solução 50-50 % água/etanol, aferidos suas absorbâncias no comprimento de onda de 426 nm (pico referente à curcumina) e o cálculo da concentração de curcumina adsorvida foi realizado por meio da equação da reta da curva de calibração com intervalo de absorbância entre 0 e 1.

#### 3.2.6.2 Cinética de adsorção

A cinética de adsorção da curcumina nas NPM foi sucedida com intuito de verificar o tempo necessário para que a adsorção se completasse no seu máximo. Para tal, preparou-se amostras com quantidades iguais dos reagentes, mas com tempos de agitação diferentes.

Inicialmente, para cada amostra adicionou-se 5 mL de água Milli-Q® e 5 mg de NPM em tubos falcon diferentes. Sequentemente, em um béquer preparou-se uma solução com 30 mL de etanol e 6 mg de curcumina, e em seguida, colocou 5 mL dessa solução em cada tubo falcon, juntando as soluções preparadas. Antes da agitação, os tubos foram selados com parafilme e encapados com papel alumínio para que a luz não degradasse a curcumina. A agitação ocorreu em um agitador de tubos à 24 rpm e cada amostra ficou rotacionando por um tempo de 5 min, 1 h, 8 h, 24 h, 48 h ou 72 h. Após o tempo determinado, as amostras foram centrifugadas à 4000 rpm por 10 min, reservando o sobrenadante para a análise no espectrofotômetro UV-visível e posterior cálculo da concentração de curcumina adsorvida (%). A absorbância foi aferida no  $\lambda = 426$  nm.

### 3.2.6.3 Isoterma de adsorção

Por meio da isoterma de adsorção foi possível entender melhor como se comportou a adsorção da curcumina nas NPM e também obter a proporção desses dois componentes que otimizasse essa adsorção. Para tal, fez-se o experimento mantendo a concentração de curcumina constante e variando a de NPM, e assim, obteve-se o perfil de adsorção através do gráfico da massa de curcumina adsorvida pela massa de NPM *versus* a concentração final de curcumina no meio.

No experimento, em 15 tubos falcon foram colocadas quantidades diferentes de NPM (0,5; 0,8; 1; 2; 4; 5; 6; 7; 10; 20; 30; 40; 50; 100 e 150 mg) e adicionado, em cada um, 5 mL de água deionizada. Em um béquer separado, preparou-se a solução de curcumina e etanol contendo 15 mg de curcumina e 75 mL de etanol, e em seguida, a distribuiu nas 15 amostras (5 mL em cada). Assim, os tubos foram tampados com parafilme e papel alumínio e deixados no agitador de tubos à 24 rpm e por 48 h (tempo estimado da saturação da adsorção – item 4.4.2). Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas à 4000 rpm e por 10 min. Os sobrenadantes foram analisados no espectrofotômetro UV-visível em  $\lambda = 426$  nm, e com os resultados, plotou-se o perfil da isoterma. O cálculo da capacidade de adsorção é expresso pela Equação (9).

$$\frac{\text{massa cur adsorvida}}{\text{massa NPM}} = \frac{(C_0 - C_f) \cdot V}{m} \quad \text{Eq. (9)}$$

onde  $C_0$  é a concentração de curcumina inicial,  $C_f$  a concentração final de curcumina,  $V$  o volume da mistura e  $m$  a massa das nanopartículas magnéticas.

### 3.2.6.4 Dessorção da curcumina nas nanopartículas de óxido de ferro

Este experimento foi dividido em duas etapas: adsorção e dessorção da curcumina nas NPM. O procedimento da adsorção foi semelhante ao utilizado na análise da isoterma, com as mesmas proporções dos reagentes, porém, para este caso, somente foi usada a massa de 30 mg de NPM e 1 mg de curcumina. Após as 48 h agitando e promovendo a adsorção, as amostras foram centrifugadas. Os sobrenadantes foram guardados para posterior análise no espectrofotômetro UV-visível e quantificação da adsorção, e as NP que precipitaram mantiveram-se no tubos falcon para dar seguimento à dessorção.

O estudo da dessorção foi realizado a fim de simular o que poderia acontecer na futura etapa de revestimento com sílica. Dessa forma, optou-se por padronizar a concentração de curcumina em 38 µg/mL, igual à que foi utilizada em uma das amostras com revestimento (NPM\_D1). Além disso, acompanhou-se o comportamento da dessorção em dois meios diferentes, um 25-75 % (v/v) água-etanol e outro 24-73-3 % (v/v) água-etanol-hidróxido de amônio, sendo as amostras denominadas HE e HEN, respectivamente. Sendo assim, com metade dos tubos com NPM-cur adicionou-se em cada 25 mL da solução HE, e na outra metade, 25,65 mL da solução HEN. Todos os tubos foram tampados com parafilme e papel alumínio, e rotacionados no agitador de tubos à 24 rpm por 20, 40, 60, 120 ou 300 min. Ao final do tempo estipulado, as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes analisados no espectrofotômetro UV-visível. A quantificação da curcumina dessorvida foi feita através dos valores da absorbância em  $\lambda = 426$  nm, para as HE, e em  $\lambda = 502$  nm, para as HEN, sendo que em cada conjunto de amostra utilizou-se uma curva de calibração referente ao meio empregado.

### 3.2.7 Adsorção da curcumina nas nanopartículas de óxido de ferro e posterior recobrimento com sílica

Para o sistema completo, ou seja, nanopartículas de óxido de ferro (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), curcumina e sílica, foi proposto quatro amostras diferentes, as quais variaram a quantidade de alguns reagentes e tempo de adsorção, mas com procedimento de síntese similar. A Tabela 3 elucida as condições de cada amostra.

Tabela 3: Condições experimentais das sínteses do sistema completo de nanopartículas.

Amostras	H <sub>2</sub> O (mL)	NH <sub>4</sub> OH (mL)	EtOH (mL)	TEOS (mL)	NP Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (mg)	Cur (mg)	Ác. cítrico (mg)	Tempo de adsorção
NPM_D1	40	5	160	1	40	8	0	5 min
NPMac_D1	40	5	160	1	40	8	25	5 min
NPM_D2	40	5	160	1	40	40	0	5 min
NPM_D3	40	5	160	1	40	40	0	48 h

O início da síntese das amostras NPM\_D1 e NPMac\_D1 foi exatamente igual às amostras NPM\_C1 e NPMac\_C1, respectivamente (item 3.2.6.1). Após o tempo de sonicação (etapa de adsorção), as soluções preparadas de NPM, curcumina, água, etanol e ácido cítrico (somente para a NPMac\_D1) foram postas dentro de erlenmeyers junto com o restante dos reagentes (120 mL de etanol, 5 mL de NH<sub>4</sub>OH e 1 mL de TEOS – para cada amostra). Os erlenmeyers foram tampados com parafilme para evitar a evaporação dos reagentes, e agitados magneticamente à 800 rpm por 24 h.

O procedimento adotado para a amostra NPM\_D2 foi igual ao explicado para a amostra NPM\_D1, havendo somente a diferença na quantidade de curcumina.

Para a amostra NPM\_D3, o processo de adsorção teve algumas modificações em relação as outras amostras. Primeiramente, preparou-se a suspensão com 40 mg de NPM e 40 mL de água Milli-Q® e a solução com 40 mg de curcumina e 40 mL de etanol, tal como a NPM\_D2. Em seguida, com esses reagentes misturados e colocados em tubos falcon, que posteriormente foram selados com parafilme e encapados com papel alumínio, promoveu-se a adsorção durante 48 h em um agitador de tubos com agitação de 24 rpm. Depois dessa etapa, transferiu-se essa suspensão para um erlenmeyer, acrescentou os reagentes que faltavam, ou seja, parte do etanol, o NH<sub>4</sub>OH e por último o TEOS, e seguiu com a agitação magnética por 24 h.

Ao final, todas as amostras foram centrifugadas à 4000 rpm por 20 min. Os sobrenadantes foram reservados para quantificação da curcumina no espectrofotômetro UV-visível em  $\lambda = 502$  nm. E as nanopartículas foram lavadas 3x com água Milli-Q® para retirar o excesso dos reagentes na superfície. Parte das amostras foi deixada em suspensão aquosa e o restante foi seco à 37 °C na estufa.

A Figura 9 esquematiza todas as condições de síntese estudadas neste trabalho.

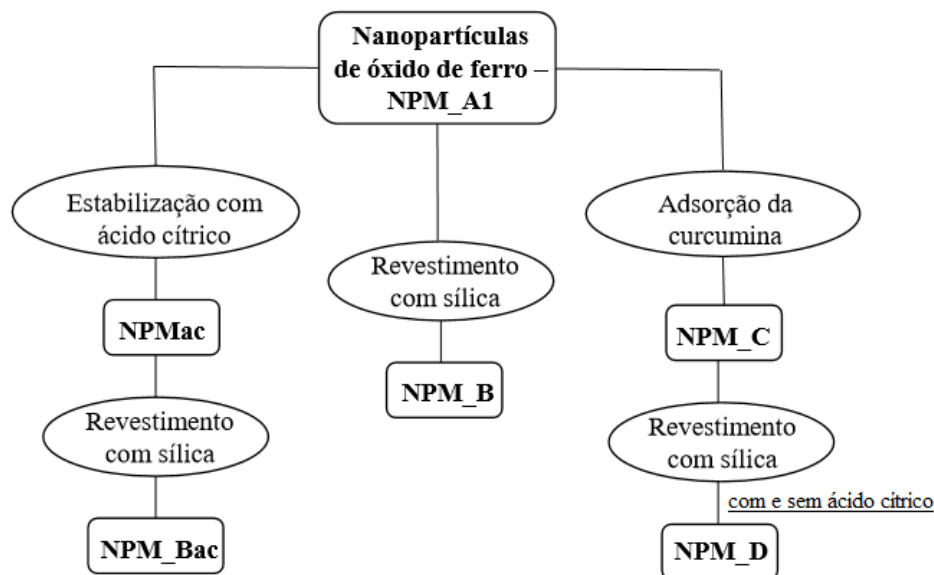


Figura 9: Esquema das sintetizações dos sistemas nanoparticulados.

### 3.3 Caracterizações

#### 3.3.1 Morfologia

Microscopia eletrônica de transmissão:

O microscópio eletrônico de transmissão possui uma fonte emissora de elétrons, o qual irradia na amostra um feixe de elétrons de densidade de corrente uniforme, e um conjunto de lentes eletromagnéticas que controlam este feixe emitido, possibilitando a formação de imagens transmitidas da amostra. As imagens observadas são projeções de linhas, áreas e volumes de interesse, mas pode ocorrer superposição.

Na análise, coletou-se uma pequena quantidade das amostras em suspensão, e gotejou-as em grades de cobre recobertas com carbono e resina polimérica. Após a secagem das amostras em temperatura ambiente, a grade foi posta dentro do equipamento e registrou-se as imagens e a distribuição dos elementos químicos (EDS). Foram feitas visualizações em aumentos variados e com voltagem de excitação de 200 kV. Também registrou-se a difração de elétrons da amostra NPM\_B2, a fim de comparar com o banco de dados das estruturas cristalinas referente à magnetita e maghemita (fichas ICSD).



### 3.3.2 Estrutura cristalina

A estrutura cristalina de materiais naturais e sintéticos pode ser estudada por meio de um equipamento denominado Difratorômetro de Raios-X. Essa técnica utiliza do fenômeno de difração para obter, além da estrutura cristalina, outras informações do material estudado, tais como tamanho do cristalito, perfeição, orientação dos cristais e composição de fase.

A análise de DRX das amostras utilizou o método do pó e fonte de radiação  $\text{CuK}\alpha$ , com comprimento de onda igual à  $1,54056 \text{ \AA}$ . Os dados obtidos foram refinados pelo *software* WinPLOTR e os difratogramas foram gerados pelo OriginPro 8.5.

### 3.3.3 Caracterização da superfície

Potencial Zeta:

Os materiais macroscópicos ou particulados podem adquirir uma carga elétrica em sua superfície quando estão em contato com um líquido. Essa carga líquida superficial contribui para uma mudança na distribuição de íons na vizinhança da partícula, proporcionando um aumento de contra-íons próximo à superfície, formando assim, uma dupla camada elétrica. Ao se movimentar, por meio de um campo elétrico, a partícula carrega consigo a camada dos contra-íons fortemente ligados à ela, formando um só sistema. O potencial elétrico no plano de cisalhamento entre esse sistema e o meio que o circunda é chamado de potencial zeta (SALIM et al., 2005). Este potencial tem grande importância no controle da estabilidade de suspensões ou emulsões coloidais, e pode ser afetado, por exemplo, pela temperatura, concentração e, principalmente pelo pH.

A medição do potencial zeta pode ser realizada por meio da aplicação de um campo elétrico no líquido em que as partículas se encontram. Equipamentos que integram a técnica de espalhamento de luz (DLS) com a presença de um campo elétrico são capazes de fazer esta medição. Assim, com o auxílio do equipamento Zeta PALS, o potencial zeta das amostras foi aferido. As amostras para a análise foram preparadas diluindo 10 vezes as amostras originais em água deionizada e, em seguida, sonicando-as por 5 min.

### **3.3.4 Tamanho hidrodinâmico e distribuição do tamanho de partículas**

O tamanho das partículas e sua distribuição de tamanho podem ser determinados através da técnica de espalhamento de luz, como o DLS, a qual não é invasiva e ainda permite medir tamanhos muito pequenos, na faixa de submicrométrico à nanométrico. Este método consiste em aplicar um raio luminoso (laser) na suspensão onde as partículas se encontram em movimento browniano. Ao atingir as partículas, a luz é espalhada com intensidades diferentes e então, o equipamento utiliza dessas flutuações de intensidades para obter o valor do tamanho das partículas. É possível obter um diâmetro hidrodinâmico médio, porcentagem de distribuição de tamanho e índice de polidispersividade (XU, 2007).

Para a análise, dilui-se as amostras em água Milli-Q® e/ou etanol e as sonicou por 5 min para amenizar a aglomeração.

### **3.3.5 Espectroscopia de absorção atômica**

Esse equipamento é normalmente empregado para determinar qualitativamente e quantitativamente a presença de metais, através da absorção de radiação ultravioleta por parte dos elétrons. Essa técnica aplica uma fonte de energia apta a excitar os elétrons, fazendo-os saltarem e retornarem para suas camadas de origem. A energia liberada nesse processo absorve a radiação ultravioleta emitida por uma fonte específica do elemento químico que se quer investigar, assim, somente a presença desse elemento causará uma interferência capaz de ser registrada pelo espectrofotômetro.

O ferro presente nas amostras foi analisado por Espectrofotometria de Absorção Atômica, em chama de Air-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, medindo a absorbância em seu comprimento de onda de 248,3 nm. A curva de calibração foi montada com padrões Merck 99,99% de pureza, e a solubilização da amostra foi feita com HNO<sub>3</sub> concentrado.

### **3.3.6 Análises no Espectrofotômetro UV-visível**

A espectroscopia de absorção no ultravioleta-visível é um método muito empregado na determinação da concentração de uma substância que absorve radiação na

região do ultravioleta ou do visível. O princípio dessa constatação provém da Lei de Beer-Lambert, a qual relaciona diretamente e linearmente a concentração da substância em uma solução com sua absorvância de luz. Entretanto, essa lei não é válida para concentrações muito elevadas, assim, de uma forma prática, as soluções mensuradas devem apresentar um valor de absorvância igual ou inferior à 1, caso contrário, necessita-se diluí-las antes da aferição da absorvância.

Para a quantificação da curcumina, fez-se curvas de calibração para cada meio em que ela se encontrava, sendo que em meio ácido/neutro padronizou 426 nm como o comprimento de onda, e em meio básico, 502 nm. Em algumas situações, houve a necessidade de diluir as amostras antes de medir no espectrofotômetro UV-visível. O método indireto foi utilizado no cálculo da quantificação e análises de adsorção, dessorção, encapsulamento e liberação, sendo representado pela Equação 10.

$$\% \text{ curcumina} = \frac{m_o - m_f}{m_o} \cdot 100 \quad \text{Eq. (10)}$$

sendo  $m_o$  a quantidade de curcumina inicial adicionada ao sistema e  $m_f$  a quantidade de curcumina que restou no sobrenadante (curcumina final).

### 3.3.7 Análises de fluorescência da curcumina

#### a) Fluorímetro:

O fluorímetro é um equipamento capaz de captar as propriedades fluorescentes de compostos que a detém, mesmo quando estes estão em concentrações bem reduzidas. No momento da análise, o equipamento incide uma luz no comprimento de onda de excitação do material fluorescente e, então é observado a emissão por meio de um espectro de emissão, ou seja, um gráfico de intensidade *versus* comprimento de onda. Com esses espectros, é possível quantificar qualitativamente e quantitativamente o fluoróforo presente na solução.

A análise neste dispositivo foi realizada a fim de verificar a fluorescência da curcumina em diversas concentrações em meio etanólico. Dessa forma, preparou essas soluções e gerou os espectros de emissão, adotando como parâmetros:  $\lambda_{\text{excitação}} = 426 \text{ nm}$ ,

$\lambda_{\text{emissão}} = 440 - 650 \text{ nm}$ , slit = 2,5 - 5 nm, sensibilidade média, velocidade da varredura = 200 nm/min, resposta = 1 s, intervalo das medidas = 1 nm e 3 ciclos de mensuração.

#### **b) Microscópio de fluorescência invertido:**

As imagens obtidas pelo microscópio de fluorescência são provenientes da radiação eletromagnética emitida pelas moléculas fluorescentes, uma vez que ao serem excitadas por uma luz ultravioleta, absorvem a energia dessa luz e a reemite em um maior comprimento de onda que se encontra dentro do espectro de luz visível, formando, assim, as imagens. Esse microscópio é caracterizado como invertido, pois, diferentemente do microscópio convencional, sua fonte de luz e condensador se encontram acima da amostra a ser analisada, enquanto as objetivas e torre na parte inferior.

Para a análise da microscopia de fluorescência, pequena quantidade das amostras na forma de pó foram colocadas em lâminas de vidro para facilitar o manuseio e visualização no microscópio. O  $\lambda_{\text{excitação}}$  foi de 488 nm e o tempo de exposição à luz variou de 20 ms e 1,5 s, dependendo da amostra.

### **3.3.8 Magnetometria**

O magnetômetro utilizado neste trabalho apresenta o sensor tipo SQUID, o qual é um dos dispositivos transdutor mais sensíveis para medidas de fluxo magnético. Esse equipamento é capaz de medir propriedades físicas que possam ser convertidas em fluxo magnético, tais como campo magnético, gradiente de campo magnético, susceptibilidade magnética, corrente, entre outros.

As amostras em pó foram submetidas à esse equipamento a fim de obter sua curva de magnetização e magnetização de saturação. Para tal, as medidas foram efetuadas sob campo variável de 50000 à -50000 Oe, em temperatura fixa de 27 °C (300 K) e sob purga de hélio.

Outra forma de observação das propriedades magnéticas das amostras sintetizadas foi por meio da aplicação de um ímã de neodímio-ferro-boro ( $\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$ ) próximo às suspensões das nanopartículas. Fotos foram registradas, ilustrando a atração das NPM pelo ímã.

### 3.3.9 Hipertermia magnética

O equipamento utilizado para fazer essa medida opera em sistema fechado, sob vácuo, com sistema de refrigeração acoplado à bobina e controle de temperatura monitorado por um termômetro de fibra óptica. As amostras secas foram colocadas em um vaio e acrescentado água deionizada até que atingisse uma concentração de 10 mg/mL. Em seguida, ultrassonicou esses recipientes por 10 min a fim de homogeneizar a mistura. Após o preparo das amostras, mediu-se o aumento da temperatura promovido pela aplicação de um campo magnético de intensidade de 16 kA/m (200 Gauss) e frequência de 307 kHz por um período de 20 min.

### 3.3.10 Ensaios de liberação da curcumina

Para fins da liberação do ativo encapsulado, a condição *sink* deve ser estabelecida, isto é, uma condição em que o meio de dissolução não esteja saturado pelo composto. Dessa forma, há a garantia de que durante o ensaio a liberação é facilitada e mantida em um regime constante. Para casos em que o fármaco tem baixa hidrofiliabilidade, essa condição é firmada com a adição de surfactante no meio tamponado da liberação. Segundo recomendações da *Food and Drug Administration* (FDA), misturas tamponadas com presença de surfactantes em até 5 % (m/v) podem ser utilizadas como meio receptor em estudos de liberação e penetração *in vitro* (MOREIRA, 2015).

O fato da curcumina ser hidrofóbica requisitou a realização de um estudo prévio de sua solubilidade no meio de fosfato-salino (PBS - pH = 6,5) e dodecilsulfato de sódio (SDS - surfactante). Escolheu-se o SDS devido à sugestão da FDA e por ele ser um dos tensoativos mais utilizados na solubilização de fármacos. A metodologia para este experimento baseou-se no artigo de RAHMAN e colaboradores (2009). Em suma, inicialmente, solubilizou o SDS no PBS por meio da agitação magnética durante 2 min. Várias soluções de PBS e SDS foram preparadas alterando a porcentagem (m/v) de SDS em 0; 0,5; 1; 1,5; 2 e 2,5 %. Em seguida, despejou essas soluções em tubos falcon que continham 5 mg de curcumina em cada. Esses tubos foram tampados com papel alumínio e agitados no shaker com agitação orbital de 255 rpm, à 37 °C e por 24 h. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados à 4000 rpm por 5 min. A absorbância dos

sobrenadantes foi aferida no UV-visível e com este resultado, pode-se investigar a solubilidade da curcumina nessas soluções.

Os ensaios de liberação da curcumina presente na amostra NPM\_D3 foram realizados em condição *sink* e em quatro situações distintas, em que se variou a quantidade de amostra, meio de liberação e modo de agitação, tal como descritas na Tabela 4. Os meios de liberação utilizaram o SDS em 0,5 % (m/v), e para o teste 4, adicionou-se uma pequena quantidade de HCl, suficiente para manutenção do pH em 4,5-5. O shaker tipo orbital operou à 160 rpm e 37 °C, já o sonicador estava em amplitude 0,5, ciclo 1 e na temperatura ambiente.

Tabela 4: Parâmetros e componentes dos ensaios de liberação da curcumina.

Testes	NPM_D3 (mg)	Meio de liberação	Volume do meio (mL)	Volume da alíquota (mL)	Tempo das amostragens (h)	Tipo de agitação
1	12,1	PBS/SDS	50	2	1, 3, 5, 7, 24, 48, 72, 96	Shaker
2	9,4	PBS/SDS	10	1,5	3, 6, 24, 48, 144	Shaker
3	5	PBS/SDS	5	1,5	1	Sonicador
4	9,4	PBS/SDS/HCl	10	1,5	24, 48, 120	Shaker

O procedimento adotado nas amostras 1, 2 e 4 foi colocar o frasco com o meio de liberação previamente preparado dentro do shaker e aquecer o sistema até 37 °C. Ao atingir essa temperatura, as nanopátículas foram acrescentadas e começou a contabilização do tempo. A cada tempo de medida, retirou-se uma alíquota do meio, a centrifugou à 4000 rpm por 10 min e reservou o sobrenadante para análise no espectrofotômetro UV-visível e para o subsequente cálculo da quantidade de curcumina liberada (%). Imediatamente, o precipitado foi redisperso no meio de liberação de igual volume da alíquota, e então essa suspensão foi adicionada de volta ao meio de origem.

O teste 3 teve como intuito investigar se uma agitação violenta contribuiria para uma melhor liberação. Assim, as nanopartículas foram dispersas na solução de PBS/SDS e então, essa suspensão foi sonicada durante uma hora para promover a liberação. Ao final desse tempo, a suspensão foi centrifugada à 4000 rpm por 10 min, e seu sobrenadante

foi lido no espectrofotômetro UV-visível, contabilizando-se a quantidade de curcumina liberada (%).

A Tabela 5 relaciona as caracterizações realizadas em cada amostra sintetizada.

Tabela 5: Relação entre as amostras e suas respectivas caracterizações.

Amostras	Caracterizações										
	Morfologia	Estrutura cristalina	$\xi$	Tamanho	Absorção atômica	Adsorção	% cur	Fluorescência	Magneto metria	Hipertermia magnética	Ensaio de liberação
NPM_A1	X	X	X	X	X				X		X
NPMac1			X	X							
NPMac2			X	X							
NPMac3			X	X							
NPMac4				X							
NPMac5				X							
NPMac6				X							
NPM_B1	X	X	X	X	X				X		X
NPM_B2	X		X	X	X			X	X		
NPM_B3	X		X	X							
NPM_B4	X		X	X							
NPM_Bac1	X		X	X							
NPM_Bac2			X	X							
NPM_Bac3	X	X							X		X
NPM_C1			X			X					
NPMac_C1						X					
NPM_D1							X				
NPMac_D1							X				
NPM_D2			X	X			X				
NPM_D3	X		X	X	X		X			X	X
NPSi	X	X									X



# CAPÍTULO IV

## *Resultados e Discussão*

Este capítulo expõe as caracterizações e aplicações dos materiais retratados nos capítulos anteriores. As seções foram divididas de forma a facilitar o entendimento do leitor e a discussão dos resultados a respeito dos sistemas de nanopartículas produzidas, suas correspondentes caracterizações e funcionalidade na área biomédica. Primeiramente, abordam-se os resultados obtidos a partir da síntese das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro. Discute-se também o efeito do tratamento com o ácido cítrico para melhorar a dispersão. Em seguida, avalia-se o revestimento com sílica, sintetizada *in-situ*. Posteriormente, estuda-se a relação das nanopartículas magnéticas com a curcumina. É feita, então, uma discussão sobre os resultados do sistema completo proposto neste trabalho. Por fim, avalia-se a aplicabilidade desse sistema nanoparticulado promovida pela presença dos materiais magnéticos, fluorescentes, farmacológicos e de recobrimento, focando-se na utilização como marcador de bioimagem, em tratamento por hipertermia magnética e em liberação controlada de fármaco.

### **4.1 Síntese de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro**

A partir da síntese pelo método de coprecipitação foi possível obter nanopartículas de óxido de ferro que se assemelham com a magnetita, já que apresentaram coloração preta (Figura 10.a). Além disso, outro comportamento observado nessas nanopartículas foi a tendência a se agregarem, formando conjuntos de aglomerados de tamanhos variados, como visto na Figura 10.b, na qual é constatado um diâmetro da partícula em torno de 12 a 50 nm. Essa agregação pode ter sido influenciada pela sinergia entre elas e pela instabilidade dessas nanopartículas em solução aquosa, as quais são melhor discutidas nas análises do tamanho e potencial zeta, respectivamente.

A Figura 11.a ilustra o difratograma das nanopartículas magnéticas após o refinamento dos dados. Ao comparar as curvas da amostra e dos padrões de magnetita e maghemita, nota-se a similaridade entre a amostra e essas estruturas cristalinas, porém os padrões são muito parecidos entre si e, por isso, não é possível afirmar por essa técnica que há somente a magnetita nas nanopartículas sintetizadas, dessa forma, denominando-

se como magnetita não estequiométrica ( $\text{Fe}_{3-x}\text{O}_{4-y}$ ). No entanto, pela amostra ter coloração escura, presume-se que pelo menos a maior parte da amostra tem a cristalinidade da magnetita. É comum ocorrer a formação da maghemita, já que a magnetita se oxida facilmente com o tempo na presença de oxigênio e, por essa razão, neste trabalho tentou-se amenizar este polimorfismo mantendo as amostras guardadas em solução aquosa ao invés de secas. A Figura 11.a também apresenta os índices de Miller da amostra sintetizada, os quais são característicos de estrutura cúbica de espinélio invertido, tal como a da magnetita e da maghemita (HUI et al., 2011).

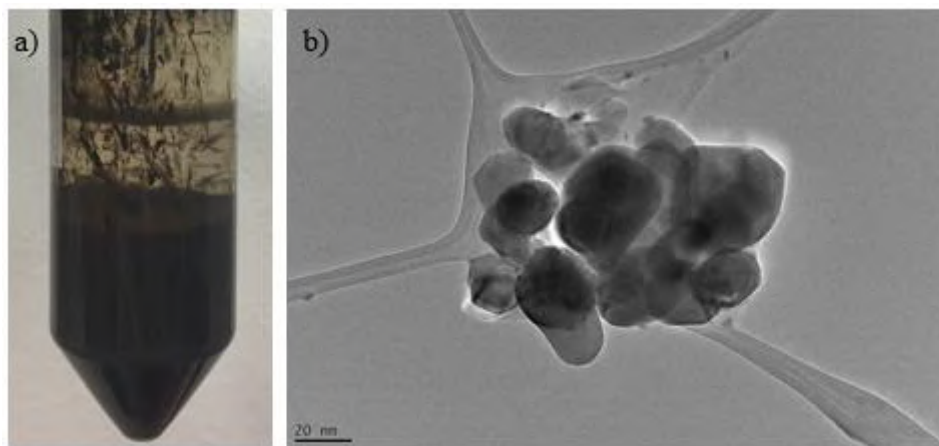


Figura 10: a) suspensão de nanopartículas magnéticas obtidas por coprecipitação em água, b) morfologia dessas nanopartículas (imagem do MET).

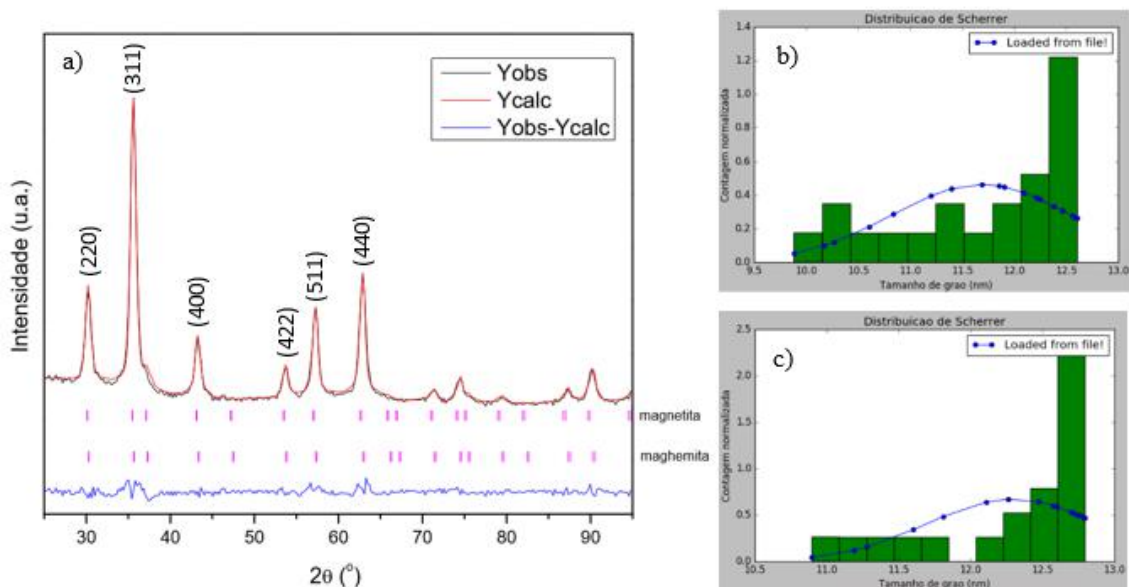


Figura 11: a) Difratoograma das nanopartículas magnéticas, em que  $Y_{obs}$  representa a curva dos dados experimentais,  $Y_{calc}$  são os dados após refinamento no WinPLOTR e  $Y_{obs} - Y_{calc}$  é a diferença entre as curvas, e os traços rosas retratam as posições de Bragg da magnetita e maghemita. Distribuição de Scherrer do tamanho do cristalito da b) magnetita e c) maghemita.

Os diâmetros médios dos cristalitos foram estimados através da equação de Scherrer (Eq. 11), no qual  $D_{hkl}$  é o diâmetro médio do cristalito mensurado a partir do pico de maior intensidade identificado pelos correspondentes índices de Miller (para a amostra estudada foi [311]),  $k$  é uma constante de proporcionalidade (valor adotado para o cálculo de 0,94),  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação para  $CuK\alpha$ ,  $\theta$  é o ângulo de difração e  $\beta$  é a largura a meia altura do pico investigado. Assim, o tamanho médio do cristalito representado pela magnetita foi de 11,69 nm e pela maghemita foi de 12,29 nm, sendo suas distribuições mostradas na Figura 11.b e 11.c, respectivamente. Tais diâmetros se assemelham ao tamanho mínimo da partícula mensurado no MET.

$$D_{hkl} = \frac{k \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos(\theta)} \quad \text{Eq. (11)}$$

A análise de tamanho de partículas tem um papel importante na verificação da aplicabilidade de nanopartículas em áreas biomédicas. Isto se deve ao fato do tamanho ser uma forma de verificar se as nanopartículas encontram-se em uma faixa adequada para terem comportamento superparamagnético, permanecerem dentro do organismo pelo tempo necessário da sua funcionalidade e serem direcionadas para o local almejado do corpo.

A medição do tamanho das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPM\_A1) também foi feita antes e após a sonicação da amostra pela técnica de DLS. Por meio da distribuição de tamanho (Figura 12), percebe-se que sem uma prévia agitação as NPMs formaram dois conjuntos de aglomerados, ilustrando a tendência à aglomeração que esses materiais possuem. O agrupamento de NPMs é favorecido, pois assim, a energia superficial do sistema é minimizada (WU; HE; JIANG, 2008). No entanto, ao sonicar a amostra por 5 min, percebeu-se que houve uma desaglomeração, já que o valor diminuiu para um diâmetro hidrodinâmico de 23,31 nm. Nota-se também uma diferença entre os valores de tamanho obtidos pelo MET e DLS (12 – 50 nm e 23,31 nm, respectivamente). Primeiramente, deve-se ter em vista que a amostragem utilizada em cada método não é totalmente semelhante. Enquanto que no MET usa-se uma gota da amostra para aferir o tamanho, no DLS utiliza-se uma quantidade superior, possibilitando, assim, que mais partículas sejam contabilizadas. Além disso, cada análise tem suas peculiaridades e erros atribuídos à elas. No caso do MET, o preparo da amostra pode ter promovido uma aglomeração das partículas em certas regiões registradas na imagem, proporcionando essa

faixa de tamanho observada, já no DLS, devido a análise ser feita com a amostra em suspensão, há a formação da camada de solvatação ao redor das partículas, a qual proporciona um aumento no valor do diâmetro das mesmas e, por isso, denomina-se de diâmetro hidrodinâmico o tamanho obtido por esta análise.

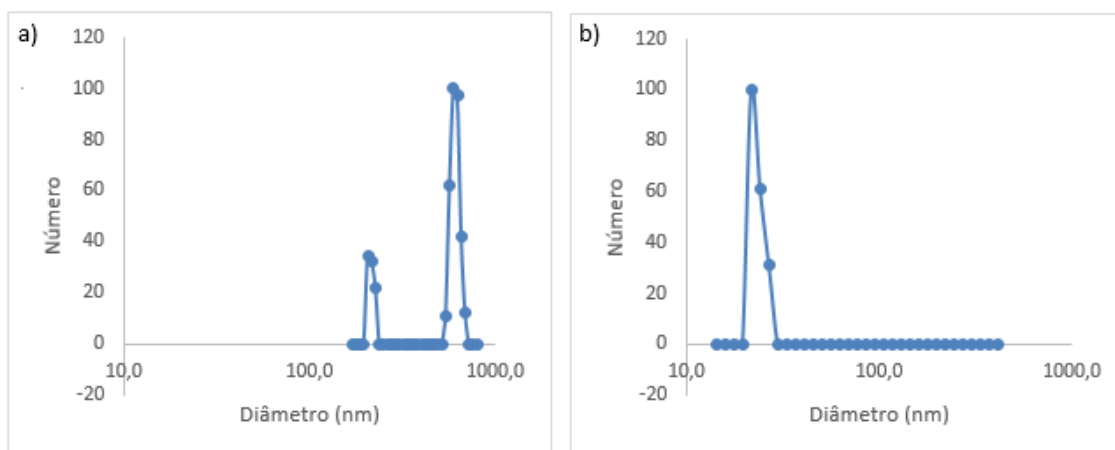


Figura 12: Distribuição do tamanho das nanopartículas de magnetita não estequiométrica, em escala logarítmica: a) amostra sem prévia sonicação e b) com prévia sonicação.

A Tabela 6 apresenta os diâmetros hidrodinâmicos médios das nanopartículas magnéticas, obtidos a partir da distribuição de tamanho pelo DLS.

Tabela 6: Tamanho das nanopartículas magnéticas.

<b>Amostras</b>	<b>Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)</b>	<b>Diâmetro médio de aglomerados (nm)</b>
NPM_A1	523,89	214,53 e 607,91
NPM_A1 sonicada	23,31	-

A caracterização das partículas por meio da medida do potencial zeta permite obter informações a respeito da estabilidade em soluções aquosas e de modificações na superfície das partículas. Pelo fato deste potencial refletir a carga efetiva das partículas, a atração ou repulsão eletrostática entre elas fica evidenciada a partir do seu valor (BEDÊ, 2010). Valores elevados, tanto positivos quanto negativos, indicam uma maior estabilidade da suspensão, pois, neste caso, as partículas tem maior tendência a se repelirem, e conseqüentemente, estão menos propensas a se agregarem. Uma regra geral para este fato, é considerar que valores de potencial zeta maiores que 30 mV ou menores que -30 mV proporcionam suspensões estáveis (BEDÊ, 2010; FERREIRA, 2009).

As nanopartículas de óxido de ferro, quando estão em meio aquoso, ficam hidratadas e sua superfície coberta por grupos FeOH. Dependendo do pH da solução, esses grupos podem dissociar liberando H<sup>+</sup> ou OH<sup>-</sup>, portanto, podendo deixar a superfície carregada negativa ou positivamente, respectivamente (FERREIRA, 2009; TOMBÁČZ et al., 2015). No caso das nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas neste trabalho (amostra NPM\_A1), o potencial zeta tem sinal positivo (Tabela 7), sugerindo a liberação de OH<sup>-</sup>. Além disso, seu valor foi menor que 30mV, o que indica a instabilidade da suspensão e agregação das nanopartículas, também comprovada na análise de tamanho de partículas. Dessa forma, a adição de surfactantes e/ou o recobrimento das nanopartículas podem facilitar a dispersão delas no meio aquoso.

Tabela 7: Potencial zeta da nanopartícula magnética.

<b>Amostra</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>pH</b>
NPM_A1	19,79 ± 0,96	5,5

Pelo fato dessas nanopartículas magnéticas terem apresentado certa instabilidade em meio aquoso, foi requerido um estudo de estabilização utilizando o ácido cítrico como agente dispersante, almejando-se, assim, uma melhor dispersão.

#### **4.2 Estabilização das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com ácido cítrico**

O ácido cítrico é um ácido orgânico fraco e tem três grupos carboxilas (-COOH) em sua estrutura, os quais promovem a sua acidez. Este ácido é bastante utilizado em indústrias alimentícias, químicas e farmacêuticas por apresentar propriedades antioxidantes, sequestrantes, reguladoras de acidez, entre outras (SILVEIRA; MALAGONI, 2013). Além disso, é biocompatível, não tóxico e propicia a desaglomeração de determinadas partículas, como é o caso das nanopartículas de óxido de ferro (MOJÍĆ et al., 2012). Segundo KITTURE et al. (2012) e RĂCUCIU; CREANGĂ; AIRINEI (2006), o ácido cítrico se liga quimicamente à superfície das nanopartículas magnéticas através do complexo carboxilato (COO<sup>-</sup>), promovendo, assim, a estabilidade eletrostática das forças de interação das nanopartículas.

Com base nesta capacidade do ácido cítrico de estabilizar as nanopartículas magnéticas, averiguou-se, por meio da observação das amostras no decorrer do tempo, uma concentração de ácido cítrico e solvente que pudesse dispersar uma maior quantidade dessas nanopartículas, a fim de encapsulá-las posteriormente com sílica. As Figuras 13 e 14 mostram como a dispersão em cada amostra se comportou em variados tempos.

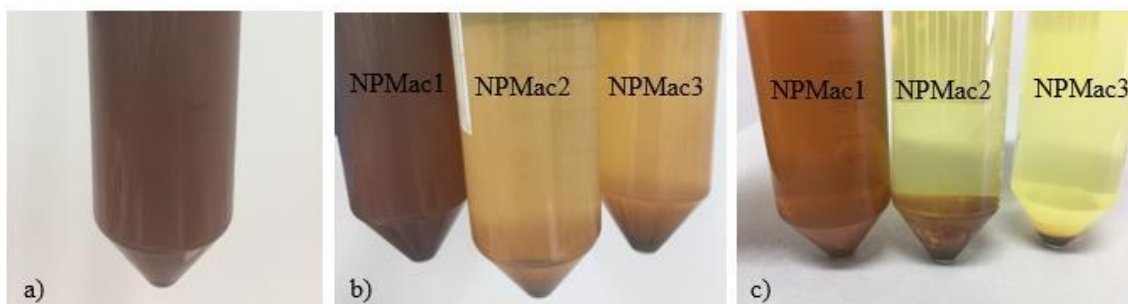


Figura 13: Nanopartículas magnéticas tratadas com ácido cítrico e dispersadas em água ultrapura: (a) logo após a mistura e sonicação dos reagentes, (b) 2 h após a mistura, (c) 20 dias após a mistura. NPMac1, NPMac2 e NPMac3 representam as amostras com concentrações de ácido cítrico baixa, intermediária e alta, respectivamente.

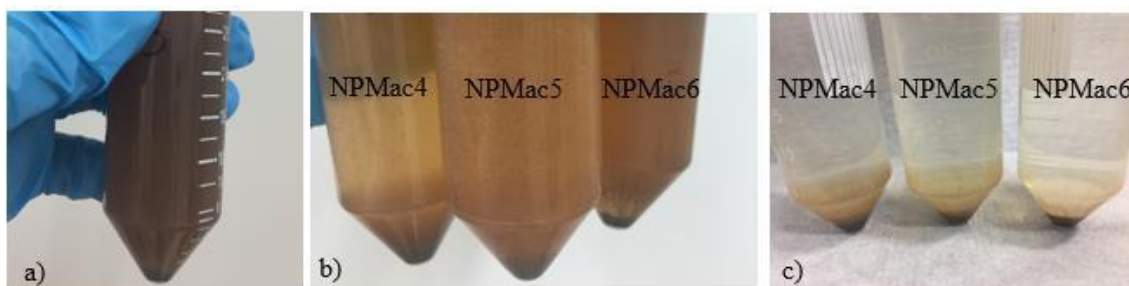


Figura 14: Nanopartículas magnéticas tratadas com ácido cítrico e dispersadas em etanol: (a) logo após a mistura e sonicação dos reagentes, (b) 1 h após a mistura, (c) 20 dias após a mistura. NPMac4, NPMac5 e NPMac6 representam as amostras com concentrações de ácido cítrico baixa, intermediária e alta, respectivamente.

Por meio das Figuras 13 e 14 foi possível analisar a influência que cada solvente tem na dispersão dessas nanopartículas. Em água, observou-se que houve certa precipitação das partículas pouco tempo após a reação, mas após 20 dias ainda era possível visualizar as nanopartículas bastante dispersas na solução, como a NPMac1, e relativamente dispersas (solução amarelada), como as NPMac2 e NPMac3. Em etanol, percebeu-se que na primeira hora de estagnação, as partículas já estavam decantando, e em 20 dias, praticamente todas as partículas das três amostras tinham precipitado, uma vez que a solução já se encontrava transparente. Essa diferença se deve, principalmente, ao fato do ácido cítrico ser muito mais solúvel em água do que em etanol (SILVEIRA;

MALAGONI, 2013). Portanto, nas próximas etapas de recobrimento e adição do fármaco, optou-se por utilizar a água como solvente na dispersão das nanopartículas magnéticas com ácido cítrico.

A melhor concentração de ácido cítrico dentre as testadas em cada solvente pode ser observada analisando as Figuras 13 e 14 separadamente. Através da Figura 13.b, observa-se que, para uma estabilização à curto prazo (2 h), todas as três amostras se mantiveram estáveis, sendo a NPMac1 (0,003 mol/L) a que promoveu a maior dispersão. No entanto, ao avaliar à longo prazo (20 dias) pela Figura 13.c, somente a amostra NPMac1 manteve dispersas as partículas na solução aquosa. Vale ressaltar, que nas amostras NPMac2 (0,1636 mol/L) e NPMac3 (0,03 mol/L) as partículas decantaram quase que por completo em 20 h de descanso. Assim, considerando uma análise visual, pode-se dizer que a concentração de 0,003 mol/L de ácido cítrico em água se mostrou mais apropriada para o propósito deste trabalho, uma vez que apresentou mais partículas dispersas tanto à curto como à longo prazo e, além disso, foi a menor concentração utilizada, necessitando, portanto, de uma menor quantidade deste reagente.

Este resultado mais satisfatório para a amostra de menor concentração de ácido cítrico pode ser explicado pelo pH da solução formada. O ácido cítrico apresenta três valores de pka, iguais à 3,128, 4,761 e 6,396, assim, pode perder os três H<sup>+</sup> dos grupos carboxilas (GUTZ, 2016), se ligando à outros compostos, como as nanopartículas magnéticas. Dessa forma, para ocorrer a desprotonação de ao menos um grupo carboxílico, o meio tem que estar em pH próximo ao pka mínimo, que é de 3,128. Como o pH das amostras NPMac1, NPMac2 e NPMac3 eram 3,8; 2,8 e 2,5, respectivamente, somente a NPMac1 estava em condições favoráveis para ocorrer pelo menos uma desprotonação e, conseqüentemente, maior propensão de ligação do ácido com as nanopartículas. BACRI e colaboradores (1990) ainda acrescentam, afirmando que o ácido cítrico modifica a superfície dessas nanopartículas, alterando o ponto de zero carga delas para um valor mais baixo, e possibilitando, então, a dispersão em solução das nanopartículas em pH próximos ou superiores que 4, como é o caso da amostra NPMac1.

Entre as amostras dispersadas em etanol (Figura 14), percebeu-se que logo no início já era possível visualizar a precipitação das partículas, e que em 20 h já haviam decantado completamente. Além disso, observou-se que à curto e à longo prazo todas as

três amostras se comportaram de modo semelhante. Dessa forma, não se pôde concluir em qual concentração de ácido cítrico em etanol ocorreu a melhor dispersão.

O potencial zeta das nanopartículas magnéticas tratadas com ácido cítrico e dispersadas em água foi aferido, a fim de verificar a estabilidade eletrostática e modificações na superfície. Estes resultados estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8: Potencial zeta e tamanho das nanopartículas magnéticas estabilizadas com ácido cítrico.

<b>Amostras</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>pH</b>	<b>Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)</b>
NPMac1	-31,45 ± 2,01	4,5	190,01
NPMac2	-16,23 ± 0,97	3,5	82,34
NPMac3	-18,86 ± 1,99	3,5	227,48
NPMac4	Não mensurado	5	190,82
NPMac5	Não mensurado	5	95,31
NPMac6	Não mensurado	5	121,41

Comparando os potenciais zeta da amostra NPM\_A1 ( $\zeta = 19,79 \pm 0,96$  mV) com as amostras tratadas com ácido cítrico (NPMac1, NPMac2 e NPMac3), percebeu-se que houve uma mudança nos valores de potencial, indicando que o ácido cítrico foi adsorvido nas nanopartículas magnéticas, e ainda forneceu à elas cargas negativas, já que este ácido apresenta perda de prótons das carboxilas quando está em solução. Em relação as amostras com ácido cítrico, observou-se a influência que o pH tem sobre o potencial zeta. Comparando seus valores, percebeu-se que quanto mais elevado for o pH, mais negativas ficam essas nanopartículas, e conseqüentemente, mais estáveis, como também relatado anteriormente. Este comportamento pode ser melhor investigado quando se faz a curva de potencial zeta *versus* pH.

Também se analisou o tamanho hidrodinâmico das amostras através do DLS, e os resultados estão descritos na Tabela 8. Correlacionando o tamanho das amostras de NPM estabilizadas por meio do ácido cítrico com os solventes utilizados, nota-se que entre elas os resultados foram variados, provavelmente em função da instabilidade de algumas amostras durante a medida. O solvente não teve influência representativa na aglomeração.



Já em comparação com o tamanho obtido e as concentrações adicionadas de ácido cítrico, percebeu-se que as concentrações intermediárias (NPMac2 e NPMac4) foram as que tiveram menores tamanhos, entretanto, não se mostraram tão estáveis quanto a NPMac1 (de menor concentração), como visto mais acima. Este fato pode ter ocorrido por causa da decantação das NPMac2 e NPMac4 no momento da análise devido às suas instabilidades, assim, aferindo-se somente partículas pequenas. Os gráficos da distribuição do tamanho hidrodinâmico das partículas encontram-se no Apêndice A.

### 4.3 Recobrimento das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com sílica

Após recobrimento com sílica, tanto das nanopartículas sem ácido cítrico (amostras NPM\_B1 à NPM\_B4), quanto das estabilizadas com ácido cítrico (NPM\_Bac1 e Bac2), foram obtidos os seguintes valores de potencial zeta (Tabela 9).

Tabela 9: Potencial zeta das amostras revestidas com sílica.

<b>Amostras</b>	<b>Componentes</b>	<b>Potencial Zeta (mV)</b>	<b>pH</b>
NPM_B1	NPM + Si	-29,31 ± 1,34	5,5
NPM_B2	NPM + Si	-30,17 ± 1,40	5,5
NPM_B3	NPM + Si	-28,42 ± 1,27	5,5
NPM_B4	NPM + Si	-24,59 ± 2,44	5,5
NPM_Bac1	NPM + Si + Ac	-42,00 ± 0,74	6,5
NPM_Bac2	NPM + Si + Ac	-40,64 ± 1,44	6,5

As nanopartículas magnéticas revestidas com sílica (NPM\_B1, NPM\_B2, NPM\_B3 e NPM\_B4) obtiveram valores negativos de potencial zeta, próximos a -30 mV. Ao promover um aumento no potencial das nanopartículas magnéticas, a presença da sílica pôde diminuir a aglomeração entre elas. A estabilização por meio da sílica, pode ser explicada por dois motivos. Um deles é o fato do recobrimento com a sílica permitir um bloqueio da atração eletrostática entre elas, fazendo com que a atração diminua a medida que se aumenta a espessura da camada de sílica (MOJIC et al., 2012; SUN et al., 2005). E a outra razão é a capacidade da sílica de fornecer carga ao sistema de

nanopartículas magnéticas, alterando, assim, o valor do potencial zeta. Isso acontece pelo fato da sílica apresentar carga em meio biológico ( $\text{pH} \approx 7$ ), já que seu ponto de carga zero ocorre somente em torno de  $\text{pH} = 2$ , em contrapartida, nesse meio fisiológico, as nanopartículas magnéticas encontram-se no seu ponto de carga zero e, portanto, verifica-se que a presença da sílica é a principal responsável por promover carga a este sistema e, conseqüentemente, aumentar a estabilidade em suspensão (SUN et al., 2005).

As amostras tratadas com ácido cítrico e recobertas com sílica (NPM\_Bac1 e NPM\_Bac2) obtiveram os potenciais mais negativos dentre todas as amostras. Tais resultados já eram esperados, uma vez que, no  $\text{pH} = 6,5$ , a sílica e o ácido cítrico contribuem para aumentar a quantidade de cargas negativas nas nanopartículas. Além disso, observou-se uma boa estabilidade em suspensão (potencial em torno de  $-40 \text{ mV}$ ) neste  $\text{pH}$  perto da neutralidade, o que é bem útil em se tratando de aplicações biomédicas.

Além da mudança do valor do potencial zeta como comprovação do encapsulamento das nanopartículas de óxido de ferro em sílica, a análise dessas amostras no difratograma também buscou verificar este resultado. Como pode ser observado na Figura 15.a, as nanopartículas de sílica (NPSi) obtiveram comportamento amorfo, enquanto que as de óxido de ferro (NPM\_A1) apresentaram picos que descrevem sua forma cristalina, como discutido com mais detalhes no item 4.1. Percebe-se que o encapsulamento se efetivou ao visualizar o difratograma das amostras NPM\_B1 e NPM\_Bac3 e observar a presença desses dois comportamentos. Nessas curvas, verifica-se que há um decaimento da intensidade nos menores ângulos de difração, seguida de uma constância desse valor, comportamento este, característico de material amorfo, tal como as NPSi. Entretanto, nota-se também picos de difração localizados nos mesmos ângulos dos picos pertencentes à NPM\_A1, mas com uma intensidade menor, que pode ser atribuída, portanto, ao impedimento da medida proporcionado pelo revestimento.

A Figura 15.b apresenta a difração de elétrons da amostra NPM\_B2, em que se pode mensurar, pelo *software* DigitalMicrograph, a distância interplanar da amostra por meio dos anéis de difração. Analisando as fichas ICSD do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e do  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , de simetria  $Fd\bar{3}m$ , percebeu-se que a amostra estava em concordância com o padrão dessas estruturas cristalinas. Além disso, não foi visualizada na figura a difração da sílica cristalina, o que confirma a característica amorfa da sílica no revestimento, tal como notado no padrão do DRX.

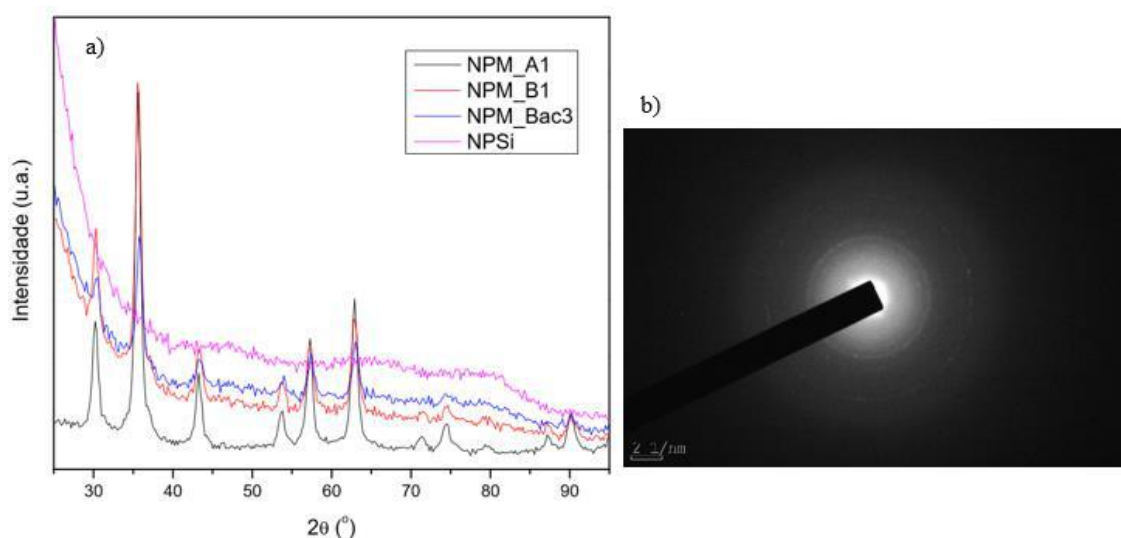


Figura 15: a) Difratoograma das nanopartículas magnéticas puras (NPM\_A1) e revestidas com sílica (NPM\_B1 e NPM\_Bac3), e das nanopartículas de sílica (NPSi); b) Difração de elétrons da amostra NPM\_B2.

O microscópio eletrônico de transmissão foi utilizado para visualizar a morfologia e atestar o encapsulamento das nanopartículas magnéticas pela sílica através do contraste gerado pela diferença de eletrodensidade das moléculas. Por meio da Figura 16 verifica-se que o revestimento de fato ocorreu, apresentando nanopartículas com estrutura núcleo-casca, tendo como contraste claro a sílica e contraste escuro as NPM. Percebe-se que há mais de um núcleo de  $Fe_{3-x}O_{4-y}$  por nanopartícula de sílica, o que pode ser uma vantagem ao aplicar um campo magnético, já que terá mais material magnético para proporcionar a magnetização. Além disso, as ligações entre os contrastes claros da imagem indicaram a interação entre os grupos silanóis das esferas de sílica. O diâmetro médio dessas amostras foi em torno de 70 nm, estando, portanto, dentro da faixa de tamanho de materiais que permanecem na corrente sanguínea e interiorizam em células tumorais (20 à 100 nm) (MARTINS, 2017).

A diferença entre as amostras da Figura 16 está na quantidade dos reagentes utilizados e no modo de dispersão inicial das NPM em etanol. Segundo HUI et al. (2011), uma menor concentração de TEOS gera nanopartículas com espessura da casca de sílica menor. Este fato foi constatado ao visualizar a Figura 16, visto que as amostras que continham menos TEOS em sua composição (NPM\_B3 e NPM\_B4) aparentaram ter uma espessura de sílica menor quando comparadas à NPM\_B1 e NPM\_B2. Entretanto, pelas Figuras 16.e – h, as amostras NPM\_B3 e NPM\_B4 demonstraram certa deformidade na estrutura núcleo-casca e uma maior polidispersão no tamanho das partículas, dessa forma,

considerou-se que a composição da NPM\_B1/NPM\_B2 manteria com mais eficiência o padrão de tamanho e estrutura desejáveis para as aplicações biomédicas almejadas. Em relação ao tipo de dispersão empregado, banho de ultrassom ou sonicador (ultrassom de ponta), a comparação entre as imagens do MET (Figura 16) não seguiram um padrão de comportamento capaz de se obter uma conclusão concreta em relação à influência desse parâmetro.

Através do mapeamento da amostra NPM\_B2 pela espectroscopia por dispersão de energia de raios-X (EDS) (Figura 17), pôde-se obter a distribuição dos elementos ferro, silício e oxigênio na amostra. A nanoestrutura núcleo-casca é observada, apontando o núcleo repleto de Fe e a casca composta por Si e O, indicando assim, a obtenção de um sistema de nanopartículas núcleo-casca de  $Fe_{3-x}O_{4-y}-SiO_2$ . A Figura 18 ilustra as nanopartículas de  $Fe_{3-x}O_{4-y}$  formando um caminho por entre o recobrimento da sílica. Isso demonstra a forte atração eletrostática e de carga entre elas, além da diminuição da energia superficial devido à formação dos aglomerados. Ademais, verifica-se que as NPM serviram como agentes nucleantes na formação da sílica, sugerindo a ocorrência de uma nucleação heterogênea.

As Figuras 19.a, b, c revelam a morfologia e o resultado do revestimento em sílica das nanopartículas magnéticas estabilizadas com ácido cítrico. Como é visto nas Figuras 19.a, b, na amostra NPM\_Bac1 parte das NPM foram recobertas pela sílica, porém também foi observada a formação de grande quantidade de nanopartículas de sílica pura e NPM sem revestimento, apontando que houve uma preferência na geração de esferas de sílica ao invés do recobrimento, sugerindo assim, que a taxa de nucleação da síntese da sílica foi maior que a taxa de condensação (HUI et al., 2011; IBRAHIM; ZIKRY; SHARAF, 2010), o qual não é desejável para o propósito deste trabalho. Além disso, tal como discutido no item 4.2, a formulação desta amostra (representada pela NPMac3) não proporcionou uma boa estabilização das NPM, e por isso, na etapa de revestimento com sílica, o excesso de ácido cítrico utilizado possivelmente desencadeou uma repulsão entre as NPM e sílica, dificultando assim, o recobrimento. Já na Figura 19.c observa-se uma estrutura núcleo-casca com menos NPM internalizadas nas esferas de sílica quando comparadas com a Figura 16, indicando que a quantidade de ácido cítrico usada nesta amostra (0,025 g) manteve a estabilização das NPM durante a etapa de encapsulamento, proporcionando essa menor quantidade de NPM no interior da casca. A Figura 19.d ilustra a morfologia das nanopartículas de sílica, apresentando tamanho entre 10 e 20 nm e

formato esférico, tal como esperado quando a síntese é catalisada por uma base (BENVENUTTI; MORO; COSTA, 2009).

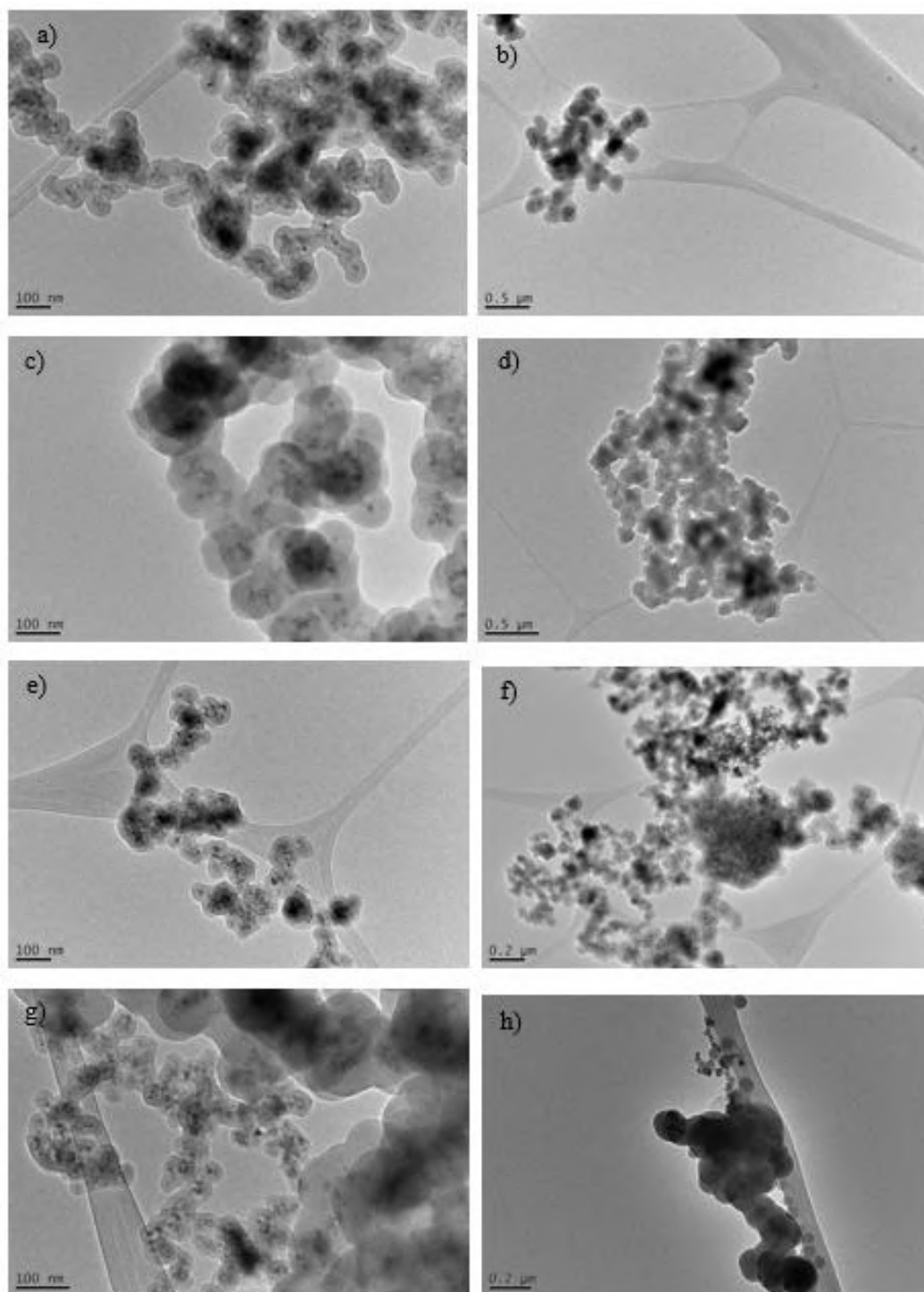


Figura 16: Microscopia eletrônica de transmissão das amostras a) e b) NPM\_B1; c) e d) NPM\_B2; e) e f) NPM\_B3; g) e h) NPM\_B4. A coluna 2 são imagens com amplitudes menores a fim de mostrar uma visão geral do tamanho das partículas. Ultrassom foi usado para dispersar as NPM na etapa inicial da síntese das amostras NPM\_B1 e NPM\_B3, e o sonicador das amostras NPM\_B2 e NPM\_B4.

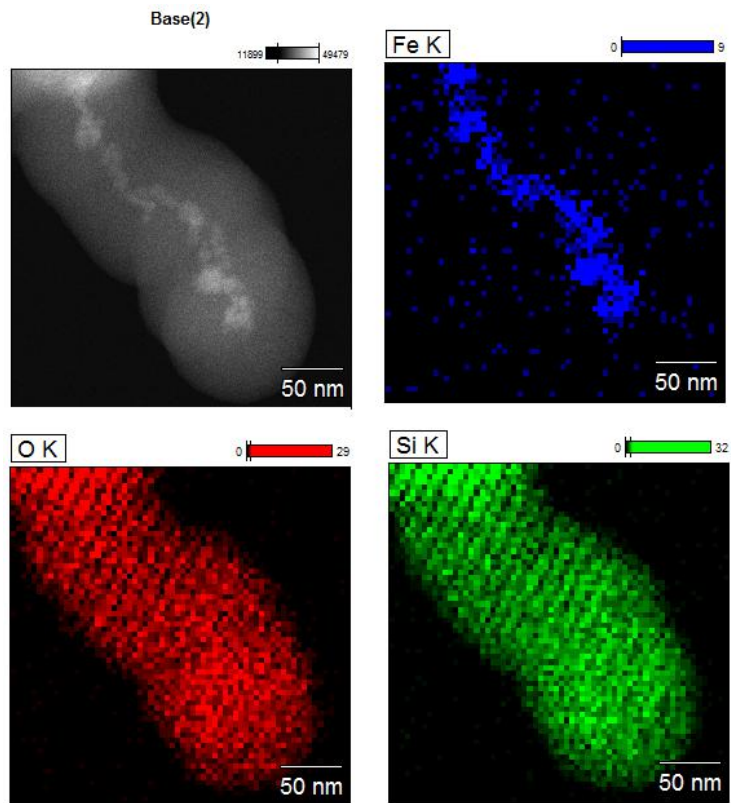


Figura 17: Espectroscopia por dispersão de energia de raios-X da nanopartícula magnética revestida com sílica (NPM\_B2), revelando as distribuições elementares de Fe, Si e O.

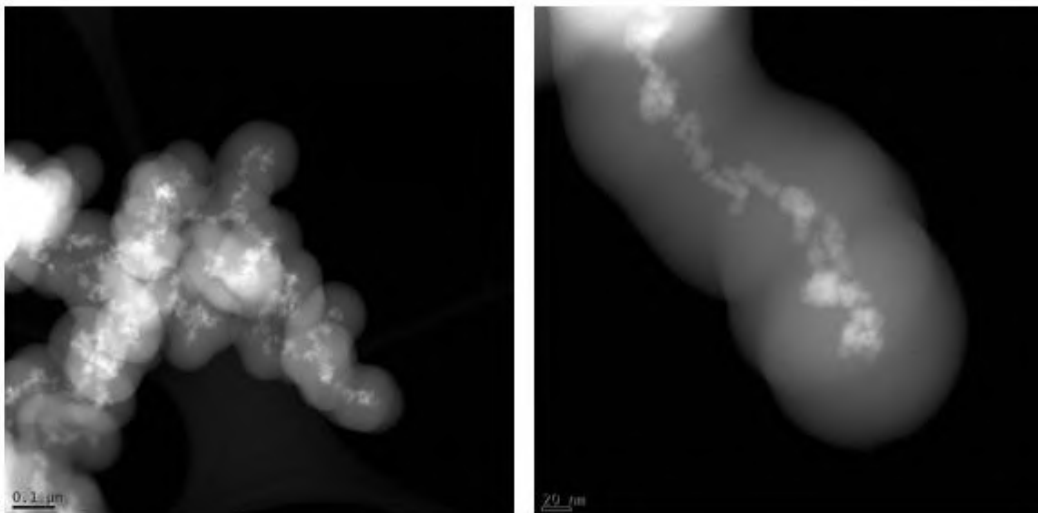


Figura 18: Microscopia eletrônica de transmissão no modo varredura da nanopartícula magnética revestida com sílica (NPM\_B2). Escala de 0,1 μm e 20 nm.

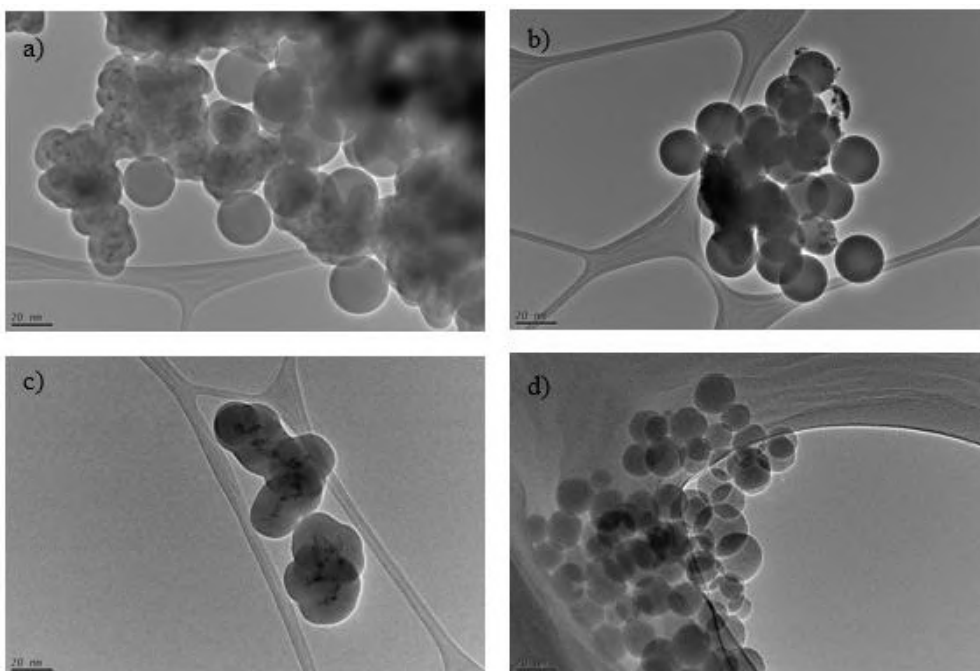


Figura 19: Microscopia eletrônica de transmissão das amostras a) e b) NPM\_Bac1; c) NPM\_Bac3; e d) NPSi. Escala de 20 nm.

A Figura 20 mostra as nanopartículas NPM\_Bac1 e NPM\_Bac3 depois da finalização das sínteses. É observado na Figura 20.a uma heterogeneidade das partículas, em que as partículas de sílica possuem cor branca e as NPM revestidas com sílica uma cor marrom. Por outro lado, as NPM\_Bac3 (Figura 20.b) são partículas homogêneas e de cor marrom mais claro. Tais evidências condizem com as imagens do MET (Figura 19), em que a presença mais notória de nanopartículas de sílica pura pertence à amostra NPM\_Bac1.

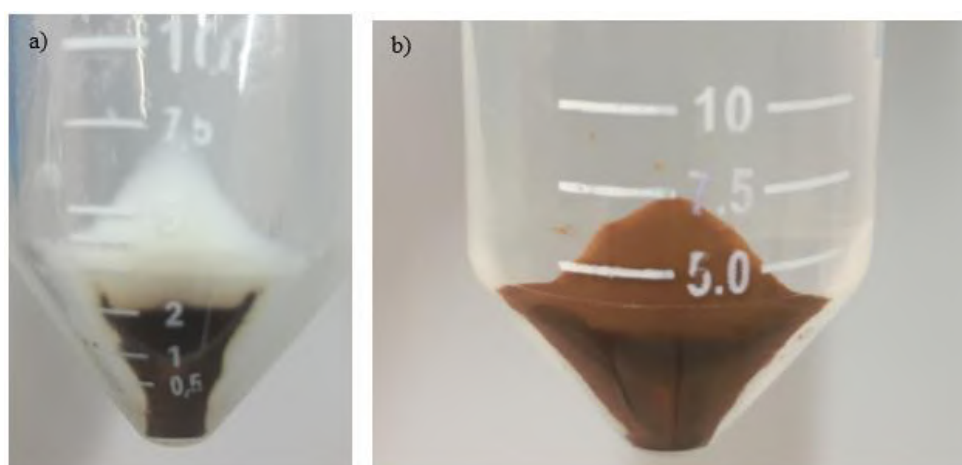


Figura 20: Imagens das amostras após o revestimento das NPM/ácido cítrico pela sílica. a) NPM\_Bac1 (0,25 g de ácido cítrico), e b) NPM\_Bac3 (0,025 g de ácido cítrico).

Para essas amostras também foi medido seus tamanhos hidrodinâmicos pelo DLS, como mostrado na Tabela 10. Em geral, as nanopartículas revestidas com sílica apresentaram um tamanho maior que as NPM puras, o que já era esperado, uma vez que a sílica é capaz de formar uma camada ao redor das NPs de óxido de ferro, aumentando, portanto, o diâmetro dessas estruturas. No entanto, esse aumento é pequeno comparado a outras técnicas de encapsulamento de nanopartículas magnéticas, permitindo um melhor controle das propriedades finais, o que é desejável.

Tabela 10: Tamanho das partículas revestidas com sílica.

<b>Amostras</b>	<b>Componentes</b>	<b>Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)</b>	<b>Diâmetro médio de aglomerados (nm)</b>
NPM_B1	NPM + Si	61,56	-
NPM_B2	NPM + Si	236,50	200,07 e 613,87
NPM_B3	NPM + Si	309,22	-
NPM_B4	NPM + Si	149,31	134,73 e 588,53
NPM_Bac1	NPM + Si + Ac	44,89	-
NPM_Bac2	NPM + Si + Ac	71,41	-

Analisando o modo de agitação no momento da síntese, banho de ultrassom e sonicador, observou-se que as amostras sonicadas (NPM\_B2 e NPM\_B4) geraram dois aglomerados de tamanhos variados, enquanto que o banho de ultrassom proporcionou uma distribuição de tamanho em torno de uma só média (Apêndice A). Provavelmente, este comportamento, provocado pelo sonicador, pode ter ocorrido devido a uma escolha incorreta dos parâmetros de agitação (tempo e velocidade) para este sistema, os quais ao causarem uma agitação muito forte e prolongada, ao invés de desaglomerarem as partículas, provocaram um maior contato entre elas e, assim, a aglomeração.

Ambas as nanopartículas NPM\_Bac1 e NPM\_Bac2, que foram estabilizadas com ácido cítrico e recobertas com sílica, obtiveram diâmetros hidrodinâmicos médios relativamente baixos (44,89 e 71,41 nm, respectivamente). Isto porque, tanto a sílica quanto o ácido cítrico promovem cargas as NPs magnéticas, diminuindo assim, a agregação entre elas, além do mais, a camada de sílica formada impede uma maior atração entre as NPM, o que também evita a aglomeração (SUN et al., 2005). Em comparação



aos solventes empregados na estabilização, nessas amostras foi possível perceber que a água proporcionou ao final menores nanopartículas do que estabilizando em etanol e, por isso, optou-se por utilizá-la na estabilização das próximas sínteses. A distribuição de tamanho dessas amostras está disposta no Apêndice A.

A análise no espectrofotômetro de absorção atômica apresentou como resultados a quantificação das nanopartículas de  $Fe_{3-x}O_{4-y}$  (considerou-se nos cálculos a estequiometria da magnetita -  $Fe_3O_4$ ) encapsuladas nas esferas de sílica, como mostrado na Tabela 11. Aferiu-se também a medida da amostra de NPM a fim de investigar se estava condizente com o valor estequiométrico teórico. Por estequiometria, a porcentagem mássica de ferro presente no óxido de ferro ( $Fe_3O_4$ ) é 71,9 %, e como a NPM\_A1 apresentou 69,63 %, pode-se assumir que o resultado dessa amostra está coerente com o valor teórico, já que também a estequiometria desse óxido não está bem definida. A % Fe experimental foi utilizada como base para a conversão da % Fe em %  $Fe_3O_4$  das amostras encapsuladas.

Tabela 11: Quantificação de nanopartículas magnéticas nas amostras.

<b>Amostras</b>	<b>Componentes</b>	<b>% Fe (m/m)</b>	<b>% <math>Fe_3O_4</math> (m/m)</b>	<b>Desvio padrão, <math>\sigma</math> (%)</b>
NPM_A1	NPM	69,63	100	$\pm 0,98$
NPM_B1	NPM + Si	5,75	8,26	$\pm 0,29$

À critério de comparação, calculou-se a porcentagem máxima de  $Fe_3O_4$  que poderia estar encapsulada na amostra NPM\_B1 (cálculo descrito no Apêndice B), e obteve como resposta 13 %. Observou-se que o valor alcançado experimentalmente foi menor do que o teórico, e uma explicação para tal fato foi o uso do agitador magnético na etapa de revestimento com sílica, pois a barra magnética de agitação atraiu as NPM, dificultando o recobrimento das mesmas. O processo de revestimento requereu uma agitação forte e prolongada, entretanto, o laboratório experimental utilizado não disponibilizava de outro equipamento que suportasse tais condições e por isso, manteve-se o uso do agitador magnético.

## 4.4 Adsorção da curcumina nas nanopartículas magnéticas de óxido de ferro

### 4.4.1 Adsorção com e sem ácido cítrico

Na literatura é possível encontrar trabalhos que promovem a adsorção da curcumina nas nanopartículas de magnetita utilizando ou não um intermediário para a ligação desses dois compostos. BHANDARI e colaboradores (2016) proporcionaram a ligação entre as NPM e curcumina sem a interferência de um ligante. Os autores concluíram que a ligação das NPM ocorreu no grupo ceto-enol da curcumina e além disso, observaram que esta funcionalização serviu para aumentar a estabilidade térmica do nanoparticulado e postergar a degradação do composto orgânico. Em contrapartida, os trabalhos de KITTURE e colaboradores (2012) e WANI e colaboradores (2011) utilizaram o ácido cítrico como intermediário da ligação entre as NPM e a curcumina. Ambos constataram que a superfície das NPM estava conjugada pelas carboxilas disponíveis do ácido cítrico, as quais também se ligavam com o grupo enol (-OH) da curcumina.

Esta pesquisa investigou a adsorção da curcumina nas NPM usando as duas propostas citadas acima. Por meio da análise no espectrofotômetro UV-visível pôde-se observar o comportamento das soluções que continham o sobrenadante das amostras NPM\_C1 (sem ácido cítrico) e NPMac\_C1 (com ácido cítrico) (Figura 21). Os espectros de absorção de ambas as amostras se mantiveram semelhante ao da curcumina pura, com um pico de absorção em  $\lambda = 426$  nm, característico da curcumina. A partir desses espectros e de uma curva de calibração previamente obtida, estimou-se que porcentagem de curcumina adsorvida foi de aproximadamente 25 % e 4 % para NPM\_C1 e NPMac\_C1, respectivamente. A baixa adsorção de curcumina na amostra NPMac\_C1 também foi observada por KITTURE e colaboradores (2012), os quais justificaram que a conjugação das nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ao ácido cítrico foi mais favorável do que à molécula da curcumina. Por esta razão, optou-se por não empregar o ácido cítrico em outras análises e sínteses.

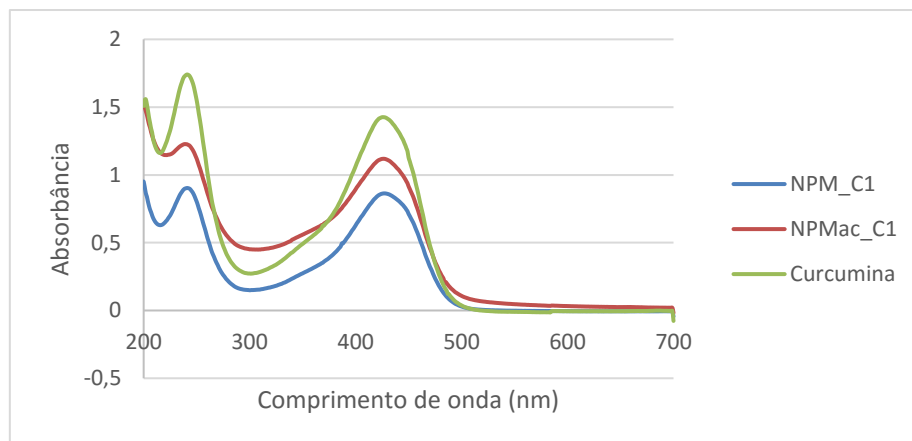


Figura 21: Comportamento das curvas de varredura no espectrofotômetro UV-visível das amostras NPM\_C1, NPMac\_C1 e curcumina pura. Picos em  $\lambda = 426$  nm.

O potencial zeta da amostra NPM\_C1 também foi avaliado, e teve como resposta  $\zeta = -4,33 \pm 0,64$  mV. Como o potencial zeta das NPM apresentaram valor positivo ( $\zeta = 19,79 \pm 0,96$  mV), comprova-se que a curcumina de fato se adsorveu nas NPM.

#### 4.4.2 Cinética de adsorção

O estudo da cinética de adsorção foi útil para aprimorar e otimizar esta etapa e assim, buscar um encapsulamento em sílica mais eficiente. O perfil da quantidade de curcumina adsorvida nas NPM por tempo de agitação e contato com elas está demonstrado na Figura 22. Observa-se que a partir de 48 h a curva se mantém a um valor constante, indicando que a saturação de adsorção foi alcançada. Dessa forma, estabeleceu este tempo como a otimização do estágio de adsorção.

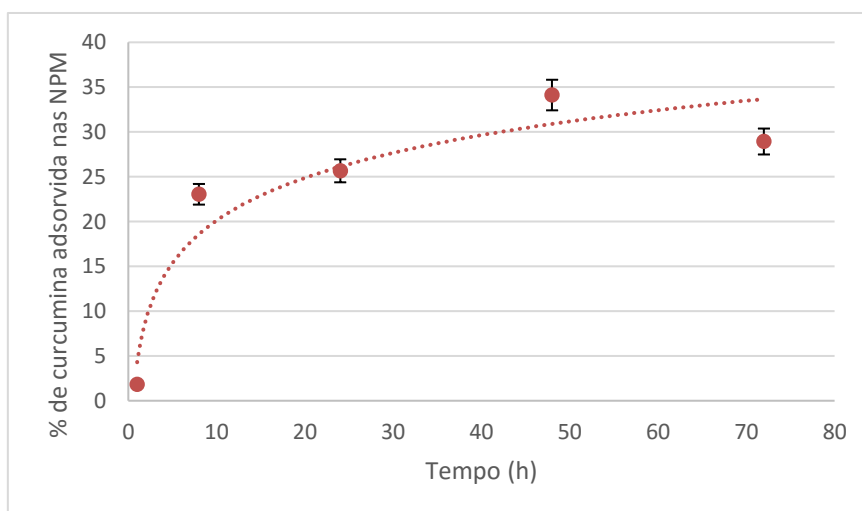


Figura 22: Cinética de adsorção da curcumina nas nanopartículas de  $Fe_{3-x}O_{4-y}$ .

#### 4.4.3 Isoterma de adsorção

Para a formação da isoterma de adsorção foi necessário a realização de diversos ensaios em condições diferentes a fim de obter um perfil completo da curva, capaz de demonstrar corretamente o comportamento apresentado pela adsorção da curcumina nas NPM. A Figura 23 ilustra o perfil da isoterma desse sistema, o qual se assemelha à isoterma conhecida como tipo III. Segundo AMGARTEN (2006) e TEIXEIRA; COUTINHO; GOMES (2001) esse tipo de isoterma indica que as moléculas do adsorvato (curcumina) apresentam maior interação entre si do que com o adsorvente (nanopartículas de óxido de ferro), dessa forma, a interação entre os dois componentes se dá por meio de interações fracas. GREGG (1965) acrescenta também que esse comportamento corresponde à adsorção em múltiplas camadas sobrepostas e geralmente, ocorre em sólidos não porosos ou macroporosos.

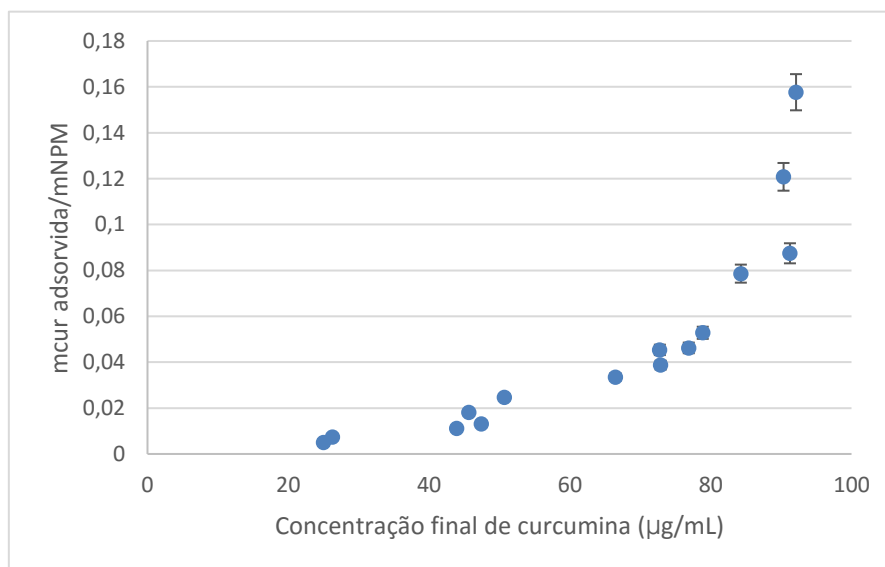


Figura 23: Isoterma de adsorção da curcumina nas nanopartículas de  $Fe_{3-x}O_{4-y}$ .

Por meio dessa curva também se obteve a proporção de curcumina e NPM que otimizasse e promovesse uma melhor adsorção, a qual baseou-se nos maiores valores da divisão da massa de curcumina adsorvida pela massa de NPM. Assim, optou-se pela proporção inicial desses compostos de 1:1, em que apresentou 0,09 (g/g) como valor dessa divisão.

#### 4.4.4 Dessorção da curcumina nas nanopartículas magnéticas de óxido de ferro

A fim de avaliar a estabilidade da adsorção, importante na etapa de encapsulamento, investigou-se a ocorrência de dessorção da curcumina, dessa forma, simulou-se a dessorção nos meios em que a etapa de revestimento foi submetida, ou seja, em meio ácido e básico. A primeira parte desse experimento consistiu na adsorção de 1 mg de curcumina em 30 mg de NPM. Os resultados da quantidade de curcumina adsorvida das amostras (6 amostras – uma para cada tempo da dessorção) após as 48 h foi de aproximadamente 54 % e mostrou reprodutibilidade entre elas e com relação à isoterma.

Já os resultados da etapa de dessorção estão dispostas na Tabela 12. Em ambas as amostras, percebeu-se que a dessorção aumentava com o tempo de contato com o meio. E em comparação com os meios de dessorção, observou-se que em meio ácido (pH = 5,5) a dessorção ocorreu mais lentamente, enquanto que em meio básico (pH = 10) a dessorção foi mais rápida, dessorvendo metade da curcumina nas primeiras 5 h. Este resultado pode ter influenciado a quantidade de curcumina encapsulada em sílica, como será melhor abordado no item 4.5.

Tabela 12: Quantidade de curcumina dessorvida das nanopartículas magnéticas em meio ácido (HE) e básico (HEN), e em cada tempo da dessorção.

Tempo de dessorção (min)	% de curcumina dessorvida	
	Meio ácido	Meio básico
20	11,54	24,56
40	14,64	34,37
60	15,41	38,84
120	18,66	41,53
300	22,79	52,29

#### 4.5 Sistema completo de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, curcumina e sílica

Durante a etapa de revestimento com sílica da NPM contendo curcumina adsorvida, observou-se um comportamento diferente comparado com o recobrimento sem a curcumina: a solução alterava sua cor de amarelo para vermelho/vinho quando em contato com a base  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Pela Figura 24 fica evidente que essa mudança de cor ocorria no mesmo instante em que a base era adicionada no meio reacional de NPM, curcumina, água e etanol. A Figura 25 mostra suspensões do processo de síntese da amostra NPM\_D3, na qual é observado que essa alteração de cor se mantém enquanto o pH da solução for básico. A explicação para tal fato deve-se à influência que o pH tem sobre o comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) da curcumina. Quando em solução básica, a curcumina perde seus prótons ácidos, e assim, fica propensa ao efeito batocrômico, isto é, sofre um deslocamento da posição  $\lambda_{\text{máx}}$  para um comprimento mais elevado devido à interferência de um substituto ou solvente, sendo este novo  $\lambda_{\text{máx}}$  responsável pela coloração avermelhada (SUETH-SANTIAGO et al., 2015). Além disso, pode ter ocorrido uma conjugação no  $\text{OH}^-$  do grupo fenol da curcumina, o qual é responsável por fornecer cor a esse composto (cromóforo) (KITTURE et al., 2012).

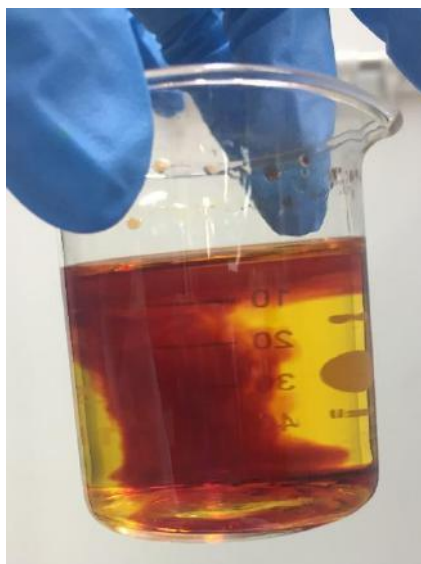


Figura 24: Adição do hidróxido de amônio na suspensão de curcumina, NPM, água e etanol. A base proporciona a mudança de cor da curcumina.

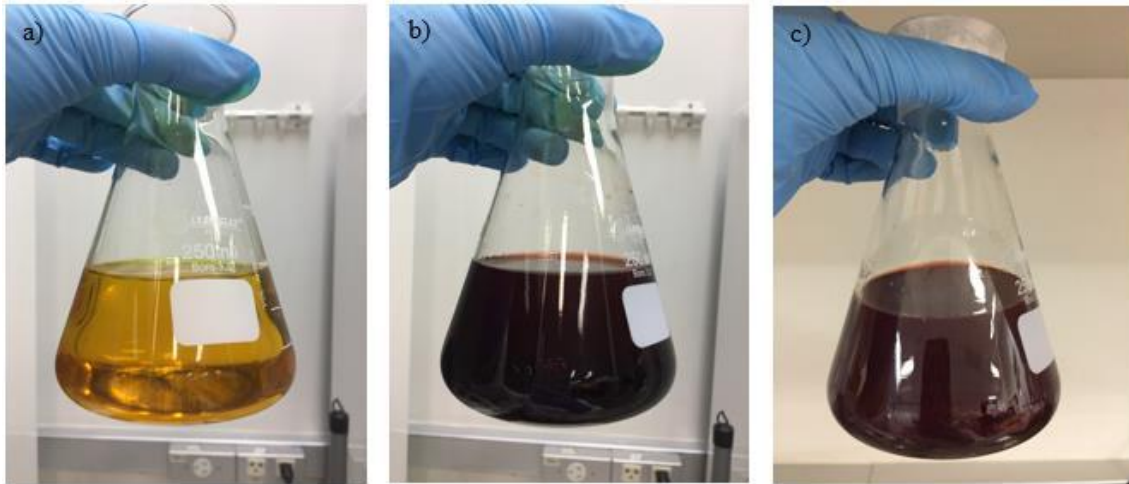


Figura 25: Suspensões da etapa de revestimento da amostra NPM\_D3. a) NPM, curcumina, água e etanol; b) NPM, curcumina, água, etanol e subsequente adição de hidróxido de amônio; c) NPM, curcumina, água, etanol e 24 h após adição de hidróxido de amônio.

A Figura 26 exibe a coloração de todos os sobrenadantes das amostras que continham curcumina. E como dito anteriormente, a coloração avermelhada foi notada somente nas amostras realizadas em meio básico (Figura 26.b – e). Entretanto, a tonalidade do vermelho entre essas amostras ficou diferente, sendo as mais claras referentes às amostras que possuía menos curcumina, e escura para as de maior quantidade, tal fato, ocasionou  $\lambda_{\text{máx}}$  distintos para cada amostra, como são vistos na Figura 27. Essa questão dificultou a obtenção de valores mais confiáveis para a quantidade de curcumina encapsulada de certas amostras, já que esse cálculo se baseou nos valores de absorbância obtidos no espectrofotômetro UV-visível. Como  $\lambda_{\text{máx}}$  da curva que representa a calibração no meio básico foi de 502 nm (evidência do efeito batocrômico), era esperado que nesse meio todas as amostras obtivessem esse mesmo  $\lambda_{\text{máx}}$ , porém, somente a da amostra NPM\_D3 se assemelhou à calibração. Portanto, essa amostra foi escolhida para ser analisada em outros procedimentos, como os ensaios de liberação. De qualquer forma, é apresentado na Tabela 13 as porcentagens de curcumina que foi encapsulada nas amostras. Para a NPM\_D3, o encapsulamento foi em torno de 28 %, valor este não muito elevado, porém satisfatório para a aplicabilidade deste trabalho e para o possível uso na área biomédica. Provavelmente, a dessorção da curcumina a partir das NPM impossibilitou que este valor fosse maior.

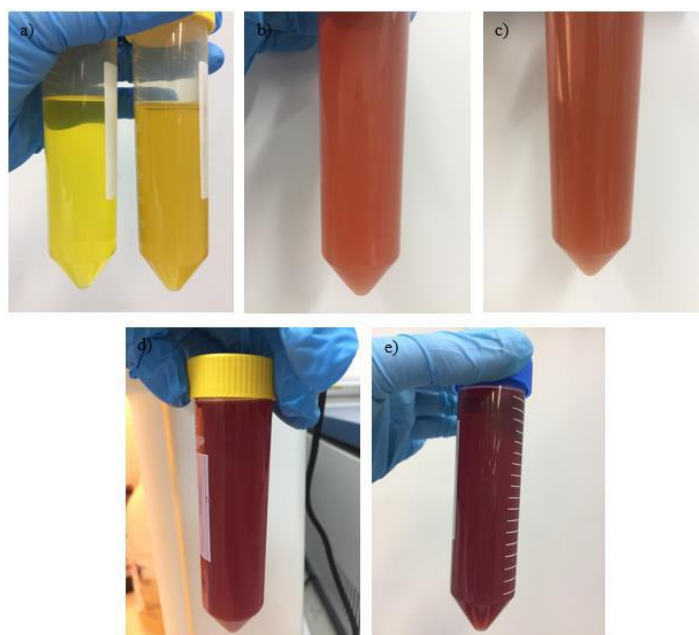


Figura 26: Soluções reacionais do preparo das amostras: a) NPM\_C1 (amarela clara) e NPMac\_C1 (amarela escura); b) NPM\_D1; c) NPMac\_D1; d) NPM\_D2; e) NPM\_D3.

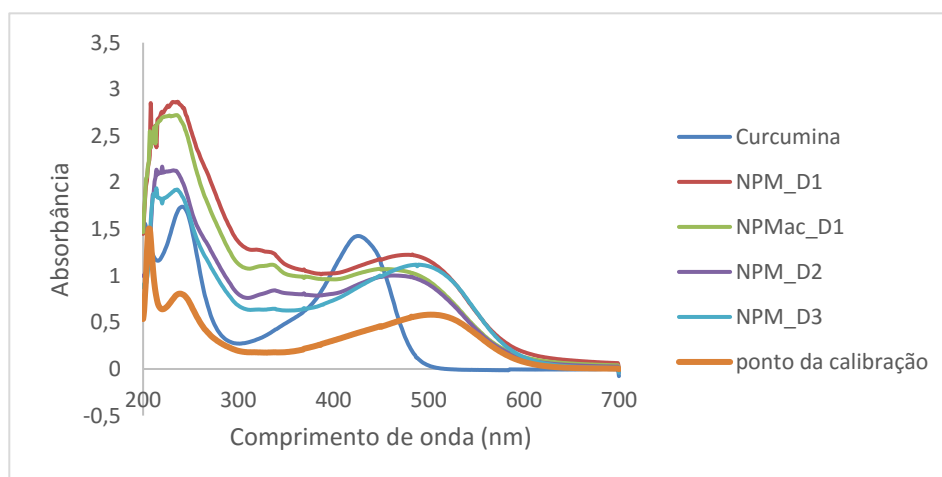


Figura 27: Comportamento das curvas de varredura no espectrofotômetro UV-visível das amostras com curcumina, NPM e revestimento com sílica; curcumina pura e uma concentração da curva de calibração em meio básico.

Tabela 13: Quantidade de curcumina encapsulada em sílica.

Amostras	NPM_D1	NPMac_D1	NPM_D2	NPM_D3
Componentes	NPM + Cur + Si	NPM + Cur + Ac + Si	NPM + Cur + Si	NPM + Cur + Si
% curcumina encapsulada	25,04	40,19	41,10	27,81



Imagens da microscopia eletrônica de transmissão da amostra NPM\_D3 também foram feitas a fim de avaliar a morfologia, encapsulamento das NPM e a influência da curcumina nesse recobrimento. A Figura 28.a comprova que houve o encapsulamento das NPM pela sílica, com mais de um núcleo magnético por nanopartícula de sílica, porém comparado com as NPM\_Bs (sem curcumina, Figura 16), essa quantidade de núcleos foi menor para a NPM\_D3. Observou-se também que havia nanopartículas sem óxido de ferro (esferas sem pontos escuros – NPM), a qual pode ter sido proporcionada pela presença da curcumina aderida às NPM, uma vez que a adsorção da curcumina alterou a carga superficial das NPM de positivo para negativo ( $\zeta_{\text{NPM}} = 19,79 \text{ mV}$ ;  $\zeta_{\text{NPM+cur}} = -4,33 \text{ mV}$ ), podendo, assim, ter prejudicado a ligação da sílica nas NPM, já que a sílica também tem potencial zeta negativo. Ademais, em algumas esferas notou-se mais um contraste além dos atribuídos às NPM e sílica, indicando ser possivelmente a matriz orgânica formada pela curcumina (FERREIRA et al., 2017), estando ela localizada entre as NPM e sílica. Por esta figura, vê-se que o tamanho das NPM\_D3 foi em torno de 100 nm, semelhante às NPM\_Bs. Já a Figura 28.b realça a morfologia esférica obtida por estas amostras, e também uma menor quantidade de aglomerados.

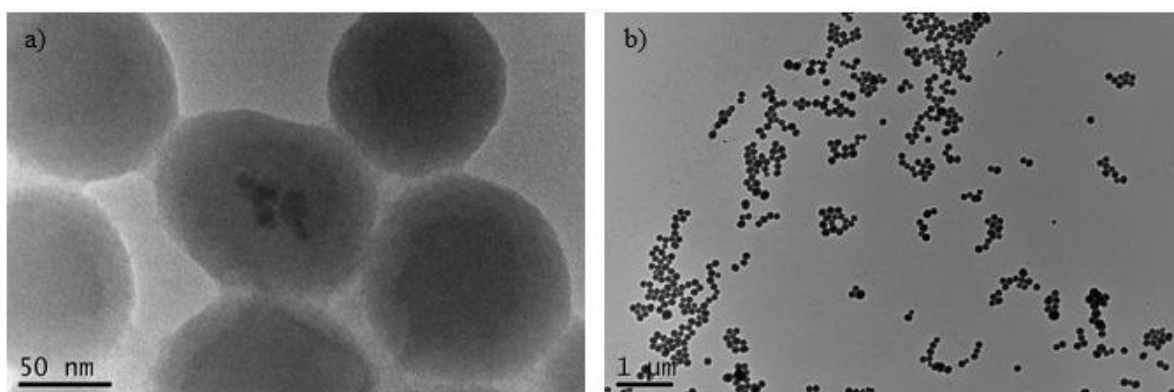


Figura 28: Microscopia eletrônica de transmissão da amostra NPM\_D3 focalizada: a) nas NPM encapsuladas e b) na morfologia esférica das nanoestruturas.

O diâmetro hidrodinâmico das amostras NPM\_D2 e NPM\_D3 está mostrado na Tabela 14. Em geral, o tamanho mensurado pelo DLS é maior do que o obtido pelo MET, pois no DLS é contabilizado também a camada solvatada ao redor da partícula, por isso foi notado essa diferença nos diâmetros das amostras, como a NPM\_D3. Além disso, pela tabela, percebe-se que a NPM\_D2 obteve um valor menor, possivelmente por ter menos curcumina na superfície das NPM, já que sua síntese não usou o tempo de adsorção

otimizado (48 h), entretanto suas partículas apresentaram uma distribuição de tamanho mais larga, enquanto que a NPM\_D3 foi bem estreita (Figura 29).

A Tabela 14 traz também os resultados do potencial zeta das NPM\_D2 e NPM\_D3. Observa-se que ambas obtiveram valores negativos, indicando que o revestimento com sílica se efetivou, e valores fora da região de instabilidade ( $30 \text{ mV} < \zeta < -30 \text{ mV}$ ), mostrando a boa estabilidade em suspensão já em pH fisiológico, a qual é necessária para o uso biomédico.

Tabela 14: Potencial zeta e tamanho das nanopartículas do sistema completo.

Amostras	Potencial Zeta (mV)	pH	Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)
NPM_D2	$-37,87 \pm 1,80$	6,5	84,10
NPM_D3	$-30,06 \pm 1,14$	7	147,80

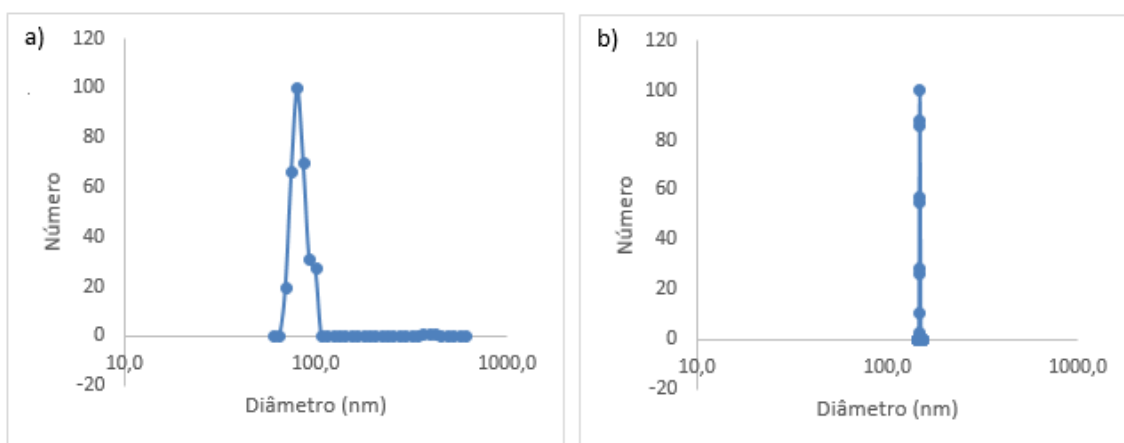


Figura 29: Distribuição do tamanho das nanopartículas, em escala logarítmica: a) NPM\_D2 e b) NPM\_D3.

A quantificação de  $\text{Fe}_{3-x}\text{O}_{4-y}$  presente nas nanopartículas foi mensurado através da espectrometria de absorção atômica. Para a NPM\_D3 o percentual de ferro foi de  $8,1 \pm 0,44$ , e transformando em porcentagem de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  obteve-se 11,63 %. Tal como para a amostra NPM\_B1, também se comparou o valor experimental com o máximo teórico (Apêndice B). A porcentagem máxima referente à NPM\_D3 foi de 12,5 %, valor este relativamente semelhante ao resultado experimental e, portanto, mostrando que grande parte das NPM foi encapsulada.

## 4.6 Análises de fluorescência da curcumina

### 4.6.1 Fluorímetro

Inicialmente, analisou-se em fluorímetro uma solução de curcumina em etanol para confirmar se a curcumina apresentava fluorescência, averiguando a presença dos picos de excitação e emissão, como ilustrado no espectro da Figura 30. Observa-se que o comprimento de onda de excitação da curcumina utilizada neste trabalho foi em 426 nm, sendo o mesmo valor encontrado pelo espectrofotômetro UV-visível, e o comprimento de onda de emissão foi igual à 520 nm, evidenciando a fluorescência. Alguns trabalhos da literatura também avaliaram esse espectro, e obtiveram comportamento semelhante ao desta pesquisa, apresentando  $\lambda_{\text{excitação}}$  entre 420 e 460 nm, e  $\lambda_{\text{emissão}}$  de 499 à 545 nm (CHANG et al., 2014; NGUYEN et al., 2016; SAHU; KASOJU; BORA, 2008). O espectro da curcumina apresenta essas variações no  $\lambda_{\text{máximo}}$ , pois suas propriedades fluorescentes são muito sensíveis à polaridade do ambiente em que se encontra (SAHU; KASOJU; BORA, 2008).

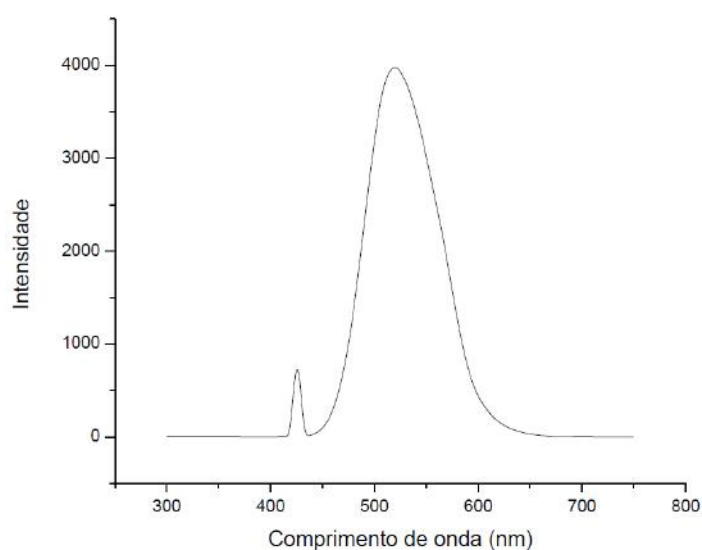


Figura 30: Espectro da curcumina em etanol obtido pelo fluorímetro. O primeiro pico refere-se ao  $\lambda_{\text{excitação}}$  e o segundo ao  $\lambda_{\text{emissão}}$ .

A Figura 31 exibe os espectros da curcumina em concentrações diferentes dispersadas em etanol. Nota-se que a fluorescência da curcumina é mensurável mesmo em concentrações bem reduzidas, como 1  $\mu\text{g/mL}$ . Ademais, verifica-se que a intensidade da fluorescência é proporcional à concentração da curcumina, tal como ocorre com a absorvância no espectrofotômetro UV-visível. Entretanto esta característica somente é obedecida até a concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ , ou seja, nas soluções mais diluídas. Após esta

concentração, os valores da intensidade diminuem à medida que se tem mais curcumina no meio. Tal fenômeno, conhecido como efeito de filtro interno, ocorre porque, como a concentração da curcumina estava muito elevada, ao invés de ter emitido toda luz incidente, a amostra absorveu uma parte considerável desta luz antes mesmo dela chegar no ponto onde a fluorescência é observada e ainda reabsorveu a luz que havia sido emitida, causando, portanto, perda na intensidade da fluorescência.

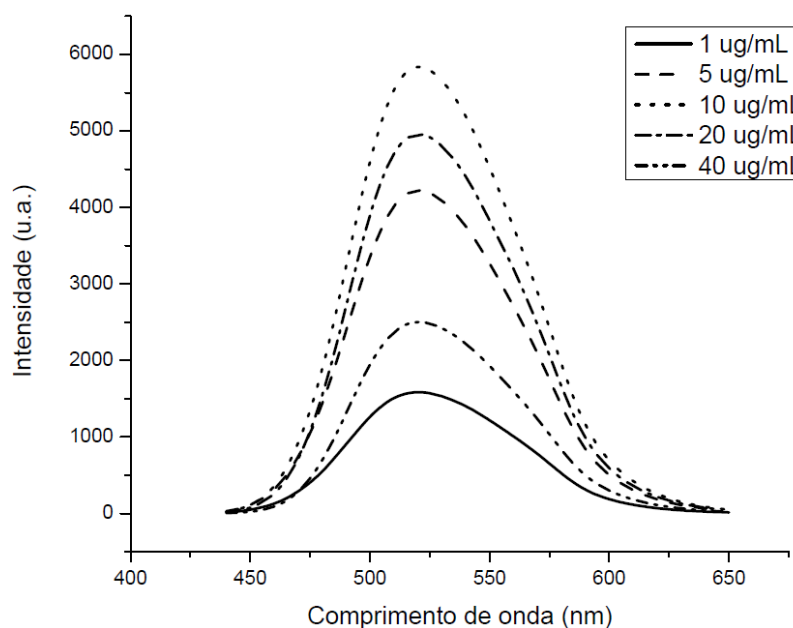


Figura 31: Espectro da curcumina em etanol em diversas concentrações.

#### 4.6.2 Microscópio de fluorescência invertido

A análise no fluorímetro serviu para confirmar a fluorescência da curcumina, porém ainda era preciso verificar se essa fluorescência permanecia visível após a curcumina ser encapsulada em sílica, dessa forma, fez-se o registro das amostras no microscópio de fluorescência invertido (Figura 32). A Figura 32.a é a imagem das nanopartículas de sílica, na qual foi usada como amostra controle para evidenciar a não contribuição da sílica na fluorescência das imagens. Por outro lado, a Figura 32.b ilustra claramente e por toda imagem a fluorescência que a curcumina possui. Mesmo com um tempo de exposição à luz ultravioleta pequeno (20 ms), é notória a intensidade da luz emitida por este fluoróforo. Além disso, a curcumina pura emitiu fluorescência em todos comprimentos de onda de excitação que o equipamento disponibilizava (350, 488 e 550 nm), sendo mais pronunciada em  $\lambda = 488$  nm, valor este que mais se aproxima do  $\lambda_{excitação}$

da curcumina ( $\lambda = 426 \text{ nm}$ ). Os pontos mais escuros encontrados na Figura 32.b podem ser regiões de maior concentração de curcumina que, provavelmente, dificultou a incidência e emissão da luz no momento da medida.

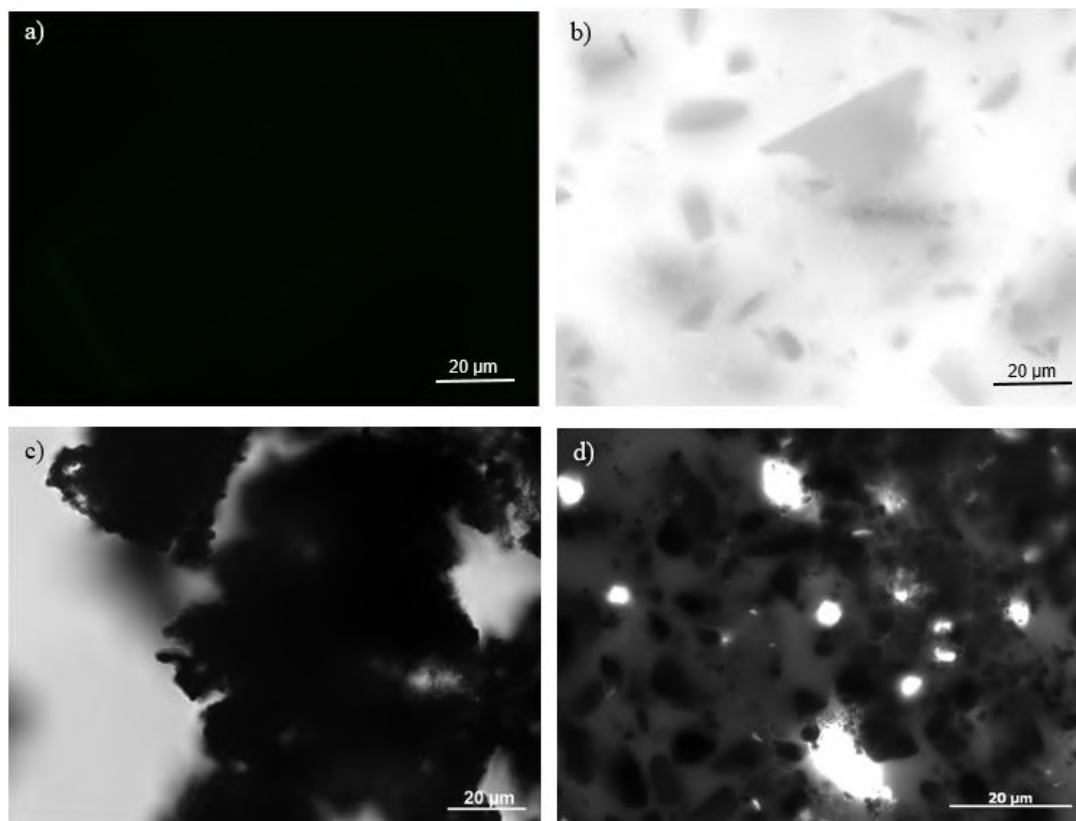


Figura 32: Imagens do microscópio de fluorescência invertido em  $\lambda_{\text{excitação}} = 488 \text{ nm}$  das amostras: a) sílica pura (NPSi); b) curcumina pura; c) NPM revestida por sílica (NPM\_B2); d) NPM e curcumina revestida por sílica (NPM\_D3). As imagens a), b) e c) tiveram aumento de 63x e a imagem d) de 100x. Tempo de exposição à luz foi de 20 ms para as imagens a) e b), e 1,5 s para c) e d).

As Figuras 32.c, d representam as amostras revestidas por sílica. Pela Figura 32.c percebe-se o aglomerado escuro das nanopartículas magnéticas recobertas por sílica, no qual não foi encontrado nenhuma região com o brilho da fluorescência. Em contrapartida, na Figura 32.d, a qual possui a nanoestrutura de NPM e sílica mais a curcumina, observam-se vários pontos brilhantes, concluindo, assim, que de fato havia curcumina nessa amostra mesmo após o processo de lavagem e secagem, e que a ligação com as NPM e o revestimento com a sílica não impediram que a fluorescência da curcumina se manifestasse. Notou-se também nessa imagem pontos escuros, os quais se assemelharam com a região escura da Figura 32.c, ou seja, com os locais referentes à NPM e sílica. Pelo fato desse microscópio não possuir um alcance de ampliação tão elevado quanto o MET, não foi possível visualizar exatamente as nanopartículas esféricas, e tão pouco os limites

entre os compostos desse sistema nanoparticulado. De todo modo, pode-se afirmar que a curcumina além de possuir atividades biofarmacêuticas, também tem potencial como excelente agente de contraste fluorescente em bioimagem, fazendo com que essas nanopartículas possam ser usadas, por exemplo, como marcadores de células-tronco.

#### 4.7 Magnetometria

A medida qualitativa de magnetização das amostras de nanopartículas magnéticas sem e com recobrimento de sílica foi realizada encostando um ímã de neodímio-ferro-boro na parede dos tubos que continham as suspensões magnéticas, conforme ilustrado na Figura 33. Analisando esta figura, nota-se que ambas suspensões puderam ser atraídas pelo ímã, mostrando terem algum grau de magnetização. Entretanto, ao comparar as amostras sem e com revestimento (Figuras 33.a, b, respectivamente), verificou-se que o ímã somente permanecia fixado à parede do tubo falcon pertencente à amostra de nanopartículas magnéticas puras, indicando que nas amostras encapsuladas havia menos material magnético e/ou que o revestimento com a sílica diminuía a intensidade da magnetização das NPs, porém não a extinguindo totalmente e, portanto, mantendo ainda as propriedades magnéticas deste nanomaterial.

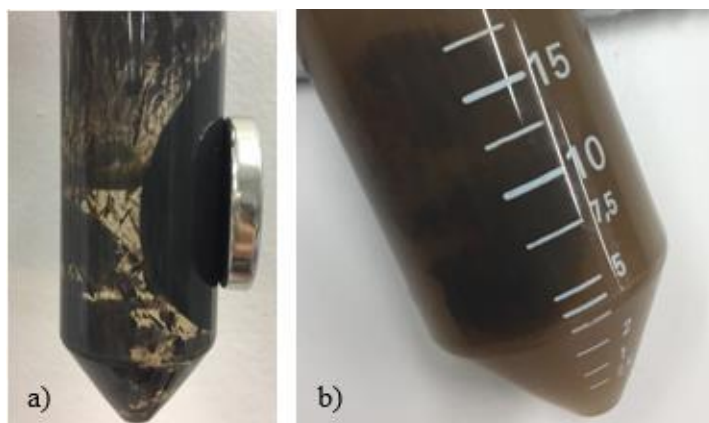


Figura 33: a) Suspensão com nanopartículas magnéticas de óxido de ferro sendo atraídas pelo ímã (amostra NPM\_A1), b) suspensão com nanopartículas magnéticas de óxido de ferro revestidas com sílica após a aproximação do ímã no tubo falcon (NPM\_B1).

Em geral, as propriedades magnéticas de um material são influenciadas pelo seu tamanho e formato. Tal fato é notado ao quantificar a magnetização de saturação ( $M_s$ ) de um mesmo material quando este está na fase *bulk* e nanoestruturado. Na maioria dos casos, percebe-se que este valor de magnetização é maior quando os materiais estão na

dimensão macroscópica. Um exemplo é a magnetita nanoparticulada, a qual apresenta  $M_s$  variando entre 30 e 80 A.m<sup>2</sup>/kg, enquanto que seu *bulk* tem magnetização superior à 92 A.m<sup>2</sup>/kg (WU et al., 2015; WU; HE; JIANG, 2008). Essa diferença pode ser explicada pela relação entre o comportamento magnético dos materiais e sua região superficial. A superfície das partículas apresenta uma desordem por causa da presença de vacâncias, ligações rompidas e anisotropia com intensidade e direção definida para cada sítio. Tais efeitos não são muito pronunciados em sistemas macroscópicos, entretanto, com a diminuição do tamanho desses materiais, a razão área/volume aumenta consideravelmente, tornando os momentos magnéticos das camadas superficiais tão importantes quanto os momentos ordenados do interior da partícula e por isso, essa desordem da superfície também intervém na magnetização do nanoparticulado (FERREIRA, 2009).

Uma maneira de obter informações a respeito das propriedades magnéticas do material, incluindo o tipo de magnetização e quantificação da  $M_s$ , é por meio da análise do gráfico das medidas de magnetização como função do campo magnético aplicado ( $M \times H$ ). A Figura 34 apresenta este gráfico com as curvas de magnetização de algumas amostras sintetizadas neste trabalho. Percebe-se que, na temperatura de 27 °C (300 K), o comportamento de todas as curvas foi sigmoideal e não apresentou histerese, constatando, assim, o superparamagnetismo das nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas pelo método de coprecipitação. É comum observar outros tipos de magnetismo nessas nanopartículas após elas serem encapsuladas por materiais não magnéticos, entretanto, o revestimento pela sílica realizado nesta pesquisa não encobriu o superparamagnetismo das NPM. Tal resultado é muito importante e bem conveniente para o uso em aplicações biomédicas, já que as nanopartículas só terão influência magnética na presença do campo magnético externo, e dessa forma, diminui-se a propensão à agregação e tem-se maior controle sobre as nanopartículas.

A partir das curvas descritas na Figura 34, foram obtidos os dados de magnetização de saturação que estão mostrados na Tabela 15. As nanopartículas de óxido de ferro puro (NPM\_A1) obtiveram a  $M_s$  dentro da faixa referente à magnetita observada por outros autores (30 - 80 A.m<sup>2</sup>/kg) (FERREIRA, 2009; WU et al., 2015; WU; HE; JIANG, 2008). Além disso, o valor da  $M_s$  encontrado neste trabalho foi maior do que os alcançados por HUI et al. (2011) e SUN et al. (2005), os quais sintetizaram nanopartículas de óxido de ferro com  $M_s = 57,5$  e 46,3 A.m<sup>2</sup>/kg, respectivamente.

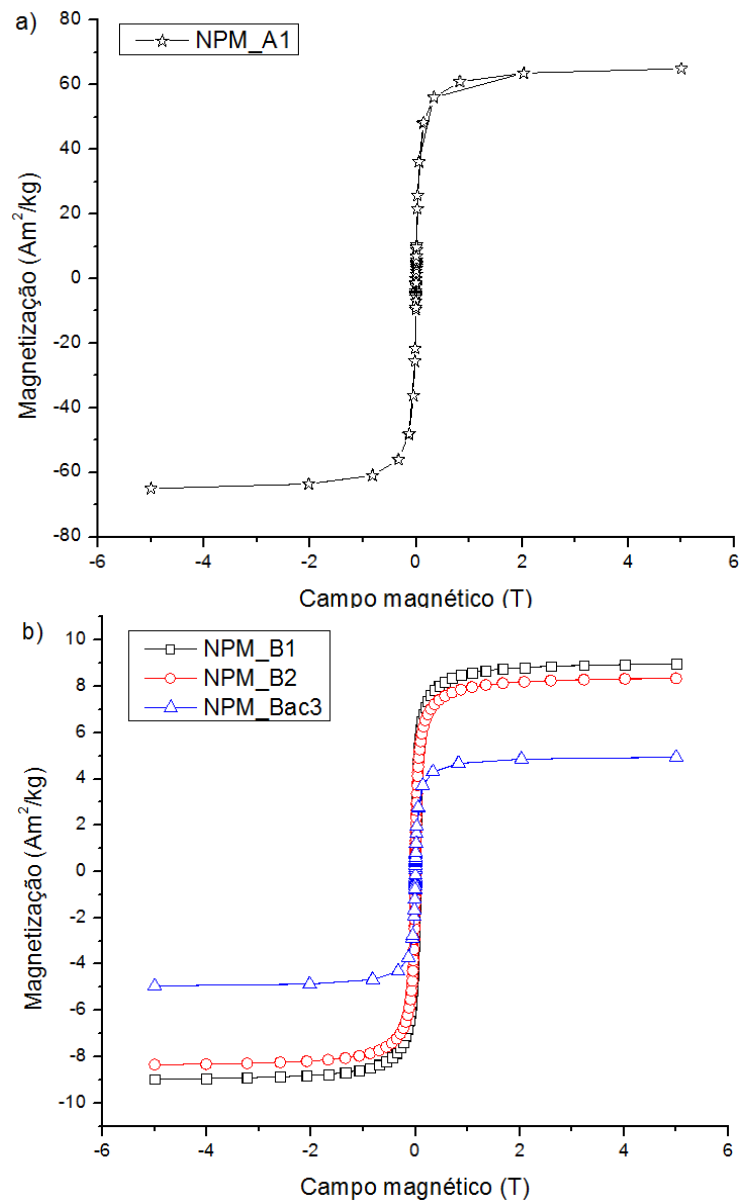


Figura 34: Curvas de magnetização *versus* campo magnético aplicado à 27 °C (300 K) das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro a) puro (NPM\_A1) e b) revestidas por sílica (NPM\_B1, NPM\_B2 e NPM\_Bac3).

Tabela 15: Magnetização de saturação extraída das curvas de MxH.

Amostras	NPM_A1	NPM_B1	NPM_B2	NPM_Bac3
Componentes	NPM	NPM + Si	NPM + Si	NPM + Ac + Si
Ms (A.m <sup>2</sup> /kg)	65,03	8,97	8,35	4,94

Os resultados da magnetização de saturação mostraram que as amostras de NPM recobertas por sílica apresentaram uma redução no valor dessa magnetização comparada



a do precursor magnético, tal como já verificada na medida qualitativa de magnetização (Figura 33). Essa perda de magnitude ocorreu principalmente devido à contribuição do material não magnético (sílica) na medida e a uma menor quantidade do material magnético ( $\text{Fe}_{3-x}\text{O}_{4-y}$ ) nessas amostras revestidas. Mas além disso, a superfície da magnetita não estequiométrica pode ter sido oxidada durante a etapa de encapsulamento, contribuindo também com a diminuição na magnetização da amostra final (MARTINS, 2017). Já HUI e colaboradores (2011) concluíram pelos seus resultados que a  $M_s$  diminuía à medida que se aumentava a espessura da casca da sílica. Para o caso da amostra NPM\_Bac3, além dos motivos apresentados, nesta amostra foi constatado pelas imagens do MET menos NPM dentro das esferas de sílica, o que pode ter proporcionado uma  $M_s$  mais baixa do que nas NPM\_B1 e NPM\_B2, as quais tiveram valores semelhantes entre si. Tal comportamento é reportado por outros autores quando nanopartículas magnéticas são recobertas com materiais de diversas naturezas (CHIN et al., 2009; KHOSROSHAHI; GHAZANFARI, 2012; SOARES et al., 2016). Apesar desta adversidade, o sistema nanoparticulado produzido nesta pesquisa apresentou comportamento superparamagnético e boa magnetização de saturação, os quais propiciam uma melhor relaxação de prótons, auxiliando no contraste das imagens por ressonância magnética. Entretanto, tais comportamentos por si só não são suficientes para comprovar a total aplicabilidade como agente de contraste em IRM, é preciso ainda averiguar, por exemplo, os tempos de relaxação ( $T_1$  e  $T_2$ ) do nanoparticulado e até mesmo imagens por ressonância magnética dessas nanopartículas internalizadas em um ser vivo.

#### **4.8 Hipertermia magnética**

Alguns dos sistemas de nanopartículas sintetizados nesta pesquisa foram avaliados quanto à hipertermia magnética, com intuito de investigar o potencial de liberação de calor do material ao ser submetido à aplicação de um campo magnético alternado externo. A Figura 35 aborda os perfis de liberação de calor das amostras em suspensão aquosa. Observa-se que a temperatura do meio aumenta conforme transcorre o tempo da medida. Além disso, constatou-se, em alguns perfis, inflexões irregulares, que podem estar relacionadas à decantação das partículas promovida pela ação do campo magnético.

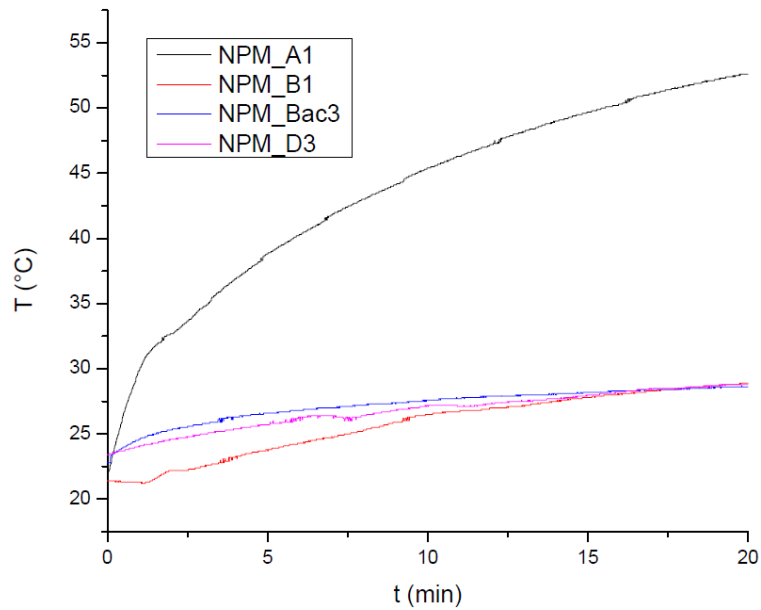


Figura 35: Perfil da liberação de calor das amostras com diferentes formulações, sob aplicação de campo magnético alternado a 16 kA/m (200 Gauss) e 307 kHz. As amostras estavam na concentração de 10 mg/mL.

O perfil inclinado das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro puro (NPM\_A1) evidencia a capacidade e a velocidade com que essas partículas conseguem liberar calor para o meio através da conversão da energia magnética em energia térmica. Nota-se que ao serem revestidas por sílica, a eficácia na liberação de calor é reduzida. Isto porque, além da sílica não contribuir para a geração de calor, ela ainda atua como uma barreira, dificultando a transferência de calor para a solução aquosa, já que é um mau condutor de calor. Ademais, há uma quantidade inferior de NPM nas amostras revestidas do que na amostra que contém somente o material magnético. Uma forma de amenizar esse obstáculo e obter um perfil mais acentuado, é efetuar a medida utilizando uma alíquota com uma quantidade significativamente maior das amostras encapsuladas, e conseqüentemente com mais material magnético, como foi observado no trabalho de MARTINS (2017). Dessa forma, torna-se mais eficiente a aplicação dessas partículas no tratamento por magnetohipertermia.

Os perfis de liberação de calor contribuem para o cálculo do SAR ao fornecerem dados necessários para tal, sendo estes o valor da inclinação da curva no início do aquecimento, o qual equivale à taxa de aquecimento promovida pelas nanopartículas. Esta informação é convertida em SAR através da Equação 6. À critério de simplificação do cálculo, esta equação pode ser manipulada e reescrita conforme a Equação 12, considerando a água como meio de suspensão.

$$SAR = \left[ C_p + \frac{\rho_{H_2O} \cdot C_{H_2O}}{\rho_p} \right] \cdot \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad \text{Eq. (12)}$$

onde,  $C_p$  é o calor específico da partícula,  $C_{H_2O}$  o calor específico da água,  $\rho_p$  a concentração mássica do conjunto nanoparticulado,  $\rho_{H_2O}$  a massa específica da água e  $\frac{\Delta T}{\Delta t}$  a taxa de aquecimento obtida pela equação da reta dos perfis de liberação de calor.

As curvas da Figura 35 foram linearizadas no intervalo inicial que forneceu o melhor  $R^2$  em todas as amostras (0,3 a 3,3 min). Deste modo, aplicando na Equação 12 o coeficiente angular das retas juntamente com os parâmetros das substâncias, pôde-se obter os valores do SAR, estando expostos na Tabela 16. Utilizou-se os seguintes dados:  $C_p = 0,16 \text{ cal/g.}^\circ\text{C}$  (referente à magnetita e sílica);  $C_{H_2O} = 1,00 \text{ cal/g.}^\circ\text{C}$ ;  $\rho_p = 10 \text{ mg/mL}$ ;  $\rho_{H_2O} = 1000,00 \text{ mg/mL}$ .

Tabela 16: Resultados da hipertermia magnética após 20 min de aplicação de um campo magnético alternado.  $R^2$  refere-se ao coeficiente de correlação das retas para o cálculo do SAR.

Amostras	Componentes	$\Delta T$ ( $^\circ\text{C}$ )	SAR (W/g)	$R^2$	ILP (nH.m <sup>2</sup> /kg)
NPM_A1	NPM	30,60	21,02	0,91	0,2675
NPM_B1	NPM + Si	7,40	3,81	0,91	0,0485
NPM_Bac3	NPM + Ac + Si	5,80	4,81	0,95	0,0612
NPM_D3	NPM + Cur + Si	5,50	3,44	0,99	0,0438

Ao correlacionar os resultados do SAR com os valores da magnetização de saturação (Tabela 15), notou-se a influência que a  $M_s$  tem sobre a hipertermia magnética, tal comportamento também foi verificado por DIAS e colaboradores (2017). Vale ressaltar que a disparidade entre a capacidade de aquecimento das nanopartículas de magnetita não estequiométrica quando estas estão isoladas de outros compostos e quando estão revestidas por um material não magnético foi perceptível devido, especialmente, à menor porção de NPM nas amostras recobertas com sílica. No entanto, é importante mencionar que todas as amostras obtiveram, na concentração de 10 mg/mL, um  $\Delta T$  suficiente para atingir a temperatura de morte das células cancerígenas ( $\approx 43 \text{ }^\circ\text{C}$ ) (SOUZA; MOHALLEM; SOUSA, 2011), pressupondo a temperatura inicial como a

média corpórea de 37 °C. Sendo assim, pode-se considerar a potencialidade dessas nanopartículas no tratamento de câncer.

Apesar do SAR ser uma grandeza bastante empregada na caracterização de materiais para hipertermia magnética, este é um parâmetro extrínseco, ou seja, neste caso depende do campo magnético (H) e da frequência (f) e, por isso sua comparação com a de outros trabalhos é dificultada. Dessa forma, muitos autores sugerem utilizar um parâmetro intrínseco, tal como a perda intrínseca de potência (ILP), para avaliar a capacidade de aquecimento de um material magnético (WILDEBOER; SOUTHERN; PANKHURST, 2014). O ILP é calculado através da Equação 13, sendo sua unidade de medida descrita pela Equação 14.

$$ILP = \frac{SAR}{f.H^2} \quad \text{Eq. (13)}$$

$$ILP [\text{nHm}^2\text{kg}^{-1}] = \frac{SAR [\text{Wkg}^{-1}]}{f [\text{kHz}] \cdot H^2 [(\text{kAm}^{-1})^2]} \quad \text{Eq. (14)}$$

Os valores de ILP das amostras avaliadas sob esse aspecto constam na Tabela 16. Segundo KALLUMADIL e colaboradores (2009), as nanopartículas comerciais de óxido de ferro com diâmetros entre 10 e 12 nm apresentam ILP na faixa de 2,00 a 3,25 nH.m<sup>2</sup>/kg. Entretanto, ao comparar com os resultados encontrados neste trabalho, observa-se que as nanopartículas sintetizadas possuíam uma ou duas ordens de grandeza a menos. Tal situação pode ser explicada pelo fato do comportamento magnético variar conforme o tamanho e morfologia das nanopartículas (WILDEBOER; SOUTHERN; PANKHURST, 2014), dessa forma, podendo também influenciar no ILP.

#### **4.9 Ensaios de liberação *in vitro* da curcumina**

Antes de iniciar os ensaios de liberação *in vitro* da curcumina, foi necessário averiguar a concentração (m/v) de SDS em meio de PBS suficiente para solubilizar a curcumina, e assim, manter a condição *sink* durante toda a etapa de liberação. A Figura 36 apresenta essas soluções, com suas devidas concentrações de SDS (%). Nota-se que foi indispensável o uso do surfactante na solubilização da curcumina nesse meio, visto a característica hidrofóbica da curcumina. Percebeu-se também que o aumento da

concentração de SDS favoreceu a solubilização ao constatar o escurecimento do amarelo nas maiores porções de SDS e a menor quantidade de curcumina depositada no fundo das mesmas. Entretanto, somente com a leitura no espectrofotômetro UV-visível foi possível obter uma análise mais conclusiva.

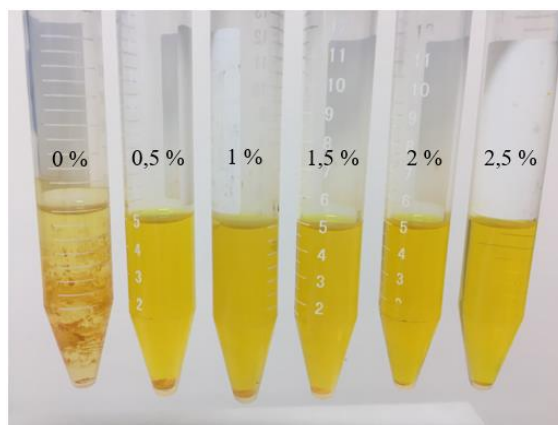


Figura 36: Solubilidade de 1 mg/mL de curcumina em meio de PBS e SDS. As porcentagens indicam a proporção de SDS (m/v).

A solubilização da curcumina foi avaliada por meio da intensidade da absorbância das curvas contidas na Figura 37, em que uma maior intensidade do pico indica que mais curcumina pôde ser solubilizada nessa solução. Assim, adotando esta lógica, observou-se que 2 % SDS atingiu a maior solubilidade entre as medidas. E percebeu-se também pelo espectro no UV-visível que quanto maior a concentração de SDS, maior era a intensidade do pico, porém somente até 2 % SDS. Após esta porcentagem, viu-se uma diminuição na intensidade, provavelmente causada pelo excesso de SDS na solução. Apesar disso, todas as curvas com SDS possuíram pico no mesmo  $\lambda_{\text{máx}}$  de 426 nm, sendo este, igual ao valor encontrado para a curcumina no meio H<sub>2</sub>O/EtOH.

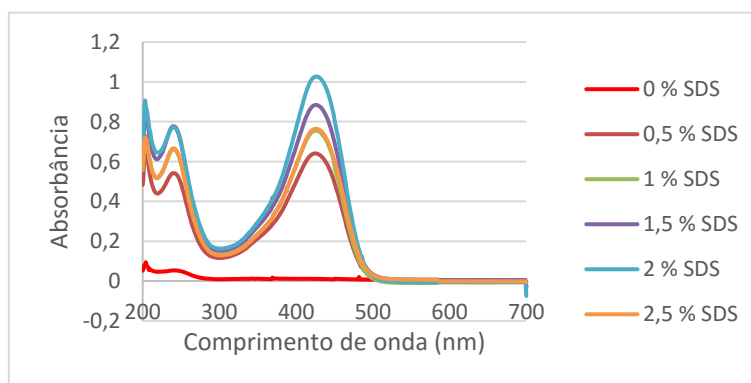


Figura 37: Comportamento das curvas de varredura no UV-visível referente ao teste de solubilidade da curcumina na solução de PBS/SDS. A porcentagem (m/v) relaciona a quantidade de SDS no volume de PBS. Diluição de 50x.

Em vista dos resultados, a escolha da concentração de SDS deveria ser aquela que obteve melhor solubilização no teste (2% SDS). Todavia, no experimento de solubilização a concentração de curcumina empregada foi superior à utilizada nos ensaios de liberação, não havendo, portanto, a necessidade de uma concentração elevada de surfactante. Assim, optou-se pela solução de 0,5 % SDS. Com o propósito de garantir que a porcentagem escolhida promoveria a condição *sink*, calculou-se, através da curva de calibração (Apêndice C), a concentração máxima de curcumina que foi dissolvida nesta solução, e obteve-se um resultado de 0,911 mg/mL. Tal valor está acima da concentração máxima possível da liberação (em torno de 0,2 mg/mL) e, portanto, a condição escolhida foi capaz de promover a condição *sink*.

Após a confirmação e preparação de um sistema de liberação na condição *sink*, verificou-se o comportamento da liberação da curcumina presente na amostra NPM\_D3. Vale ressaltar que o ensaio 4 foi realizado em meio ácido a fim de simular o ambiente dos tecidos tumorais, o qual normalmente é em  $\text{pH} = 4 - 5$  (SAIKIA et al., 2016). Os resultados da concentração de curcumina liberada, tal como as características de cada ensaio estão descritas na Tabela 17. Apesar das alterações nas condições do teste, todos os ensaios obtiveram uma baixa eficiência de liberação, impossibilitando, no momento, a continuidade do estudo referente à permanência ou não das propriedades terapêuticas da curcumina após esta ser liberada do sistema nanoestruturado, como avaliar esse conjunto em testes de citotoxicidade em células sadias e cancerígenas. Tal resultado de eficiência de liberação pode estar associado ao método usado na síntese da sílica. A pesquisa de HAO e colaboradores (2012) avaliou a degradação em meio fisiológico da sílica sintetizada por metodologias diferentes, resultando em nanoestruturas de variados formatos e porosidade. Os autores concluíram que nanopartículas de sílica sintetizadas pelo método de Stöber (mesmo utilizado para esta dissertação) apresentaram superfície microporosa, sendo esta característica uma das responsáveis por exibir uma taxa de degradação bem inferior quando comparada à superfície da sílica mesoporosa, uma vez que os componentes bioativos do meio dissolvem-se mais facilmente com maior permeabilidade em poros maiores do que em poros menores e em partículas sólidas. Assim, relacionando essas informações com o caso deste trabalho, acredita-se que a sílica presente na NPM\_D3 também possuía microporosidade capaz de reduzir a degradação da sílica e conseqüente liberação da curcumina, e ainda, o reduzido tamanho dos poros pode

ter dificultado a passagem da curcumina por meio da camada inorgânica, resultando na baixa eficiência de liberação reportada.

Tabela 17: Ensaio de liberação da curcumina da amostra NPM\_D3.

<b>Ensaio</b>	<b>Meio de liberação</b>	<b>Tempo da medida (h)</b>	<b>Tipo de agitação</b>	<b>% curcumina liberada</b>
1	PBS/SDS	96	Shaker	1,32 ± 0,155
2	PBS/SDS	144	Shaker	0,93 ± 0,005
3	PBS/SDS	1	Sonicador	0,63 ± 0,059
4	PBS/SDS/HCl	120	Shaker	1,24 ± 0,031

O fato do sistema nanoparticulado proposto por esta pesquisa praticamente não liberar curcumina no meio fisiológico não inviabiliza seu uso em aplicações biomédicas. A permanência das NPM e curcumina dentro da cápsula de sílica reforçou a utilização desse conjunto como marcadores magnético-fluorescentes e agentes de hipertermia magnética, uma vez que para tais usos é preferível que esses três componentes se mantenham juntos ao percorrerem pelo corpo, pois assim, promovem um diagnóstico e tratamento mais preciso e eficiente.

# CAPÍTULO V

## *Conclusões e Sugestões*

### **5.1 Conclusões**

Neste trabalho foi proposto um sistema nanoparticulado constituído de materiais magnéticos, fluorescentes, farmacológico e de revestimento para fins medicinais. Pôde-se sintetizar partículas com características superparamagnéticas, cristalinidade de magnetita não estequiométrica e tamanho entre 10 – 50 nm. Também se observou certa aglomeração nessas partículas, a qual foi amenizada por intermédio da estabilização com ácido cítrico e do revestimento pela sílica. Os ensaios de estabilidade mostraram que uma concentração de 0,003 mol/L de ácido cítrico já foi suficiente para promover a estabilização das nanopartículas de óxido de ferro à curto e à longo prazo no qual o meio dispersante foi a água ultrapura.

O encapsulamento das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro em sílica foi realizado com sucesso. Tal recobrimento foi comprovado através das imagens do MET, do maior tamanho das partículas, do aumento da magnitude do potencial zeta (-30 mV) e do DRX, em que apresentou cristalinidade referente à magnetita/maghemita e amorficidade referente à sílica. Tais características ainda são válidas para o interesse dessas partículas na área biotecnológica.

A respeito da interação das nanopartículas magnéticas com a curcumina constatou-se a efetividade na ligação sem a ajuda de um composto ligante, viu-se que a adsorção atingiu seu máximo após 48 h (estudo da cinética) e ainda, que esta adsorção foi representada por uma isoterma do tipo III. Já em relação à atuação da curcumina como fluoróforo, observou-se pelo fluorímetro que foi possível verificar a fluorescência da curcumina mesmo estando em concentração baixa, e que esta molécula apresentava pico de excitação em 426 nm e de emissão em 520 nm.

Por fim, com a caracterização do sistema composto por nanocápsulas de sílica contendo nanopartículas magnéticas e curcumina, avaliou-se a aplicabilidade desse produto. Observou-se boas propriedades magnéticas nesse conjunto, indicando sua possível aplicação como contraste em imagem de ressonância magnética e promissora utilidade em tratamento por hipertermia magnética. Ademais, conseguiu-se encapsular



aproximadamente 28% da curcumina inicial nesse sistema, sendo este material o responsável por fornecer a fluorescência observada no microscópio de fluorescência invertido, servindo, portanto, também como marcador fluorescente de bioimagem. A curcumina encapsulada desta forma não foi liberada para o meio, possivelmente devido à camada da sílica ser muito fechada, o que é interessante para assegurar suas propriedades como marcador fluorescente. Assim, os nanomateriais produzidos neste trabalho revelaram-se uma plataforma útil no diagnóstico e tratamento de diversas doenças.

## 5.2 Sugestões para trabalhos futuros

Almejando-se um aprimoramento e futura comercialização na área biotecnológica das nanopartículas sintetizadas nesta pesquisa, propôs-se novos estudos a respeito das sínteses, do comportamento em outros ambientes e de outras caracterizações que elucidarão melhor as propriedades dessas nanoestruturas. Tais sugestões estão descritas a seguir:

- Aperfeiçoar a etapa de recobrimento das NPM e curcumina pela sílica, visando uma otimização e melhora do processo, verificando, por exemplo, outro modo de agitação que forneça ao mesmo tempo uma velocidade adequada, capacidade física para suportar o tempo da reação e menor perda de NPM;
- Avaliar o tempo de relaxação ( $T_1$  e  $T_2$ ) das amostras produzidas e obter imagens por ressonância magnética (IRM), dessa forma, tem-se uma conclusão mais efetiva em relação à aplicação das nanopartículas sintetizadas neste trabalho como agentes de contraste em IRM.
- Realizar a síntese da sílica por outras metodologias a fim de obter uma estrutura mesoporosa e assim, avaliar se ocorre uma maior liberação de curcumina e, por conseguinte, a aplicabilidade na distribuição do fármaco sítio-dirigida. Testes do tipo BET descrevem a adsorção física de moléculas de um gás sobre uma superfície sólida e portanto, poderão definir a porosidade e outras propriedades superficiais das amostras;

- Promover a funcionalização da superfície da sílica com agentes direcionadores, como o ácido fólico em células cancerígenas, e subsequente comprovação deste mecanismo;
- Estudar a citotoxicidade, degradação, bioatividade e biocompatibilidade das nanoestruturas produzidas;
- Avaliar a influência que o pH e a temperatura têm sobre as características fluorescentes e farmacológicas da curcumina;
- Interiorizar as nanopartículas em células doentes e sadias a fim de identificar o comportamento e as propriedades magnéticas e fluorescentes do nanossistema;
- Fazer testes *in vivo* com intuito de investigar as funcionalidades desejadas.

## CAPÍTULO VI

### *Referências Bibliográficas*

- AKBARZADEH, A.; SAMIEI, M.; DAVARAN, S. “Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine”. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 144, p. 1–13, 2012.
- ALFAIA, R. G. DE S. M., 2015, *Membranas de Matriz Mista Nanoestruturadas para Transporte Facilitado de CO<sub>2</sub>*. Dissertação de M. Sc., PEQ/Coppe - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- ALVES, A. M. R., 2012, *Desenvolvimento de Nanopartículas Magnéticas para Tratamento de Cancro: Estudo da Síntese e Estabilização das Soluções Coloidais de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>*. Dissertação de M. Sc., Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- AMGARTEN, D. R., 2006, *Determinação do Volume Específico de Poros de Sílicas Cromatográficas por Dessorção e Líquidos em Excesso*. Dissertação de M. Sc., Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.
- ANAND, P. et al. “Bioavailability of curcumin: problems and promises reviews bioavailability of curcumin: problems and promises”. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. November, p. 807–818, 2007.
- BACRI, J.-C. et al. “Ionic ferrofluids: a crossing of chemistry and physics”. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 85, p. 27–32, 1990.
- BEDÊ, P. M., 2010, *Produção e Caracterização de Nanopartículas Polimérico-Magnéticas para Aplicações Biomédicas*. Dissertação de M. Sc., Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- BENVENUTTI, E. V; MORO, C. C.; COSTA, T. M. H. “Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel”. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1926–1933, 2009.
- BHANDARI, R. et al. "Single step synthesis, characterization and applications of curcumin functionalized iron oxide magnetic nanoparticles". **Materials Science &**

**Engineering C**, v. 67, p. 59–64, 2016.

CHANG, Y. et al. "High sensitivity method for determination of trace curcumin in the aqueous phase". **J. Chil. Chem. Soc.**, v. 59, n. 1, p. 2341–2346, 2014.

CHENG, K. K. et al. "Curcumin-conjugated magnetic nanoparticles for detecting amyloid plaques in Alzheimer's disease mice using magnetic resonance imaging (MRI)". **Biomaterials**, v. 44, p. 155–172, 2015.

CHERTOK, B. et al. "Iron oxide nanoparticles as a drug delivery vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors". **Biomaterials**, v. 29, n. 4, p. 487–496, 2008.

CHIN, S. F. et al. "Encapsulation and sustained release of curcumin using superparamagnetic silica reservoirs". **Chemistry - A European Journal**, v. 15, n. 23, p. 5661–5665, 2009.

DIAS, C. S. B. et al. "Shape tailored magnetic nanorings for intracellular hyperthermia cancer therapy". **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–8, 2017.

ESTELRICH, J. et al. "Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery". **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 8070–8101, 2015.

FARIA, R. N.; LIMA, L. P. C. P. **Introdução ao Magnetismo dos Materiais**. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2005.

FERNÁNDEZ, A., E. L. et al. "Evaluation of emerging methods on the polyphenol content, antioxidant capacity and qualitative presence of acetogenins in soursop pulp (*Annona muricata* L.)". **Rev. Bras. Frutic. Spe**, v. 39, 2017.

FERREIRA, M. I. et al. "Sustainable production of high purity curcuminoids from *Curcuma longa* by magnetic nanoparticles: A case study in Brazil". **Journal of Cleaner Production**, v. 154, p. 233–241, 2017.

FERREIRA, R. V., 2009. *Síntese e Caracterização de Nanopartículas Magnéticas Funcionalizadas com Núcleo Magnético de Magnetita*. Dissertação de M. Sc., Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

- FILHO, A. C. G., 2014, *Estudo da estrutura e propriedades magnéticas e elétricas de ferritas de Ni<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> dopadas com Nd<sup>3+</sup>*, Tese de D. Sc., Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.
- FRANCISQUINI, E.; SCHOENMAKER, J.; SOUZA, A. "Nanopartículas magnéticas e suas aplicações - Capítulo 14". **Química Supramolecular e Nanotecnologia**, p. 269–289, 2016.
- FUNDECT. "Hipertermia Magnética no Tratamento Oncológico". Disponível em: <<http://fundect.ledes.net/news/3157/braa-o-online-da-revista-nature-publica-artigo-da-rede-para-centro-oeste>>. Acesso em: 23 Nov., 2017.
- GANGWAR, R. K. et al. "Curcumin conjugated silica nanoparticles for improving bioavailability and its anticancer applications". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 40, p. 9632–9637, 2013.
- GREGG, S. J. **The Surface Chemistry of Solids**. London, Second ed, Editora Chapman and Hall LTD, 1965.
- GUTZ, I. G. R. **CurTiPot**, versão 4.2.3 opção i: Ivano G. R. Gutz, Instituto de Química, USP, São Paulo, SP, 2016.
- HAO, N. et al. "In vitro degradation behavior of silica nanoparticles under physiological conditions". **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 12, n. 8, p. 6346–6354, 2012.
- HATAMIE, S. et al. "Curcumin-reduced graphene oxide sheets and their effects on human breast cancer cells". **Materials Science and Engineering C**, v. 55, p. 482–489, 2015.
- HOLA, K. et al. "Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances". **Biotechnology advances**, v. 33, n. 6, p. 1162–1176, 2015.
- HUI, C. et al. "Core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> nanoparticles synthesized with well-dispersed hydrophilic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> seeds". **Nanoscale**, v. 3, n. 2, p. 701–705, 2011.
- IBRAHIM, I. A. M.; ZIKRY, A. A. F.; SHARAF, M. A. "Preparation of spherical silica nanoparticles: Stober silica". **Journal of American Science**, v. 6, n. 11, p. 985–

989, 2010.

JIANG, F. et al. "Fabrication of iron oxide/silica core-shell nanoparticles and their magnetic characteristics". **Journal of Alloys and Compounds**, v. 543, p. 43–48, 2012.

KALLUMADIL, M. et al. "Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia". **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, n. 10, p. 1509–1513, 2009.

KHOSROSHAHI, M. E.; GHAZANFARI, L. "Synthesis and functionalization of SiO<sub>2</sub> coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with amine groups based on self-assembly". **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 5, p. 1043–1049, 2012.

KITTURE, R. et al. "Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-citrate-curcumin: Promising conjugates for superoxide scavenging, tumor suppression and cancer hyperthermia". **Journal of Applied Physics**, v. 111, n. 6, 2012.

KNEŽEVIĆ, N. Ž. et al. "Magnetic mesoporous silica-based core/shell nanoparticles for biomedical applications". **RSC Advances**, v. 3, n. 25, p. 9584, 2013.

KOLHATKAR, A. G. et al. "Tuning the magnetic properties of nanoparticles". **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 15977–16009, 2013.

LACHOWICZ, D. et al. "Biocompatible and fluorescent superparamagnetic iron oxide nanoparticles with superior magnetic properties coated with charged polysaccharide derivatives". **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 50, p. 402–407, 2017.

LAURENT, S. et al. "Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications". **Chemical Reviews**, v. 108, n. 6, p. 2064–2110, 2008.

LEE, C. S. et al. "Bifunctional nanoparticles constructed using one-pot encapsulation of a fluorescent polymer and magnetic (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles in a silica shell". **Macromolecular Bioscience**, v. 13, n. 3, p. 321–331, 2013.

LEE, K. et al. "Blood half-life study of magnetic fluorescent silica nanoparticles by using MR T<sub>2</sub> relaxation measurement: long circulating SPIO". **Journal of the Korean**

**Physical Society**, v. 53, n. 5, p. 2535–2539, 2008.

MANUCHEHRABADI, N. et al. “Improved tissue cryopreservation using inductive heating of magnetic nanoparticles”. **Science Translational Medicine**, v. 4586, 2017.

MARTINS, M. G., 2017, *Encapsulamento de Nanopartículas Magnéticas em Polímeros Acrílicos e Avaliação de Hipertermia para Potencial Tratamento de Câncer*. Dissertação de M. Sc., PEQ/Coppe - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

MEDEIROS, S. F., 2010, *Obtenção de Nanopartículas Magnéticas Sensíveis a Estímulos para Aplicações Biomédicas*. Tese de D. Sc., Universidade de São Paulo, Lorena, SP, Brasil.

MOJÍĆ, B. et al. “Silica coated ferrite nanoparticles: Influence of citrate functionalization procedure on final particle morphology”. **Ceramics International**, v. 38, n. 8, p. 6635–6641, 2012.

MORALES, M. A. et al. “In situ synthesis and magnetic studies of iron oxide nanoparticles in calcium-alginate matrix for biomedical applications”. **Materials Science and Engineering C**, v. 28, n. 2, p. 253–257, 2008.

MOREIRA, T. S., 2015, *Síntese de Nanopartículas Poliméricas por Polimerização Radicalar (RAFT) para Vetorização Biodirigida de Tamoxifeno*. Tese de D. Sc., PEQ/Coppe - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

MULIK, R.; MAHADIK, K.; PARADKAR, A. “Development of curcuminoids loaded poly(butyl) cyanoacrylate nanoparticles: Physicochemical characterization and stability study”. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3–4, p. 395–404, 2009.

NAGAHAMA, K.; SANO, Y.; KUMANO, T. "Anticancer drug-based multifunctional nanogels through self-assembly of dextran-curcumin conjugates toward cancer theranostics". **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 12, p. 2519–2522, 2015.

NAQVI, S. et al. “Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated

by increased oxidative stress”. **International Journal of Nanomedicine**, v. 5, n. 1, p. 983–989, 2010.

NASCIMENTO, C. B. et al. Extração com solventes e quantificação dos curcuminóides a partir do pó de rizomas do açafrão (*curcuma longa* L.) de Mara Rosa – GO. Disponível em: <[http://www.sbpcnet.org.br/livro/58ra/JNIC/RESUMOS/resumo\\_506.html](http://www.sbpcnet.org.br/livro/58ra/JNIC/RESUMOS/resumo_506.html)>. Acesso em: 1 Jan., 2017.

NEVES, C. S. S., 2014, *Development of Fluorescent Silica Nanoparticles Encapsulating Organic and Inorganic Fluorophores: Synthesis and Characterization*, Tese de D. Sc., Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.

NGUYEN, H. N. et al. "Curcumin as fluorescent probe for directly monitoring in vitro uptake of curcumin combined paclitaxel loaded PLA-TPGS nanoparticles". **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, 2016.

OLIVEIRA, L. F. DE et al. "Functionalized silica nanoparticles as an alternative platform for targeted drug-delivery of water insoluble drugs". **Langmuir**, v. 32, n. 13, p. 3217–3225, 2016.

PARDELL, X. "Resonancia magnética - apuntes de electromedicina". Disponível em: <<http://www.pardell.es/resonancia-magnetica.html>>. Acesso em: 22 Nov., 2017.

RĂCUCIU, M.; CREANGĂ, D. E.; AIRINEI, A. "Citric-acid-coated magnetite nanoparticles for biological applications". **European Physical Journal E**, v. 21, n. 2, p. 117–121, 2006.

RAHMAN, S. M. H. et al. "Role of surfactant and pH in dissolution of curcumin". **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 71, n. 2, p. 139–142, 2009.

SAHU, A.; KASOJU, N.; BORA, U. "Fluorescence study of the curcumin - casein micelle complexation and its application as a drug nanocarrier to cancer cells". **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2905–2912, 2008.

SAIKIA, C. et al. "Effect of crosslinker on drug delivery properties of curcumin loaded starch coated iron oxide nanoparticles". **International Journal of Biological**



**Macromolecules**, v. 93, p. 1121–1132, 2016.

SALIM, V. M. M. et al. “Fenômenos Interfaciais”, Escola Piloto - Programa de Engenharia Química/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2005.

SILVEIRA, J. B.; MALAGONI, R. A. **X Congresso Brasileiro de Engenharia Química Iniciação Científica**. 2013.

SOARES, P. I. P. et al. “Applied Surface Science Iron oxide nanoparticles stabilized with a bilayer of oleic acid for magnetic hyperthermia and MRI applications”. **Applied Surface Science**, v. 383, p. 240–247, 2016.

SOUZA, K. C. DE; MOHALLEM, N. D. S.; SOUSA, E. M. B. DE. "Nanocompósitos magnéticos: potencialidades de aplicações em biomedicina". **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1692–1703, 2011.

STÖBER, W.; FINK, A.; BOHN, E. “Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range”. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 26, n. 1, p. 62–69, 1968.

SUETH-SANTIAGO, V. et al. "Curcumina, o pó dourado do açafrão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas". **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 538–552, 2015.

SUN, C.; LEE, J. S. H.; ZHANG, M. “Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery”. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, n. 11, p. 1252–1265, 2008.

SUN, Y. et al. “An improved way to prepare superparamagnetic magnetite-silica core-shell nanoparticles for possible biological application”. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 285, n. 1–2, p. 65–70, 2005.

SUNG, C. K. et al. “Dual-modal nanoprobe for imaging of mesenchymal stem cell transplant by MRI and fluorescence imaging”. **Korean Journal of Radiology**, v. 10, n. 6, p. 613–622, 2009.

TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. "Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno". **Revisão Quim. Nova**, v. 24, n. 6, p. 808–818, 2001.

- TOLEDO, K. "Corante extraído do açafrão pode ser útil no combate à dengue | AGÊNCIA FAPESP". Disponível em: <[http://agencia.fapesp.br/corante\\_extraido\\_do\\_acafrao\\_pode\\_ser\\_util\\_no\\_combate\\_a\\_dengue/21005/](http://agencia.fapesp.br/corante_extraido_do_acafrao_pode_ser_util_no_combate_a_dengue/21005/)>. Acesso em: 12 Nov., 2017.
- TOMBÁ CZ, E. et al. "Magnetic iron oxide nanoparticles: Recent trends in design and synthesis of magnetoresponsive nanosystems". **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 468, n. 3, p. 442–453, 2015.
- UCHIYAMA, M. K. et al. "Ultrasmall cationic superparamagnetic iron oxide nanoparticles as nontoxic and efficient MRI contrast agent and magnetic-targeting tool". **Int J Nanomedicine.**, v. 10, p. 4731–46, 2015.
- WANI, K. D. et al. "Synthesis, characterization and in vitro study of curcumin-functionalized citric acid-capped magnetic (CCF) nanoparticles as drug delivery agents in cancer". **Journal of Bionanoscience**, v. 5, n. 1, p. 59–65, 2011.
- WILDEBOER, R. R.; SOUTHERN, P.; PANKHURST, Q. A. "On the reliable measurement of specific absorption rates and intrinsic loss parameters in magnetic hyperthermia materials". **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 47, p. 1–14, 2014.
- WILKEN, R. et al. "Curcumin: a review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head & neck squamous cell carcinoma". **Molecular Cancer**, v. 10, p. 12, 2011.
- WU, W. et al. "Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications". **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 16, n. 2, p. 23501, 2015.
- WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. "Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies". **Nanoscale Research Letters**, v. 3, n. 11, p. 397–415, 2008.
- XU, R. "Progress in nanoparticles characterization: sizing and zeta potential measurement". **Particuology**, v. 6, p. 112–115, 2007.
- ZHANG, Y. et al. "Synthesis of PVP-coated ultra-small Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as a MRI contrast agent". **J Mater Sci: Mater Med**, v. 21, p. 1205–1210, 2010.

# CAPÍTULO VII

## Apêndice A

São mostrados os gráficos de distribuição de tamanho das nanopartículas, todos em escala logarítmica.

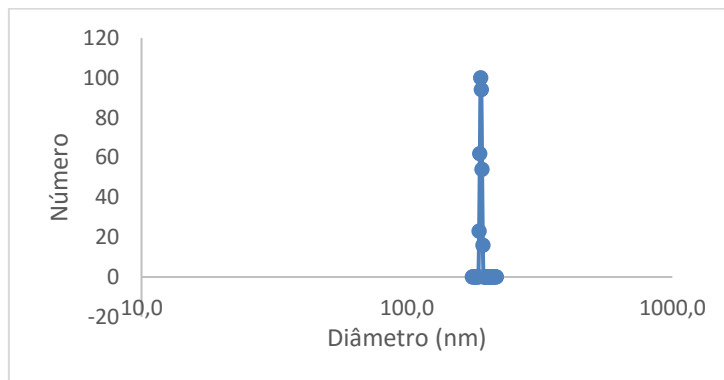


Figura A.1: Distribuição de tamanho da amostra NPMac1.

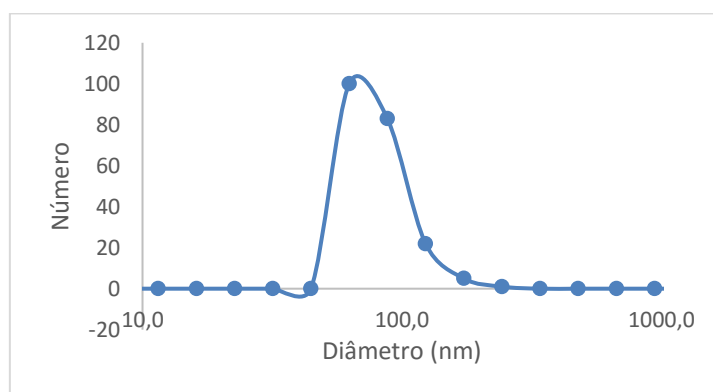


Figura A.2: Distribuição de tamanho da amostra NPMac2.

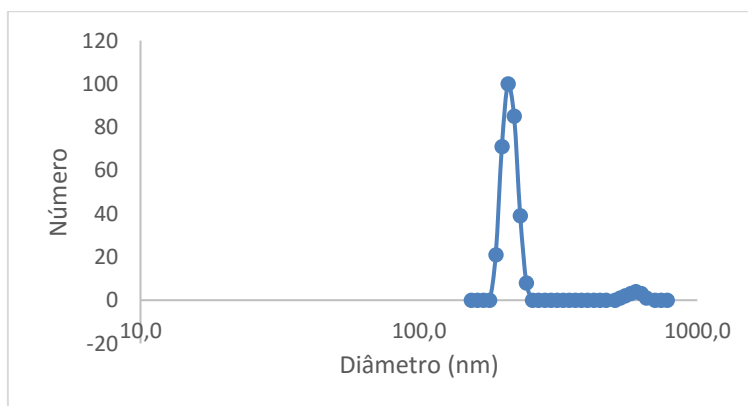


Figura A.3: Distribuição de tamanho da amostra NPMac3.

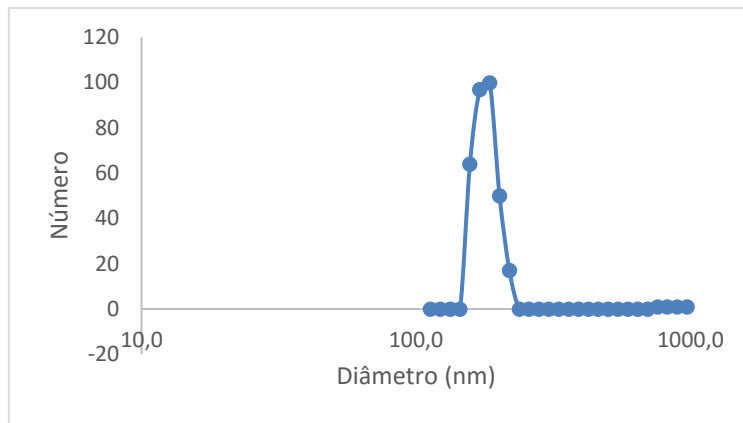


Figura A.4: Distribuição de tamanho da amostra NPMac4.

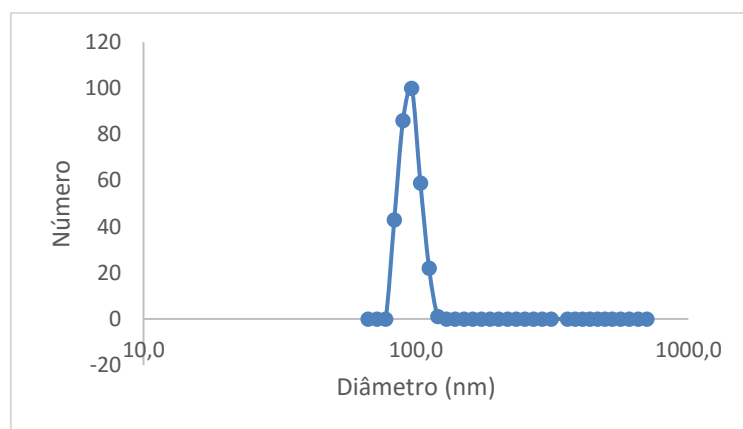


Figura A.5: Distribuição de tamanho da amostra NPMac5.

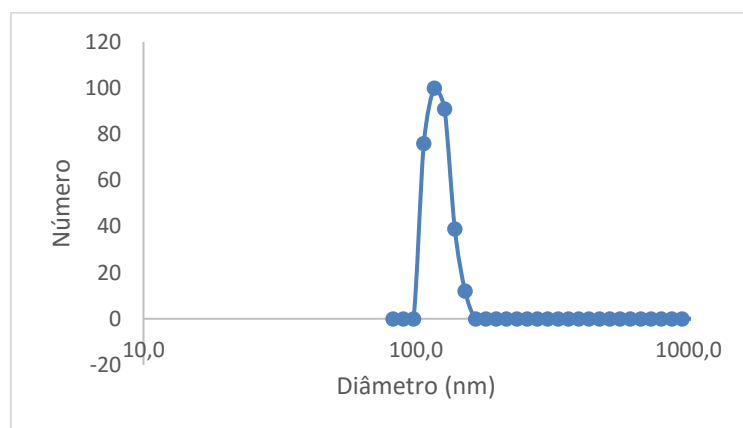


Figura A.6: Distribuição de tamanho da amostra NPMac6.

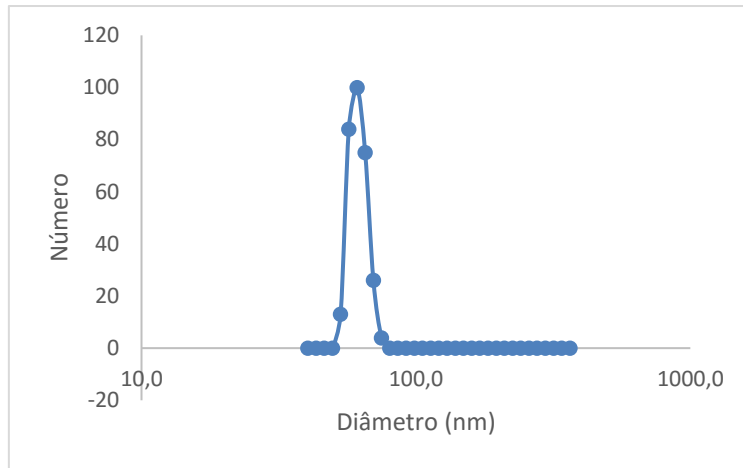


Figura A.7: Distribuição de tamanho da amostra NPM\_B1.

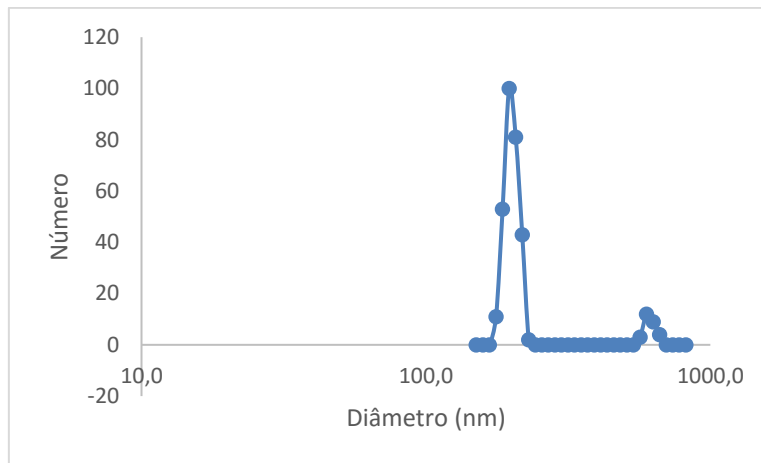


Figura A.8: Distribuição de tamanho da amostra NPM\_B2.

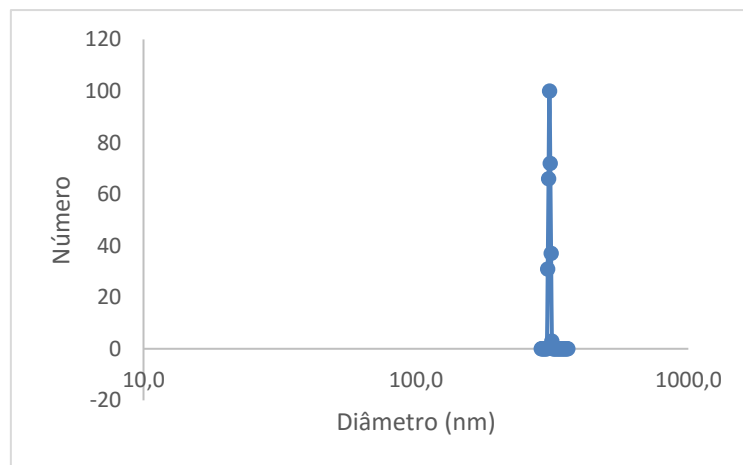


Figura A.9: Distribuição de tamanho da amostra NPM\_B3.

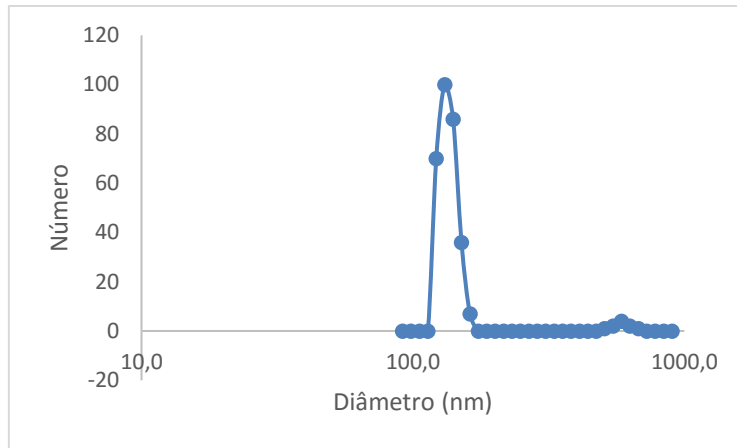


Figura A.10: Distribuição de tamanho da amostra NPM\_B4.

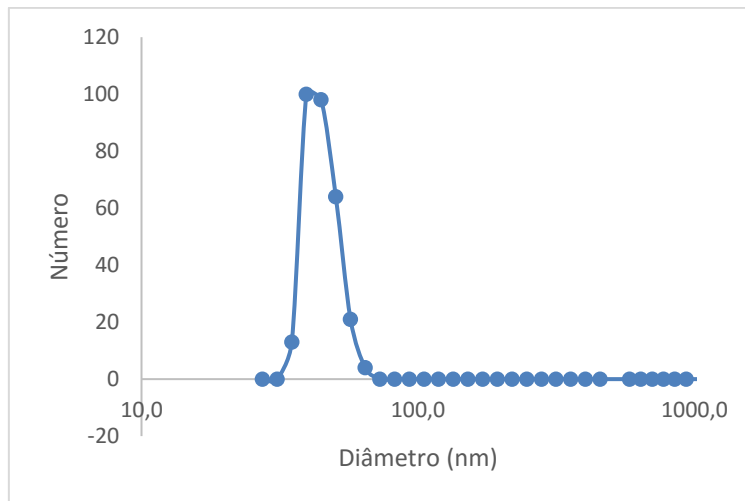


Figura A.11: Distribuição de tamanho da amostra NPM\_Bac1.

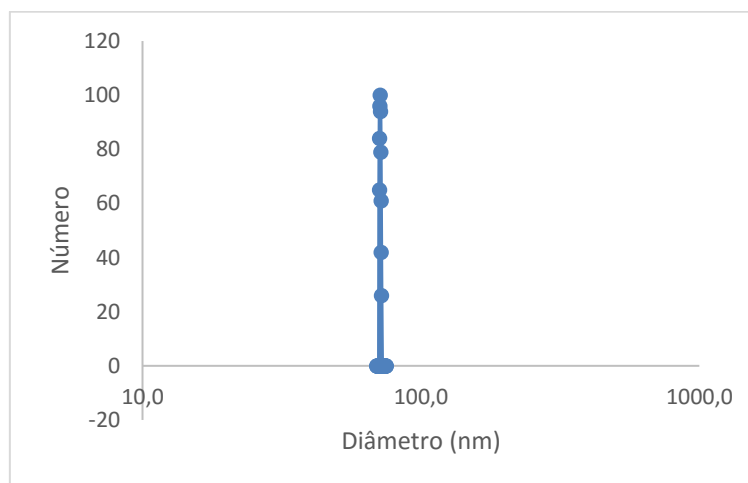


Figura A.12: Distribuição de tamanho da amostra NPM\_Bac2.

## Apêndice B

Cálculo teórico da máxima quantidade de nanopartículas magnéticas encapsuladas.

Dados:  $m_{\text{NPM}} = 40 \text{ mg}$ ;  $m_{\text{cur}} = 40 \text{ mg}$ ;  $V_{\text{TEOS}} = 1 \text{ mL}$ ;  $\rho_{\text{TEOS}} = 0,933 \text{ g/mL}$ ;  $MM_{\text{TEOS}} = 208,33 \text{ g/mol}$ ;  $MM_{\text{SiO}_2} = 60,08 \text{ g/mol}$ ; % curcumina encapsulada = 28.

- Amostra NPM\_B1:

$$1 \text{ mL TEOS} \cdot \frac{0,933 \text{ g TEOS}}{\text{mL}} \cdot \frac{60,08 \text{ g SiO}_2/\text{mol}}{208,33 \text{ g TEOS/mol}} = 0,269 \text{ g de SiO}_2 \text{ que pode ser formado a partir de 1 mL de TEOS}$$

$$\text{Massa de NP} = m_{\text{NPM}} + m_{\text{SiO}_2} = 40 + 269 = 309 \text{ mg de NP}$$

$$\% \text{ máx de Fe}_3\text{O}_4 = \frac{40 \text{ mg NPM}}{309 \text{ mg NP}} \cdot 100 \approx \boxed{13 \%}$$

- Amostra NPM\_D3:

$$m_{\text{cur encapsulada}} = 40 \text{ mg} \cdot \frac{28\%}{100\%} = 11,2 \text{ mg curcumina}$$

$$\text{Massa de NP} = m_{\text{NPM}} + m_{\text{SiO}_2} + m_{\text{cur encapsulada}} = 40 + 269 + 11,2 = 320,2 \text{ mg de NP}$$

$$\% \text{ máx de Fe}_3\text{O}_4 = \frac{40 \text{ mg NPM}}{320,2 \text{ mg NP}} \cdot 100 \approx \boxed{12,5 \%}$$

## Apêndice C

Gráficos obtidos por espectroscopia de UV-visível.

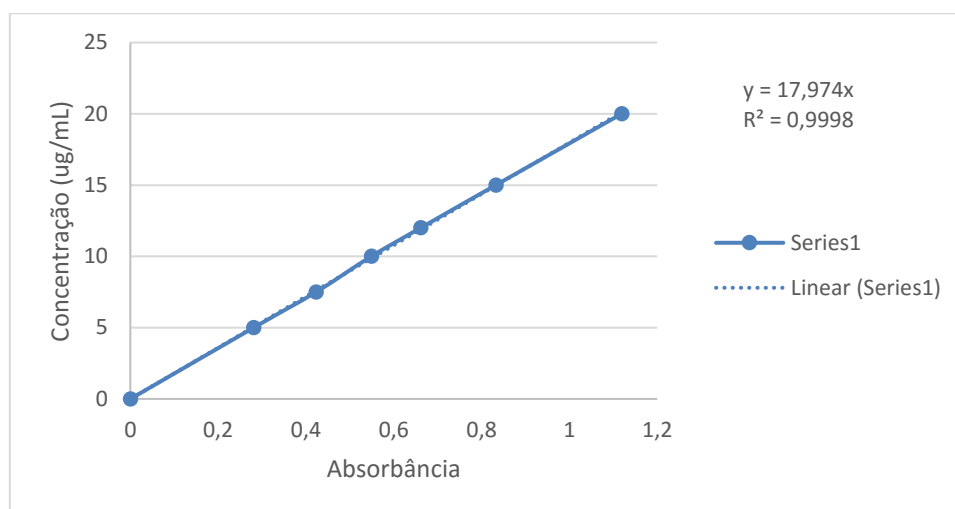


Figura C.1: Curva de calibração da curcumina em meio 50-50 % H<sub>2</sub>O-EtOH, λ = 426 nm.

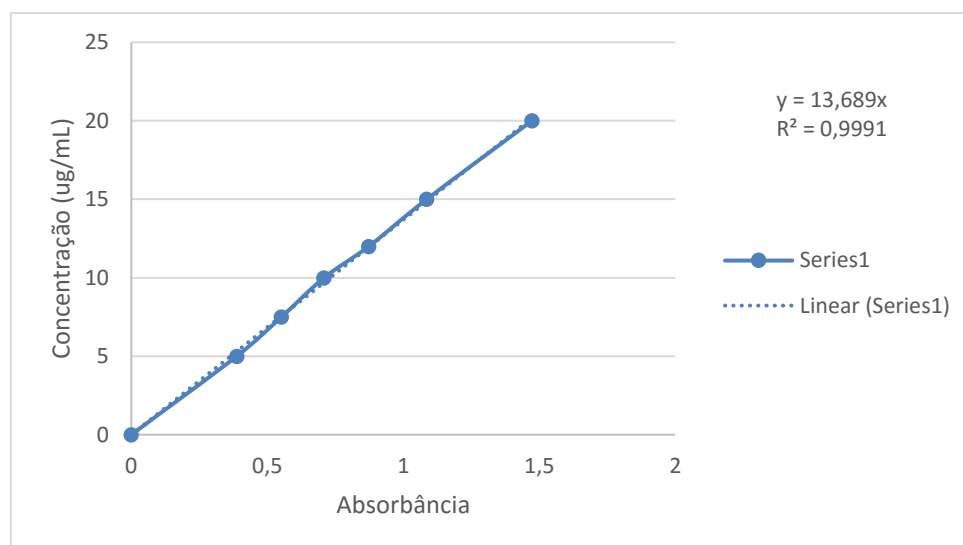


Figura C.2: Curva de calibração da curcumina em meio 25-75 % H<sub>2</sub>O-EtOH, λ = 426 nm.



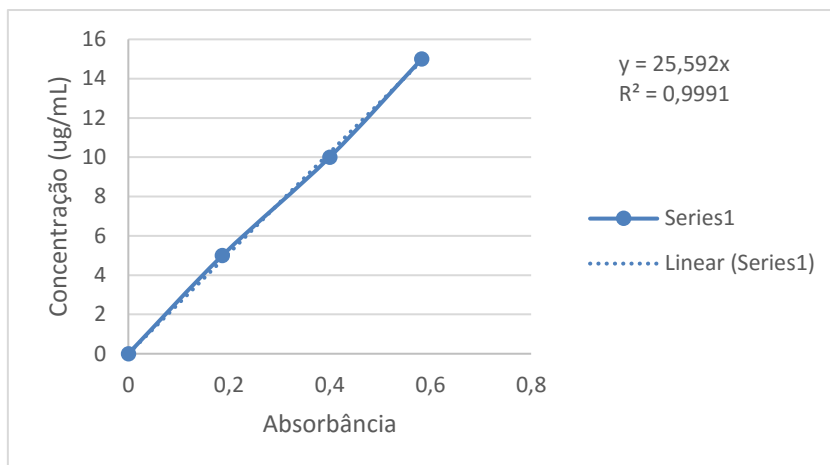


Figura C.3: Curva de calibração da curcumina em meio de H<sub>2</sub>O, EtOH e NH<sub>4</sub>OH,  $\lambda = 502$  nm.

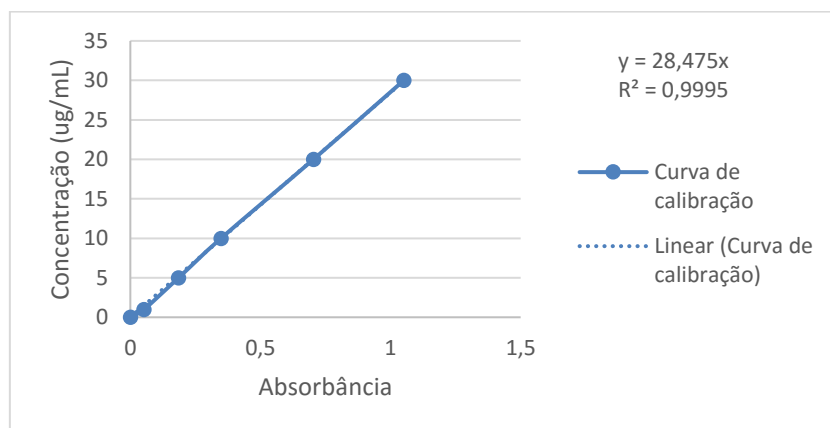


Figura C.4: Curva de calibração da curcumina em meio de PBS-SDS (0,5 %),  $\lambda = 426$  nm.

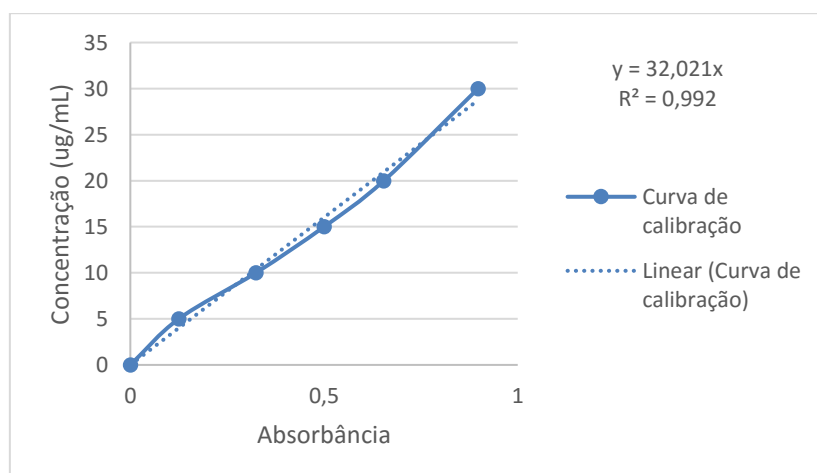


Figura C.5: Curva de calibração da curcumina em meio ácido (pH = 4,5 – 5),  $\lambda = 426$  nm.