

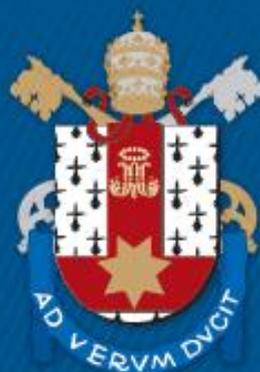
ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS
DOUTORADO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

ELISA MAGNO NUNES DE OLIVEIRA

**AGENTES DE CONTRASTE NANOESTRUTURADOS A BASE DE ÓXIDO DE FERRO:
SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA**

Porto Alegre
2018

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**AGENTES DE CONTRASTE NANOESTRUTURADOS A BASE DE
ÓXIDO DE FERRO: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO
TOXICOLÓGICA**

ELISA MAGNO NUNES DE OLIVEIRA

QUÍMICA INDUSTRIAL

LICENCIADA EM QUÍMICA

MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

PROF. DR. RICARDO MEURER PAPALÉO

Tese realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre
Março, 2018**

Ficha Catalográfica

O48a Oliveira, Elisa Magno Nunes de

Agentes de contraste nanoestruturados a base de óxido de ferro : síntese, caracterização e avaliação toxicológica / Elisa Magno Nunes de Oliveira . – 2018.

166.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Meurer Papaléo.

1. Nanopartículas magnéticas. 2. Agentes de contraste. 3. Imagens biomédicas. 4. Toxicidade. I. Papaléo, Ricardo Meurer. II. Título.

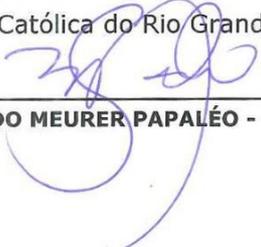
Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363



**AGENTES DE CONTRASTE NANOESTRUTURADOS A BASE
DE ÓXIDO DE FERRO: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E
AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA.**

CANDIDATA: ELISA MAGNO NUNES DE OLIVEIRA

Esta Tese de Doutorado foi julgada para obtenção do título de DOUTOR EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

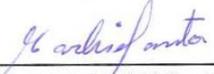


DR. RICARDO MEURER PAPALÉO - ORIENTADOR

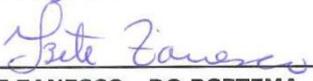
BANCA EXAMINADORA



**DR. HERMAN SANDER MANSUR - PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
MATALÚRGICA, MATERIAIS E DE MINAS - UFMG**



**DRA. MARLISE ARAÚJO DOS SANTOS - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA ELÉTRICA - PUCRS**



DRA. IZETE ZANESCO - DO PGETEMA - FENG - PUCRS

PUCRS

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 32 - Sala 505 - CEP: 90619-900
Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625
E-mail: engenharia.pg.materiais@pucrs.br
www.pucrs.br/politecnica

“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana”.

(Louis Pasteur)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, primeiramente, ao meu pai Luiz Fernando Almeida de Oliveira. Obrigada por ser minha maior inspiração para tudo isso. Também a minha mãe Janine Magno Nunes de Oliveira. Ambos sempre estiveram ao meu lado. Agradeço pelo amor, incentivo e dedicação realizados a mim, hoje e sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço pela oportunidade oferecida nesta vida.

Aos meus queridos pais, Luiz Fernando e Janine, por terem acreditado em mim e sempre me apoiado nas minhas escolhas.

Aos meus irmãos, Marcelo e Livia, e também ao Léo.

Ao Prof. Dr. Ricardo Meurer Papaléo, por ter me aceitado no grupo NANOPUC, pela sua orientação e apoio, pelos ensinamentos ao longo desses anos, pela amizade. Agradeço também a confiança para realização desse trabalho.

A Prof.^a Dra. Mara Lise Zanini no auxílio nas atividades de síntese, discussões dos resultados obtidos. Também quanto a sua amizade e a sua compreensão comigo.

A Prof.^a Dra. Leandra F. Campo também no auxílio e colaboração nas atividades de síntese e discussão dos resultados.

Ao Departamento de Química Geral, Orgânica e Biomédica (*Department of General, Organic and Biomedical Chemistry*) em cooperação com a Universidade de Mons - Bélgica, pelo estágio de doutorado, fazendo uso da grande experiência e conhecimento do grupo das Prof.^{as}. Sophie Laurent e Prof.^a. Luce Vander Elst.

A Prof.^a Fernanda Morrone e ao doutorando Pedro Vargas, do Laboratório de Farmacologia Aplicada, no auxílio e na colaboração das atividades envolvendo os testes celulares e na discussão dos resultados.

A Prof.^a Mônica Vianna e aos colegas do ZebLab no auxílio e na colaboração das atividades envolvendo o peixe zebra, na discussão dos resultados e na participação dos seminários semanais, na qual pude aprender cada vez mais sobre o mundo da biologia.

Ao LABCEMM da PUCRS, em especial à Moema, pelas análises nos microscópios eletrônicos.

A Ana Paula Froner, do Hospital São Lucas da PUCRS, no auxílio nas medidas da relaxividade no equipamento de ressonância magnética clínico.

Ao Prof. Dr. Alexandre Viegas e a Prof.^a Dra. Sabrina Nicolodi, do Laboratório de Magnetismo da UFRGS, pelas medidas magnéticas.

Aos funcionários do almoxarifado da Faculdade de Química da PUCRS e aos amigos e colegas do LOR pelo auxílio nas atividades em laboratório.

Aos colegas de projeto Gisele e Max, e aos ICs Angelika, Débora, Gregory, Matheus, Matheus 2, Monique, Mozart e Priscila (meus "*Minions*"), que me acompanharam em diferentes períodos do projeto, pela ajuda na realização das atividades e na interpretação dos resultados.

A todos os colegas do grupo NANOPUC, pelo apoio e ajuda nas atividades desenvolvidas no projeto, e também pelo companheirismo em diversas situações, tanto profissional quanto em momentos divertidos, principalmente na adorável hora do nosso "cafezinho".

Aos meus colegas do PGETEMA e amigos que estiveram ao meu lado em várias etapas do doutorado, principalmente na hora do desespero com os estudos.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma com a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	6
AGRADECIMENTOS	7
SUMÁRIO	9
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS	20
LISTA DE SÍMBOLOS	21
RESUMO	22
ABSTRACT	24
1. INTRODUÇÃO	26
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivos Específicos	29
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	30
3.1. Propriedades de materiais magnéticos	30
3.2. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro	33
3.2.1. Aplicações das nanopartículas magnéticas	34
3.2.2. Métodos de obtenção de nanopartículas de óxido de ferro	36
3.2.3. Estabilização e modificação de superfície	39
3.2.3.1. Dextrana e quitosana	41
3.2.3.2. Polietilenoglicol	43
3.2.3.3. Sílica	45
3.3. Imageamento biomédico assistido por nanopartículas	47
3.3.1. Princípios de ressonância magnética.....	47
3.3.1.1. Relaxação nuclear	49
3.3.1.2. Agentes de contraste em imagens por ressonância magnética	51
3.3.2. Princípios de Fluorescência	54
3.3.2.1. Fluoróforos.....	55
3.3.2.2. Derivados de benzotiazóis	56
3.3.3. Nanopartículas magnetofluorescentes.....	58
3.4. Nanotoxicidade	60
3.4.1. Toxicidade das nanopartículas de óxido de ferro.....	60
3.4.2. Peixe zebra como animal modelo para toxicidade	64

4. MATERIAIS E MÉTODOS	67
4.1. Materiais e reagentes	67
4.2. Procedimentos experimentais de síntese	69
4.2.1. Nanopartículas de óxido de ferro sem revestimento	69
4.2.1.1. Rota de síntese por coprecipitação (NPOFe-C).....	69
4.2.1.2. Rota de síntese por poliol (NPOFe-P).....	70
4.2.2. Nanopartículas de óxido de ferro com dextrana (NPOFe-DX)	70
4.2.3. Nanopartículas de óxido de ferro com quitosana (NPOFe-QS)	71
4.2.4. Nanopartículas de óxido de ferro com derivados de polissilanos	71
4.2.4.1. Nanopartículas de óxido de ferro pela rota poliol com revestimento de polissilano TEPSA (NPOFe-T)	71
4.2.4.2. Nanopartículas de óxido de ferro pela rota poliol com revestimento de óxido de silício (NPOFe-P-SiO ₂)	72
4.2.4.3. Nanopartículas de óxido de ferro pela rota coprecipitação com revestimento de óxido de silício (NPOFe-C-SiO ₂).....	73
4.2.5. Nanopartículas de óxido de ferro com polietilenoglicol (NPOFe-PEG)	73
4.2.6. Síntese da molécula 2-(4-N-(metilaminofenil))-6-hidroxibenzotiazol (6-OH- BTA-1) e da molécula 2-[5'-N-(3-trietoxisilil)propilurea-2'-hidroxifenil] benzotiazol (2'OH-BTA-Si)	74
4.2.7. Conjugação da molécula 2-[5'-N-(3-trietoxisilil)propilurea-2'- hidroxifenil]benzotiazol silanizado (NPOFe-C-Si-BTA-1) e da molécula 2-[5'-N-(3- trietoxisilil)propilurea-2'-hidroxifenil] benzotiazol nas NPOFe-C-SiO ₂	74
4.2.8. Conjugação da molécula 2-(4-N-(metilaminofenil))-6-hidroxibenzotiazol na nanopartícula NPOFe-T (NPOFe-T-BTA-1)	75
4.3. Estudos de toxicidade	75
4.3.1. Cultura de células e citotoxicidade <i>in vitro</i>	75
4.3.1.1. Cultivo celular e tratamento	75
4.3.1.2. Ensaio de viabilidade celular.....	76
4.3.2. Ensaio de toxicidade em peixe-zebra	77
4.3.2.1. Animais	78
4.3.2.2. Monitoramento de embriotoxicidade e teratogênese	78
4.3.2.3. Teste de locomoção e exploração de um novo ambiente	79
4.4. Ensaio <i>in vitro</i> com o peptídeo β-amilóide	80
4.4.1. Preparação do peptídeo beta-amilóide	80

4.4.1.1. Estudo da afinidade do 6-OH-BTA-1 ao peptídeo beta-amiloide	80
4.5. Procedimentos de caracterização	81
4.5.1. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	81
4.5.2. Difração de raio-X (XRD)	81
4.5.3. Magnetômetro de amostra vibrante (VSM)	82
4.5.4. Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).....	82
4.5.5. Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta (ZP ou ζ)	83
4.5.6. Relaxometria magnética nuclear (RN)	83
4.5.7. Imagens por ressonância magnética (MRI)	83
4.5.8. Teor de ferro	84
4.5.9. Espectroscopia por fluorescência (FL).....	85
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	86
5.1. Características estruturais e morfológicas das nanopartículas de óxido de ferro sem revestimento.....	86
5.2. Propriedades coloidais e estabilidade das nanopartículas de óxido de ferro sem revestimento.....	90
5.3. Características estruturais e morfológicas das nanopartículas de óxido de ferro com diferentes revestimentos	94
5.4. Propriedades coloidais e estabilidade das nanopartículas de óxido de ferro com os diferentes revestimentos	100
5.5. Propriedades magnéticas.....	104
5.5.1. Curvas de magnetização	104
5.5.2. Relaxividade magnética nuclear	106
5.6. Propriedades fotofísicas das nanopartículas magnetofluorescentes	111
5.7. Estudo da interação do 6-OH-BTA-1 com os peptídeos beta-amiloide	117
5.8. Ensaio de toxicidade.....	123
5.8.1. Ensaio biológico <i>in vitro</i>	123
5.8.2. Ensaio toxicológico <i>in vivo</i>	128
6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	143
7. ANEXOS	146
7.1. Produção científica	146
7.1.1. Artigos.....	146
7.1.2. Resumos de congressos/conferências	151

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	153
---	------------

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1. Orientações dos dipolos magnéticos e as curvas de magnetização para materiais diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos e ferrimagnéticos (A). Curva de magnetização *versus* campo magnético para materiais ferromagnéticos (B) (adaptado da ref.). 31
- Figura 3.2. Curva de magnetização em função do campo magnético, em temperatura ambiente, de nanopartículas de óxido de ferro comerciais (Sigma-Aldrich). 34
- Figura 3.3. Imagem ilustrativa mostrando imageamento magnético, liberação de fármacos e terapia. A imagem multimodal direcionada a liberação guiada, liberação controlada e tratamento térmico realizados usando nanopartículas magnéticas (adaptado da ref. 25). 36
- Figura 3.4. Partículas estabilizadas pela camada eletrostática (A); partículas estabilizadas por repulsão estérica (B) (adaptado da ref. 24). 40
- Figura 3.5. Estruturas dos polissacarídeos dextrana (A) e quitosana (B). 42
- Figura 3.6. Estrutura do composto químico polietilenoglicol..... 44
- Figura. 3.7. Estruturas dos compostos químicos TEOS (A), APTES (B) e TEPSA (C). 45
- Figura 3.8. Conjunto de prótons com momento magnético líquido na presença de um campo magnético externo B_0 (A). Momento magnético precessionando em torno do B_0 , na frequência de Larmor (ω_0) (B). Segundo campo externo aplicado a 90° perpendicular ao B_0 , oscilando no plano M_{xy} (C) (adaptado da ref. 33). 48
- Figura 3.9. Gráficos da recuperação da magnetização longitudinal em função do tempo (A) e do decaimento da magnetização transversal em função do tempo (B) (adaptado da ref. 111). 49
- Figura 3.10. Magnetização M_z orientado paralelo com o B_0 (A). Rotação da magnetização para o plano M_{xy} após o pulso de radiofrequência de 90° (B). Defasagem dos *spins* individuais (C). Decaimento da M_{xy} devido à defasagem dos *spins* individuais (D). Decaimento completo da M_{xy} (E) (adaptado da ref. 111). 50
- Figura 3.11. Diagrama de Jablonski (adaptado da ref.). 54
- Figura 3.12. Estrutura química do benzotiazol. 56

Figura 3.13. Mecanismo ESIPT de HBT (adaptado da ref. 120).	57
Figura 3.14. Possíveis efeitos tóxicos celulares provocados pela presença de nanopartículas (adaptado da ref. 150).	61
Figura 3.15. Imagens das diferentes fases de desenvolvimentos do peixe zebra. (A) peixe zebra na fase adulta, (B) 24 hpf, (C) 3 dpf e (D) 5 dpf (adaptado da ref. 174).	65
Figura 4.1. Estruturas químicas derivadas dos hidroxobenzotiazóis: 2-(4-N-(metilaminofenil))-6-hidroxibenzotiazol (6-OH-BTA-1) (A); 2-[5'-N-(3-trietoxisilil)propilurea-2'-hidroxifenil] benzotiazol (2'OH-BTA) (B); 2-[5'-N-(3-trietoxisilil)propilurea-2'-hidroxifenil]benzotiazol silanizado (C) .	74
Figura 4.2. Esquema representativo do desenho experimental do peixe zebra.	77
Figura 4.3 Configuração do procedimento para avaliação da capacidade locomotora e exploratória.	79
Figura 4.4. Configuração do procedimento para avaliação do comportamento aversivo sem (A) e com estímulo (B).	80
Figura 4.5. Imagem do <i>phantom</i> no equipamento de MRI. As posições das seringas com as NPs nas cinco concentrações estão descritas de A1-A5 ($C_0/100$ - $C_0/2000$), no sentido horário da mais concentrada. No centro está como referência a água (A). Imagem do equipamento de MRI com o <i>phantom</i> instalado (B e C).	84
Figura 5.1. Imagens de TEM e a distribuição de tamanho das NPOFe obtidas por coprecipitação (NPOFe-C) sem (A e B) e com estabilizante de citrato (C e D).	87
Figura 5.2. Imagens de TEM das NPOFe obtidas pela rota poliol (NPOFe-P) (A e B); a distribuição de tamanho obtida por TEM (C).	87
Figura 5.3. Difratoograma de XRD das NPOFe-P e das NPOFe-C sem citrato e com citrato.	88
Figura 5.4. Espectro de infravermelho das NPOFe-C (—) e NPOFe-P (—).	89
Figura 5.5. Distribuição de tamanho por DLS das NPOFe-C (○) e NPOFe-P (●) em solução aquosa.	90
Figura 5.6. Esquema representando a NPOFe estabilizada com o contra-íon nitrato (A) e estabilizada com íons citrato (B).	91

Figura 5.7. Gráfico do potencial zeta em função do pH das NPOFe-C com citrato (□) e sem citrato (■) NPOFe-P (●) (A); diâmetros médios em função do pH para as NPOFe-C com citrato (○) e NPOFe-P (●) (B).....	92
Figura 5.8. Diâmetro médio das NPOFe-C (○) e NPOFe-P (●) em solução aquosa durante 9 dias.....	93
Figura 5.9. Micrografias de TEM (A e B) e histograma (C) representando a distribuição de tamanho das NPOFe-DX.....	94
Figura 5.10. Micrografias de TEM (A e B) e histograma (C) representando a distribuição de tamanho das NPOFe-QS.	95
Figura 5.11. Micrografias de TEM (A e B) e histograma (C) representando a distribuição de tamanho das NPOFe-T.	95
Figura 5.12. Micrografias de TEM (A e B) e histograma (C) representando a distribuição de tamanho das NPOFe-PEG.....	95
Figura 5.13. Micrografias de TEM (A e B) e histograma (C) representando a distribuição de tamanho das NPOFe-P-SiO ₂	96
Figura 5.14. Micrografias de TEM (A e B) e histograma (C) representando a distribuição de tamanho das NPOFe-C-SiO ₂	96
Figura 5.15. Difratoograma de RX das NPOFe com os diferentes revestimentos.	98
Figura 5.16. Espectro de infravermelho das NPOFe com os diferentes revestimentos.....	100
Figura 5.17. Distribuição de tamanho por DLS das NPOFe-DX (■), NPOFe-CS (□), NPOFe-T (●), NPOFe-PEG (▣), NPOFe-P-SiO ₂ (▲) e NPOFe-C-SiO ₂ (○) em solução aquosa, T= 25°C, nos pH _{finais} (Tabela 5.2).....	101
Figura 5.18. Gráfico da titulação do potencial zeta das NPOFe-DX (■), NPOFe-QS (□), NPOFe-T (◆), NPOFe-PEG (▣), NPOFe-P-SiO ₂ (▲) em função do pH. (A); e acompanhamento da distribuição de tamanho em função do pH (B).	102
Figura 5.19. Diâmetro médio das NPOFe-DX (○), NPOFe-T (●) e NPOFe-PEG (▲) em solução aquosa medidas durante 10 dias (A). Comparação do diâmetro médio das NPOFe-C e NPOFe-DX durante 24h.....	104
Figura 5.20. Curvas de magnetização em função do campo magnético à temperatura ambiente das NPOFe puras (NPOFe-C, NPOFe-P e NPOFe Padrão) (A).	

Curvas de magnetização em função do campo magnético à temperatura ambiente das NPs com diferentes revestimentos (B).....	105
Figura 5.21. Imagem de ressonância magnética (FSE com TR = 1000 ms e TE = 7,4 ms) do <i>phantom</i> mostrando dispersão de três NPs em diferentes concentrações (A) e ilustração do <i>phantom</i> com a localização das NPs; A1-A5 são NPOFe-DX, B1-B5 são as NPOFe-T, são as C1-C5 NPOFe-PEG).	107
Figura 5.22. Intensidade do pixel em função de TI efetivo (A) e TE (B) para soluções aquosas com diferentes concentrações de NPOFe-DX.	107
Figura 5.23. Intensidade do pixel em função de TI efetivo (A) e TE (B) para soluções aquosas com diferentes concentrações de NPOFe-QS.....	108
Figura 5.24. Intensidade do pixel em função de TI efetivo (A) e TE (B) para soluções aquosas com diferentes concentrações de NPOFe-T.....	108
Figura 5.25. Intensidade do pixel em função de TI efetivo (A) e TE (B) para soluções aquosas com diferentes concentrações de NPOFe-PEG.	108
Figura 5.26. Intensidade do pixel em função de TI efetivo (A) e TE (B) para soluções aquosas com diferentes concentrações de NPOFe-P-SiO ₂	109
Figura 5.27. Taxas de relaxação R1 (A) e R2 (B) em função da concentração de ferro para as NPOFe-DX, NPOFe-QS, NPOFe-T, NPOFe-PEG e NPOFe-P-SiO ₂	109
Figura 5.28. Esquema representativo das etapas do processo de síntese das NPOFe-P-SiO ₂ -BTA-Si (adaptado da ref. 130).....	112
Figura 5.29. Espectro de absorção (A) e emissão (B) do 2'OH-BTA-Si a 1x10 ⁻⁴ M em etanol após adições sucessiva de NPOFe-C nas concentrações de 0 a 1,8 mM. Inserção do gráfico: gráfico de <i>Stern-Volmer</i> F ₀ /F versus concentração de Fe (R ² = 0,9987) monitorado no máximo de emissão enol (λ=440 nm).	112
Figura 5.30. Espectro de absorção (A) e emissão (B) do 2'OH-BTA-Si a 1x10 ⁻⁴ M em clorofórmio após adições sucessiva de NPOFe-C nas concentrações de 0-7,2x10 ⁻⁴ M. Inserção do gráfico: gráfico de <i>Stern-Volmer</i> F ₀ /F versus concentração de Fe (R ² = 0,9943) monitorada no máximo emissão de ceto (λ=550 nm).	113
Figura 5.31. Espectro emissão de fluorescência do 2'OH-BTA-Si a 1x10 ⁻⁴ M em etanol após adições sucessiva de NPOFe-C nas concentrações de 0-1,8 mM, medidos a 40 °C. Inserção do gráfico: gráfico de <i>Stern-Volmer</i> F ₀ /F versus	

- concentração de Fe ($R^2 = 0,9938$) monitorado no máximo de emissão enol ($\lambda=440$ nm). 114
- Figura 5.32. Espectro de fluorescência de estado sólido do 2'OH-BTA-Si, NPOFe-C-SiO₂ e NPOFe-C-Si-2'OH-BTA ($\lambda_{exc}=353$ nm) (A). Imagem das NPOFe-C-SiO₂ e NPOFe-C-Si-2'OH-BTA exposto à luz ultravioleta (B). 115
- Figura 5.33. Espectros de fluorescência das moléculas 6-OH-BTA-1, NPOFe-T e NPOFe-T-BTA em solução aquosa (A). Espectros de fluorescência no estado sólido das moléculas puras de 6-OH-BTA-1, da NPOFe-C-SiO₂ e NPOFe-C-SiO₂-BTA-1. (B) 116
- Figura 5.34. Espectros de absorção e de emissão de fluorescência do 6-OH-BTA-1 com 2,75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em diferentes solventes. 117
- Figura 5.35. Estrutura do 6-OH-BTA-1 protonado..... 117
- Figura 5.36. Espectros de emissão de fluorescência do 6-OH-BTA-1(A) em tampão PBS (50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 600, 800 e 1000 nmol.L^{-1}) e o efeito da titulação na presença dos peptídeos amiloides (10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em PBS) na forma de monômero (B), oligômero (C) e placa (D) (50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 nmol.L^{-1} de 6-OH-BTA-1). $\lambda_{exc}=330$ nm. Inserção do gráfico: gráficos da intensidade máxima em função da concentração de 6-OH-BTA-1 na presença dos peptídeos beta-amiloide. 119
- Figura 5.37. (A) Estrutura Thioflavina-T (ThT) e (B) seus espectros de fluorescência na ausência e na presença de fibrilas amiloides. (C) Isoterma de ligação usada para medir a constante de dissociação entre proteína-ligante (adaptado da ref.)..... 120
- Figura 5.38. Dados de supressão de fluorescência do 6-OH-BTA-1 em tampão PBS (pH 7,0, 2,75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) quando titulado com os peptídeos beta-amiloide na forma de monômero em um volume final de 3 mL. ($\lambda_{exc}= 330$ nm). Inserção do gráfico: gráfico da concentração do monômero em função de F_0/F 121
- Figura 5.39. Dados de supressão de fluorescência do 6-OH-BTA-1 em tampão PBS (pH 7,0, 2,75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) quando titulado com os peptídeos beta-amiloide na forma de oligômero em um volume final de 3 mL. ($\lambda_{exc}= 330$ nm). Inserção do gráfico: gráfico da concentração do oligômero em função de F_0/F . 121
- Figura 5.40. Dados de supressão de fluorescência do 6-OH-BTA-1 em tampão PBS (pH 7,0, 2,75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) quando titulado com as proteínas amiloides na forma de placa em um volume final de 3 mL. ($\lambda_{exc}= 330$ nm). Inserção do gráfico: gráfico da concentração da placa em função de F_0/F 122

- Figura 5.41. Ensaio de MTT após exposição as NPOFe-C, por 24 h, nas concentrações de 0,05-4 mmol.L⁻¹ (**p<0,05; ***p<0,01 vs controle). . 124
- Figura 5.42. Ensaio de MTT após exposição as NPOFe-P, por 24 h, nas concentrações de 0,05-4 mmol.L⁻¹ (**p<0,05; ***p<0,01 vs controle). . 124
- Figura 5.43. Ensaio de MTT após exposição as NPOFe-DX, por 24 h, nas concentrações de 0,05-4 mmol.L⁻¹ (*p<0,5 vs controle). 125
- Figura 5.44. Ensaio de MTT após exposição as NPOFe-QS, por 24 h, nas concentrações de 0,05-4 mmol.L⁻¹ (*p<0,5; **p<0,05; ***p < 0.01 vs controle). 125
- Figura 5.45. Ensaio de MTT após exposição as NPOFe-T, por 24 h, nas concentrações de 0,05-4 mmol.L⁻¹. 125
- Figura 5.46. Ensaio de MTT após exposição as NPOFe-PEG, por 24 h, nas concentrações de 0,05-4 mmol.L⁻¹. 126
- Figura 5.47. Ensaio de MTT após exposição as NPOFe-P-SiO₂, por 24 h, nas concentrações de 0,05-4 mmol.L⁻¹ (*p<0,5 e ***p< 0,01 vs controle)... 126
- Figura 5.48. Contagem celular após exposição com as NPs (A) NPOFe-C, (B) NOFe-DX, (C) NPOFe-T e (D) NPOFe-PEG em células VERO tratadas com diferentes concentrações durante 24 h. 127
- Figura 5.49. Imagem de uma larva controle com 5 dpf utilizada para os ensaios de morfologia e teratogênese (escala: 50 µm). 129
- Figura 5.50. Curvas de sobrevivência por Kaplan-Meier das larvas durante 5 dias de exposição às NPOFe com os diferentes revestimentos. NPOFe-DX (A), NPOFe-QS (B), NPOFe-T (C), NPOFe-PEG (D) e NPOFe-P-SiO₂ (E). 130
- Figura 5.51. Imagens das larvas com 24 hpf em tratamento com as NPOFe-QS. (A) Grupo controle, (B) dose de 2 mmol.L⁻¹ e (C) dose de 8 mmol.L⁻¹. 131
- Figura 5.52. Taxa de eclosão larvas em exposição às NPOFe com os diferentes revestimentos. NPOFe-DX (A), NPOFe-QS (B), NPOFe-T (C), NPOFe-PEG (D) e NPOFe-P-SiO₂ (E). 132
- Figura 5.53. Exemplo de anormalidades morfológicas observadas entre indivíduos de todos os grupos no 5 dpf. (A) Edema nas larvas expostas às NPOFe-DX na dose de 0,5 mmol.L⁻¹, (B) diminuição da bexiga natatória nas larvas expostas às NPOFe-T na dose de 0,125 mmol.L⁻¹, (C) edema e cauda torta nas larvas expostas às NPOFe-PEG na dose de 0,5 mmol.L⁻¹ e (D)

edema e malformação do vitelo nas larvas expostas às NPOFe-PEG na dose de 8,0 mmol.L⁻¹ (escala: 500 µm). 133

Figura 5.54. Efeitos comportamentais da exposição às NPOFe-DX em diferentes concentrações medidos no 5 dpf. Parâmetros comportamentais: (A) distância percorrida; (B) velocidade média; (C) ângulo de giro; (D) estado móvel; (E) estado imóvel; (F) estado no centro e (G) estado na periferia. 136

Figura 5.55. Efeitos comportamentais da exposição às NPOFe-QS em diferentes concentrações medidos no 5 dpf. Parâmetros comportamentais: (A) distância percorrida; (B) velocidade média; (C) ângulo de giro; (D) estado móvel; (E) estado imóvel; (F) estado no centro e (G) estado na periferia. **p <0.05 em relação ao grupo controle utilizando ANOVA seguido por Turkey post-hoc..... 137

Figura 5.56. Efeitos comportamentais da exposição às NPOFe-T em diferentes concentrações medidos no 5 dpf. Parâmetros comportamentais: (A) distância percorrida; (B) velocidade média; (C) ângulo de giro; (D) estado móvel; (E) estado imóvel; (F) estado no centro e (G) estado na periferia. 138

Figura 5.57. Efeitos comportamentais da exposição às NPOFe-PEG em diferentes concentrações medidos no 5 dpf. Parâmetros comportamentais: (A) distância percorrida; (B) velocidade média; (C) ângulo de giro; (D) estado móvel; (E) estado imóvel; (F) estado no centro e (G) estado na periferia. 139

Figura 5.58. Efeitos comportamentais da exposição às NPOFe-P-SiO₂ em diferentes concentrações medidos no 5 dpf. Parâmetros comportamentais: (A) distância percorrida; (B) velocidade média; (C) ângulo de giro; (D) estado móvel; (E) estado imóvel; (F) estado no centro e (G) estado na periferia. *p <0.05 em relação ao grupo controle utilizando ANOVA seguido por Turkey post-hoc..... 140

Figura 5.59. O comportamento aversivo medido através do escape efetivo de estímulos (para a área não-estimulada) em larvas expostas às NPOFe-DX (A), NPOFe-QS (B), NPOFe-T (C), NPOFe-PEG (D) e NPOFe-P-SiO₂ (F) com 5dpf. 142

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. SPIONs comercialmente disponíveis em diferentes áreas biomédicas. .35	35
Tabela 3.2. Classificação dos materiais estabilizantes de SPIONs..... 40	40
Tabela 3.3. Ensaio da toxicidade <i>in vitro</i> por MTT de SPIONs com diferentes revestimentos..... 64	64
Tabela 4.1. Reagentes utilizados nas etapas experimentais. 67	67
Tabela 4.2. Equipamentos utilizados nas etapas experimentais..... 68	68
Tabela 5.1. Tamanho médio obtida por TEM, DLS XRD e potencial zeta das NPOFe. 91	91
Tabela 5.2. Diâmetro médio e valores de potencial zeta das NPOFe com diferentes revestimentos obtidos por DLS, TEM e XRD. 97	97
Tabela 5.3. Posições das bandas e atribuições dos espectros FTIR das NPOFe com diferentes revestimentos. 99	99
Tabela 5.4. Tabela com os valores de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico médio em pH=7, pH _{final} e seus pontos isoelétricos..... 103	103
Tabela 5.5. Diâmetro hidrodinâmico e condutividade elétrica das NPOFe com os diferentes revestimentos em H ₂ O, PBS e água do sistema. 103	103
Tabela 5.6. Valores de magnetização de saturadas das NPOFe sem e com os diferentes revestimentos. 106	106
Tabela 5.7. Valores de relaxividade das soluções aquosas das NPOFe em 20, 60 MHz e 61,22 MHz. 110	110
Tabela 5.8. Comprimentos de onda dos valores máximos de absorção e emissão de fluorescência do 6-OH-BTA-1 em diferentes solventes..... 118	118
Tabela 5.9. Anormalidades morfológicas entre indivíduos de todos os grupos..... 133	133

LISTA DE SÍMBOLOS

$\vec{\mu}$	momento magnético	
\vec{H}	campo magnético	Oe
\vec{M}	magnetização	emu/g
\vec{B}	campo magnético	Oe
d_c	diâmetro crítico	nm
g	grama	kg
H_c	campo coercitivo	Oe
$k_B T$	energia térmica	
$K_{eff} V$	energia de barreira	
M_r	magnetização remanescente	emu/g
M_s	magnetização de saturação	emu/g
M_w	peso molecular	Da
M_x	magnetização no eixo x	
M_{xy}	magnetização no eixo xy	
M_y	magnetização no eixo y	
M_z	magnetização no eixo z	
r_1	relaxividade longitudinal	
R_1	taxa de relaxação magnética nuclear longitudinal	
R_2	taxa de relaxação magnética nuclear transversal	
r_2	relaxividade transversal	
S_0	estado fundamental singlete	
S_n	estado excitado singlete	
T_1	relaxação longitudinal	s^{-1}
T_2	relaxação transversal	s^{-1}
TE	tempo de eco	s^{-1}
TI	tempo para inversão	s^{-1}
TR	tempo de repetição	s^{-1}
V	volume	L
γ	razão giromagnética	
χ	susceptibilidade magnética	
ω_0	frequência de Larmor	

RESUMO

MAGNO NUNES DE OLIVEIRA, ELISA. **Agentes de contraste nanoestruturados a base de óxido de ferro: síntese, caracterização e avaliação toxicológica.** Porto Alegre. 2018. Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

O presente trabalho aborda o desenvolvimento de nanopartículas compostas por um núcleo magnético de óxido de ferro com diferentes revestimentos biocompatíveis e estudo comparativo de suas toxicidades. Foram sintetizadas nanopartículas de óxido de ferro sem revestimento e com revestimentos de dextrana, quitosana, polietilenoglicol e sílica, e com a adição de marcadores ópticos da classe dos benzotiazóis. As propriedades físico-químicas das nanopartículas foram caracterizadas, incluindo as suas propriedades magnéticas, ópticas e de contraste em imagens por ressonância magnética nuclear (relaxividades), bem como a afinidade ao peptídeo beta-amiloide, no caso particular de funcionalização com a molécula 6-OH-BTA-1. Em uma segunda etapa, foram avaliados os efeitos toxicológicos dessas nanopartículas em ensaios biológicos *in vitro* em células VERO, e *in vivo* tendo como animal modelo o peixe zebra. O tamanho das nanopartículas com revestimentos variou entre 13 a 30 nm, e estrutura cristalina coerente com o espinélio de ferrita. As nanopartículas não apresentaram magnetização residual e histerese, indicando superparamagnetismo, independente do revestimento. Para a maioria das nanopartículas, os valores de relaxividade transversal r_2 variaram de 76-64 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, com exceção das nanopartículas sem revestimento e de quitosana, os quais foram mais elevados, possivelmente devido ao efeito de agregação. Os valores de r_1 foram semelhantes para todas as nanopartículas (12,6 a 18 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), com exceção das nanopartículas de sílica ($r_1 = 2,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). As razões r_2/r_1 foram entre 4 e 17, valores típicos de agentes de contraste negativos comercialmente disponíveis. As nanopartículas funcionalizadas com os benzotiazóis mantiveram sua fluorescência com deslocamentos de Stokes na ordem de 197 nm para o pico de emissão. As análises da interação do peptídeo beta-amiloide com a molécula 6-OH-BTA-1, mostraram valores de constante de Stern-Volmer para supressão de fluorescência de $1,53 \times 10^4 \text{ mM}^{-1}$ (monômero), $1,40 \times 10^4 \text{ mM}^{-1}$ (oligômero) e $1,33 \times 10^4 \text{ mM}^{-1}$ (placa), indicando *quenching* por um mecanismo estático. O peptídeo na forma monomérica demonstrou maior facilidade de acesso às moléculas de 6-OH-BTA-1. Os

resultados dos ensaios *in vitro* indicaram valores aceitáveis de viabilidade celular para concentração de ferro inferior a 2 mmol.L⁻¹. As nanopartículas com o carboxisilano e polietilenoglicol demonstraram maior biocompatibilidade e as nanopartículas de sílica tiveram a maior citotoxicidade. Os resultados dos ensaios *in vivo* não mostraram alterações significativas na taxa de sobrevivência e de eclosão do corium, exceto para as doses maiores que 2 mmol.L⁻¹ das nanopartículas revestidas com quitosana. Os percentuais de animais com alterações anatômicas foram similares entre os grupos tratados e de controle. Nos ensaios de locomoção e exploração, apenas as nanopartículas de quitosana e de sílica induziram alterações adversas significativas.

Palavras-chave: nanopartículas magnéticas, agentes de contraste, imagens biomédicas, toxicidade.

ABSTRACT

MAGNO NUNES DE OLIVEIRA, ELISA. **Nanostructured contrast agent based on iron oxide nanoparticles: synthesis, characterization and toxicological evaluation.** Porto Alegre. 2018. PhD Thesis. Post-Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

The present study focuses on the development of nanoparticles with an iron oxide magnetic core, with different biocompatible coatings, and on a comparative study of their toxicities. Uncoated and dextran-, chitosan-, polyethylene glycol- and silica-coated nanoparticles were synthesized. The addition of optical markers of the benzothiazoles class was also accomplished. The physico-chemical properties of the nanoparticles were characterized, including their magnetic, optical and contrast properties in nuclear magnetic resonance imaging (relaxivities). In the particular case of nanoparticles functionalized with 6-OH-BTA-1 molecules, the affinity to the beta-amyloid peptide was also investigated. A second step was to evaluate the toxicological effects of these nanoparticles *in vitro* (using in VERO cells), and *in vivo* with zebrafish as an animal model. The size of the nanoparticles with the coatings ranged from 13 to 30 nm. Their crystalline structure was consistent with the ferrite spinel. The nanoparticles, independent of the coating, did not present residual magnetization and hysteresis, indicating superparamagnetic behaviour. For most nanoparticles, the r_2 transverse relaxivity values ranged from 76-64 $\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$, except for uncoated and chitosan-coated nanoparticles, which present higher values, possibly due to the aggregation. The values of r_1 were similar for all nanoparticles (12.6 to 18 $\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$), with the exception of silica-coated nanoparticles ($r_1=2.1 \text{ mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$). The r_2/r_1 ratios were between 4 and 17, typical of commercially available negative contrast-agents. The nanoparticles functionalized with benzothiazoles showed fluorescence with a Stokes shift of the emission peak of $\sim 197 \text{ nm}$. The interaction of the beta-amyloid peptide with the 6-OH-BTA-1 molecule analyzed by fluorescence suppression is characterized by a static mechanism and Stern-Volmer constants of $1.53 \times 10^4 \text{ mM}^{-1}$ for the monomeric form, $1.40 \times 10^4 \text{ mM}^{-1}$ for oligomers) and $1.33 \times 10^4 \text{ mM}^{-1}$ for amyloid plaques. The *in vitro* toxicity assays indicated acceptable values of cell viability for iron concentration up to 2 mmol.L^{-1} . The

nanoparticles with the carboxysilane and polyethylene glycol showed higher biocompatibility and silica-coated nanoparticles had the highest cytotoxicity. The *in vivo* assays did not show significant changes in survival and hatchability rates, except for doses greater than 2 mmol.L⁻¹ in the case of the chitosan-coated nanoparticles. The percentages of animals with anatomical alterations were similar between the treated and control groups. In the locomotion and exploration tests, only chitosan- and silica-coated nanoparticles induced significant changes.

Key-words: magnetic nanoparticles, contrast agent, biomedical imaging, toxicity.

1. INTRODUÇÃO

Materiais nanoestruturados têm atraído muita atenção nos últimos anos por apresentarem propriedades físico-químicas inusitadas e diferenciadas de suas formas massivas (*bulk*). A dependência das propriedades como o tamanho e forma, elevada razão superfície/volume e a possibilidade de combinação de diferentes funcionalidades são as principais características que tornam as nanoestruturas úteis numa variedade de aplicações tecnológicas.^{1,2} O uso de nanomateriais nas áreas da biologia e da medicina levou ao surgimento de um novo campo de pesquisa: a nanomedicina, criando novas formas de diagnóstico e terapia, bem como monitoramento de sistemas biológicos.^{3,4}

Dentre as nanopartículas (NPs) utilizadas em aplicações biomédicas, destacam-se as superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs), sendo a magnetita e a maguemita as mais utilizadas. As SPIONs, normalmente, possuem uma estrutura compostas por um núcleo magnético e sua superfície pode ser modificada pela adição de materiais biocompatíveis.^{5,6,7} A modificação da superfície atua na proteção das SPIONs frente ao ambiente circundante, minimizando a agregação e fornece sítios para adição de grupos químicos ou moléculas inteiras capazes de prover múltiplas funcionalidades ao sistema.^{8,9} Além disso, as SPIONs podem ser dispersas em diferentes solventes, formando suspensões homogêneas (ferrofluidos), que, na presença de um campo magnético externo, interagem com o mesmo e podem ser conduzidas para locais específicos, conforme a aplicação pretendida.^{10,11} As SPIONs podem servir como um material sinalizador, aumentando o contraste com tecidos de interesse na ressonância magnética ou interagir com sistemas biológicos em nível molecular.^{12,13,14 15,16,17}

Na terapia e no diagnóstico por imagem, a utilização de SPIONs tem crescido, principalmente pela possibilidade de conjugação com marcadores moleculares de processos fisiológicos específicos ou com afinidade seletiva a determinadas estruturas

biológicas, pela possibilidade simultânea de carreamento (ou entrega) de fármacos para diferentes patologias, como o câncer.^{15,18,19,20}

Quando funcionalizadas com fluoróforo, as SPIONs também possibilitam o imageamento óptico, um método não invasivo de elevada sensibilidade de detecção, dando origem a uma nova modalidade de materiais que atuam como agentes de contraste multimodal. O uso de mais de uma técnica de imagem fornece informações complementares, portanto, a combinação simultânea de imagens por ressonância magnética e ópticas beneficiaria grandemente o diagnóstico e tratamento de diferentes doenças ou os estudos pré-clínicos com pequenos animais ou células.^{16,18,21,22,23}

Apesar de avanços nas aplicações das SPIONs na nanomedicina, a maioria das abordagens ainda estão longe de uma solução clínica efetiva, restringindo-se a provas de conceitos, principalmente com base em estudos com pequenos animais. O desempenho biológico, farmacocinético e de contraste depende das propriedades físico-químicas das SPIONs (tamanho, forma, dispersão, carga superficial, entre outros).^{12,24} Por isso, devido às especificidades e a dinâmica dos organismos vivos, o comportamento *in vivo* dessas SPIONs é altamente dependente da estrutura e recobrimento, sendo necessário um estudo detalhado para cada classe de SPIONs desenvolvida. Apesar da vasta literatura já existente, há muito ainda para ser investigado quanto às características estruturais, de agregação e estabilidade coloidal e sua relação com as propriedades de absorção, eliminação, biodistribuição e toxicidade vinculadas às SPIONs.^{19,20,24,25,26,27,28,29}

O presente trabalho de doutorado está relacionado com a preparação, a caracterização físico-química, o desempenho de contraste em ressonância magnética e de perfil toxicológico de nanopartículas de óxido de ferro com diferentes revestimentos, e a inserção de marcadores ópticos derivados de benzotiazóis. Também foi estudada a afinidade molécula 6-OH-BTA-1 como marcador do peptídeo beta-amiloide nas três formas estruturais: monômero, oligômero e placa.

Durante o período de doutorado, foram elaboradas diferentes produções científicas e trabalhos paralelos referentes aos resultados obtidos, os quais são apresentados no anexo 1.

O texto está dividido em 7 capítulos, a começar por essa introdução. No capítulo 2, estão abordados os objetivos e objetivos específicos desenvolvidos durante o

trabalho. No capítulo 3, está descrito uma revisão bibliográfica a respeito dos principais aspectos e características das nanopartículas magnéticas e suas aplicações, a fim de situar o leitor quanto ao estado da arte dessa área. No capítulo 4, estão descritos os materiais e métodos utilizados para a realização dos experimentos, compreendendo a preparação e as diferentes caracterizações realizadas para todas amostras sintetizadas. No capítulo 5, são apresentados e discutidos os resultados obtidos da síntese e caracterizações físico-químicas, magnéticas e de contraste das nanopartículas, bem como os ensaios de toxicidade *in vitro* e *in vivo*. No capítulo 6, são apresentadas as conclusões gerais do trabalho e as perspectivas futuras. E por fim, no capítulo 7, as produções científicas geradas durante o período de doutorado.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho é preparar e caracterizar por análises físico-química e a avaliar do perfil toxicológico de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com diferentes revestimentos, com potencial uso para o imageamento por ressonância magnética e métodos ópticos.

2.1. Objetivos Específicos

Foram objetivos específicos do trabalho:

- Produzir nanopartículas de óxido de ferro com revestimentos de dextrana, quitosana, polietilenoglicol e sílica, e moléculas fluorescentes;
- Caracterizar as propriedades físico-químicas das nanopartículas em relação à composição, morfologia, distribuição de tamanho, estabilidade coloidal, fase cristalina e comportamento magnético;
- Determinar o desempenho das nanopartículas como agentes de contraste por relaxometria, por imagens por ressonância magnética e ópticas;
- Investigar a toxicidade *in vitro* das nanopartículas em cultura de células VERO;
- Investigar a embriotoxicidade e teratogenia das nanopartículas em modelo animal peixe zebra (*in vivo*);
- Investigar a afinidade de moléculas derivadas do benzotiazol com o peptídeo beta-amiloide

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Propriedades de materiais magnéticos

As propriedades magnéticas dos materiais estão relacionadas com os momentos de dipolo magnético com contribuição dos momentos angulares orbital e de *spin* dos elétrons, prótons e nêutrons.³⁰ Os átomos que possuem níveis de energia incompletos possuem um momento magnético remanescente (momento magnético líquido não nulo) resultado do desemparelhamento dos *spins*. Quando um material é exposto a um campo magnético externo (\vec{H}), os momentos de dipolos magnéticos tendem a orientar-se de acordo com a direção e sentido desse campo, produzindo um campo magnético próprio: a magnetização (\vec{M}). A magnetização é o momento magnético líquido por volume de material. As respostas magnéticas podem ser classificadas em termos da susceptibilidade magnética (χ), variável que relaciona a magnetização com o campo magnético externo, de acordo com a Equação 3.1:

$$\vec{M} = \chi \cdot \vec{H} \quad (3.1)$$

Esse parâmetro permite identificar a natureza magnética do material. Quando $\chi < 0$, o campo magnético induzido se opõe ao campo externo e o material é dito diamagnético. Já quando $\chi > 0$, o campo induzido alinha-se na mesma direção do campo magnético externo. Ao remover o campo magnético externo, devido a agitação térmica, perde-se a coerência dos *spins* e a magnetização se reduz até um valor nulo.^{30,31}

O ferromagnetismo ocorre quando a orientação dos *spins* resulta num momento magnético diferente de zero (momento magnético intrínseco), mesmo sem campo magnético externo aplicado. Quando o campo magnético externo é aplicado, os *spins* alinham-se na mesma direção desse campo, resultando numa susceptibilidade magnética positiva e elevada.^{30,32} O ferrimagnetismo ocorre em materiais com diferentes átomos presentes no material. Os *spins* tendem a se alinhar na mesma direção, porém

em sentidos opostos e a magnetização resultante não é nula. Por exemplo, na magnetita (Fe_3O_4), os íons ferro podem ter o número de valência igual a +2 ou +3, ocorrendo um momento magnético líquido para cada número de valência. Os íons de oxigênio presentes são magneticamente neutros, contudo, geram interações de pareamento de *spins* antiparalelo entre os íons de ferro e o momento magnético líquido resulta do cancelamento incompleto dos *spins*.^{30,34}

Na Figura 3.1, estão representadas as orientações dos momentos dos dipolos magnéticos. A curva de magnetização é dada pelo gráfico de \vec{M} versus \vec{H} .

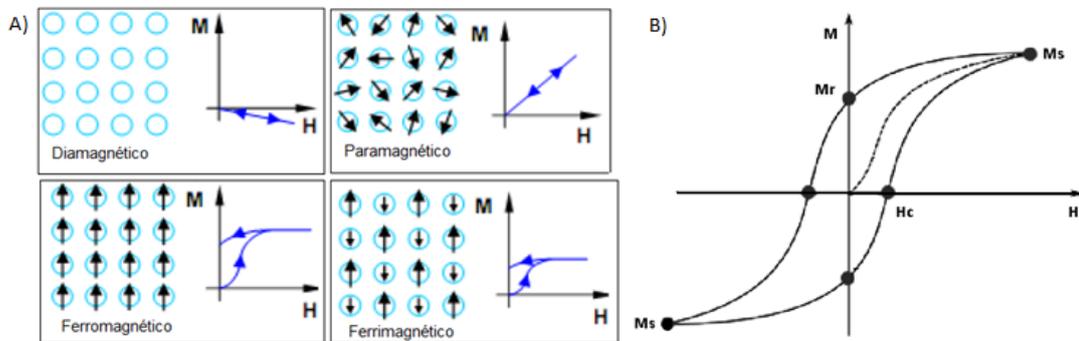


Figura 3.1. Orientações dos dipolos magnéticos e as curvas de magnetização para materiais diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos e ferrimagnéticos (A). Curva de magnetização versus campo magnético para materiais ferromagnéticos (B) (adaptado da ref. 33).

Um material magnético nem sempre possui o seu volume magnetizado numa mesma direção e, sim em pequenas regiões com magnetização uniforme, porém desorientadas, denominadas de domínios magnéticos.³¹ Para materiais magnéticos *bulk*, existem multidomínios magnéticos, separados por paredes de domínios, formado pelo balanço energético entre a energia magnetostática (proporcional ao volume do material), e a energia de formação das paredes de domínio (proporcional com a área interfacial entre os domínios).^{8,30} Portanto, em materiais ferromagnéticos, na presença de um campo magnético externo, os momentos atômicos tendem a alinhar-se no sentido do campo aplicado e as paredes de domínio deslocam-se sucessivamente para favorecer o crescimento dos domínios alinhados com o campo em detrimento de outros domínios. Isso ocorre até os domínios alinharem-se num valor máximo, chamado de magnetização de saturação (M_s). Ao diminuir a intensidade do campo apli-

cado o valor da magnetização não evolui mais na mesma proporção do que anteriormente. Devido aos acoplamentos dos momentos magnéticos dos átomos não voltarem para sua orientação original, o material não exhibe magnetização nula quando o campo magnético externo é igual a zero, mas uma magnetização residual, chamada de magnetização remanescente (M_r), ocorrendo a histerese. Para que o material não apresente remanência, inverte-se a aplicação do campo magnético externo no sentido contrário ao campo inicial. A magnitude do campo aplicado para anular a M_r do material é chamada de campo coercitivo (H_c). Os domínios reorientam-se até a sua desmagnetização. Depois de saturado no sentido inverso ao inicial, completa-se o ciclo da histerese (Figura 3.1B).^{30,31}

Para materiais em dimensões pequenas, o número de domínios magnéticos pode diminuir até existir um único domínio (monodomínio), desde que o tamanho do material seja inferior a um certo diâmetro crítico (d_c).^{7,8} Esse diâmetro crítico pode ter dezenas de nanômetros e depende do material, sendo influenciado pela contribuição de diferentes energias anisotrópicas.⁷

Os momentos magnéticos no monodomínio magnético ao sofrer a ação de um campo magnético movimentam-se de forma coerente para uma mesma direção de rotação da magnetização. A diminuição do tamanho do monodomínio faz com que o momento magnético se torne instável no eixo magnético preferencial quando o campo magnético está sendo aplicado.^{8,31,34} As interações atômicas em materiais magnéticos possuem direções preferenciais em relação aos eixos cristalográficos, portanto são anisotrópicas. A energia de anisotropia magnética, que determina a direção preferencial da magnetização por partícula, é responsável por manter os momentos magnéticos ao longo de uma determinada direção e é dada por:

$$E = K_{eff}Vsen^2\theta, \quad (3.2)$$

onde V é o volume da partícula, K_{eff} é a constante de anisotropia e θ é o ângulo entre a magnetização e a direção fácil de magnetização preferencial.^{8,34} A energia de barreira $K_{eff}V$ separa, energeticamente, duas direções de magnetização. Com partículas de tamanho cada vez menores, a energia térmica ($k_B T$) pode ultrapassar a barreira de energia $K_{eff}V$ e a magnetização é facilmente invertida, sendo livre para girar entre as

direções de fácil magnetização. A direção dos momentos magnéticos torna-se instável e a magnetização total do material é nula na ausência de um campo magnético externo e o seu comportamento é dito paramagnético. Na presença de um campo magnético externo a resposta magnética é relativamente rápida, mostrando magnetização de saturação maiores que de um material paramagnético. Esse comportamento é chamado de superparamagnetismo e é caracterizado por apresentar ausência de histerese magnética e valores de coercividade e remanência praticamente nulos.^{8,31}

No caso de nanopartículas magnéticas (NPMs), cada momento magnético próprio pode ser facilmente saturado na presença de um campo magnético externo. Porém, a magnetização retorna a zero, após a remoção do campo, como consequência de flutuações térmicas.³⁴ O momento magnético da partícula como um todo está livre para flutuar, enquanto que os momentos atômicos individuais mantêm o seu estado relativo ordenado uns com os outros. Esse comportamento é similar aos materiais paramagnéticos, porém ao invés de momentos individuais, é o momento coletivo das partículas presentes.³⁴

3.2. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro

A magnetita e a maguemita pertencem a classe de materiais de óxidos metálicos magnéticos denominados de ferritas cúbicas e são classificadas como estruturas cristalinas de espinélio.⁸ O elemento ferro, presente nos óxidos de ferro, são de grande interesse científico quando comparados com outros metais de transição, por ser um metal pesado biocompatível, com importância nutricional na produção de hemáceas do sangue e no transporte de oxigênio para as células do corpo.³⁵ As nanopartículas de óxido de ferro (NPOFe), com núcleos menores que 10 a 30 nm, exibem comportamento superparamagnético à temperatura ambiente.⁷ A Figura 3.2 mostra o gráfico da magnetização *versus* o campo magnético de uma amostra de NPOFe comerciais (Sigma-Aldrich). As NPOFe apresentam valor de distribuição de tamanho de, aproximadamente, 30 nm, revelando comportamento superparamagnético, com valores de magnetização de saturação de 75 emu/g.

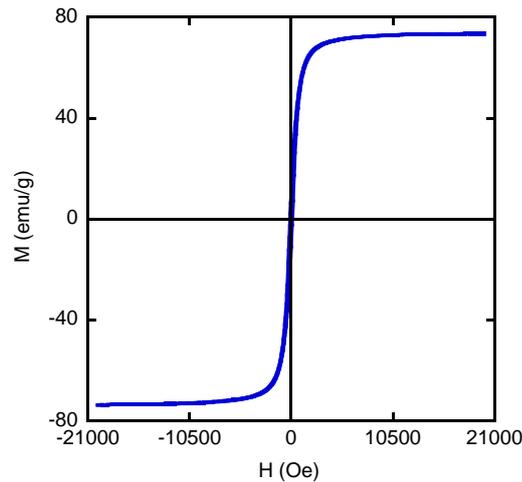


Figura 3.2. Curva de magnetização em função do campo magnético, em temperatura ambiente, de nanopartículas de óxido de ferro comerciais (Sigma-Aldrich).

A magnetita (Fe_3O_4) e a maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) são os principais óxidos metálicos que constituem as nanopartículas superparamagnéticas (SPIONs-*superparamagnetic iron oxide nanoparticles*). Na forma de ferrofluidos, as SPIONs formam suspensões magnéticas finamente divididas em um meio líquido.³⁴ Uma característica importante é a possibilidade de manipulação e controle mediante um campo magnético externo, podendo penetrar em células e tecidos humanos e atingir um determinado alvo quando injetadas no organismo. A superfície das SPIONs pode ser passível de ser funcionalizada com diferentes ligantes, que favorecem a interação com o ambiente biológico.^{36,37}

3.2.1. Aplicações das nanopartículas magnéticas

Alguns exemplos de aplicações tecnológicas das SPIONs em diferentes áreas incluem catálise^{38,39}, vedantes magnéticos⁴⁰, tintas⁴¹, armazenamento de dados e mitigação de impacto ambiental.^{8,99} Já na nanomedicina, as SPIONs podem ser utilizadas para aplicações *in vitro*, como na separação e rotulagem de biomoléculas⁴² ou células.⁴³ O método por separação magnética pode ser utilizado de modo rápido e simples para a captura de biomoléculas específicas. A separação magnética tem várias vantagens em comparação com os processos de separação tradicional, por exemplo as colunas cromatográficas convencionais. As SPIONs são adicionadas a uma

solução contendo a biomolécula específica, a qual se liga à SPIONs e o complexo formado é recolhido por meio da ação de um campo magnético.^{15,24,44}

Para aplicações *in vivo*, elas são utilizadas para terapias de câncer^{19,18}, como liberação de fármacos^{67,68,89}, e hipertermia.^{75,45} Nos últimos anos, diversos trabalhos foram publicados, reunindo os dados de diferentes aplicações biomédicas das SPIONs, principalmente em imageamento médico (Figura 33).^{23,46,47} A Tabela 3.1 mostra alguns exemplos de SPIONs comercialmente disponíveis em áreas biomédicas.

Tabela 3.1. SPIONs comercialmente disponíveis em diferentes áreas biomédicas.

Empresa	Aplicação biomédica	Referências
Dexter Magnetic Technologies	Separação biomagnética	48
Ocean Nanotech	Síntese de nanopartículas	49
European Institute of Science	Hipertermia	50
Advanced Magnetics	Agentes de contraste para ressonância magnética	51

Outra aplicação interessante é seu uso para tratamento de câncer por hipertermia, considerado como um tratamento complementar à quimioterapia, à radioterapia ou à cirurgia. A ideia básica da magnetohipertermia é explorar o efeito de morte seletiva de células tumorais, por meio de aquecimento controlado do tecido patológico. Quando as SPIONs são expostas a um campo eletromagnético alternado, normalmente gerado por bobinas de radiofrequência, a magnetização das SPIONs oscila nesse campo, gerando uma conversão de energia magnética para energia térmica. O calor gerado é liberado para o tecido patológico adjacente. As células patológicas são mais sensíveis a temperaturas mais elevadas do que as células saudáveis, e essa temperatura pode se manter acima do limite terapêutico de 42 °C.⁸

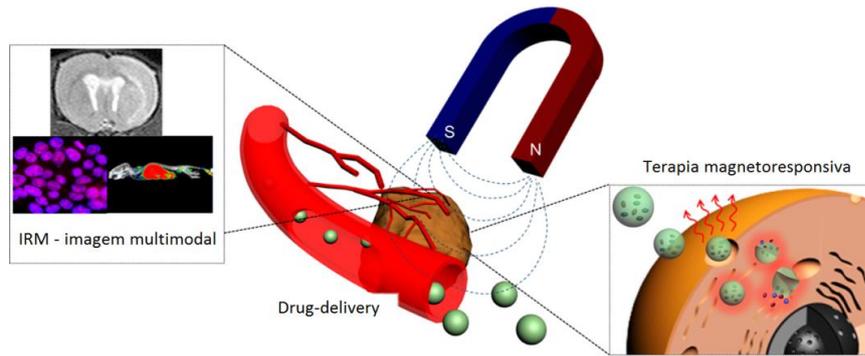


Figura 3.3. Imagem ilustrativa mostrando imageamento magnético, liberação de fármacos e terapia. A imagem multimodal direcionada a liberação guiada, liberação controlada e tratamento térmico realizados usando nanopartículas magnéticas (adaptado da ref. 25).

As SPIONs também podem ser utilizadas como transportadores de fármacos (*drug delivery*). O conceito geral é ligar/enxertar o fármaco às SPIONs e guiá-las a um local biológico, através de gradientes de campos magnéticos localizados, mantendo-as nesse local até que a terapia esteja completa. Os transportadores magnéticos de fármacos têm potencial para produzir uma elevada concentração local, diminuindo a toxicidade e outros efeitos colaterais adversos resultantes da administração de doses elevadas de fármacos em outras partes do organismo.^{8,52}

Na terapia e diagnóstico por imagem, a utilização de SPIONs tem crescido, particularmente para aplicações em imagens moleculares. Isso decorre da possibilidade de conjugação com muitos marcados moleculares específicos de processos fisiológicos ou com afinidade seletiva a determinadas patologias, bem como da capacidade intrínseca das SPIONs de alterar o contraste em diferentes modalidades de imagens. As SPIONs são particularmente úteis em imagens por ressonância magnética (MRI). O uso de materiais como agentes de contraste em MRI pode aumentar significativamente a sensibilidade das imagens moleculares de alta resolução.¹²

3.2.2. Métodos de obtenção de nanopartículas de óxido de ferro

Diversas estratégias foram desenvolvidas para sintetizar SPIONs, tais como diferentes composições e distribuições de tamanhos.^{34,36} Os métodos via processos físicos, como deposições em fase gasosa e litografia por feixe de elétrons, podem ser

não apropriados por apresentarem disparidade no controle de tamanho das partículas que se deseja obter.^{8,53} A síntese via rota química é mais indicada em comparação à síntese por métodos físicos, pela maior vantagem no controle de vários parâmetros e menor custo.¹⁵

Um dos primeiros métodos de produção de partículas magnéticas na presença de um solvente e de um surfactante foi proposta por Khalafalla, que produziu ferrofluidos estabilizados pela adição de ácido oleico.⁵⁴ A partir disso, diversos métodos foram estudados e usados para sintetizar as SPIONs, tais como: microemulsão, sol-gel^{55,56}, eletrosprays⁵⁷, decomposição térmica ou pirólise^{34,58}, sonólise⁵⁹, coprecipitação^{60,61}, poliol.⁶²

Alivisatos e colaboradores⁶³ desenvolveram pela primeira vez o método por decomposição térmica para a produção de nanocristais monodispersos de γ -Fe₂O₃, Mn₃O₄ e Cu₂O por pirólise de complexos metálicos. Esse método utiliza precursores, como Fe(acac)₃ (acetilacetonato de ferro III), Fe(Co)₅ (pentacarbonil de ferro) e complexos de oleato de ferro (Fe(oleato)₃), sob elevadas temperaturas. A vantagem dessa abordagem é que os nanocristais resultantes apresentam uma faixa estreita de distribuição de tamanho, de modo que não é necessário qualquer processo seletivo de tamanho, como etapas de centrifugação ou filtração. Porém, esse tipo de síntese utiliza grandes quantidades do precursor e de solvente orgânico, (normalmente tóxicos). Por isso, antes das NPs serem utilizadas em aplicações biomédicas, é necessária uma etapa adicional de purificação.^{8,9,34}

O método de síntese por microemulsão utiliza uma dispersão estável de dois líquidos imiscíveis, na qual o microdomínio de um ou ambos os líquidos são estabilizados por uma película interfacial de moléculas tensoativas. Em microemulsões de água em óleo, a fase aquosa é dispersa como microgotículas (1-50 nm de diâmetro) rodeado por uma monocamada de moléculas de agente tensoativo na fase contínua de hidrocarboneto. Ao misturar duas microemulsões de água em óleo contendo os reagentes desejados, as microgotículas colidem e coalescem, formando um precipitado de micelas. Usando o método por microemulsão, por exemplo, diferentes materiais metálicos podem ser sintetizados em micelas invertidas de brometo cetiltrimetilamônio, utilizando 1-butanol como co-agente tensoativo e octano como fase oleosa.^{8,9}

O método de síntese por poliol é versátil para a obtenção de partículas com formas mais definidas e tamanhos controlados. Os solventes derivados de polióis (polietilenoglicol, dietilenoglicol e trietilenoglicol) apresentam constantes dielétricas elevadas, atuando como solventes capazes de dissolver compostos inorgânicos e, devido ao alto ponto de ebulição, oferecem uma ampla faixa de temperaturas para a síntese. Os polióis também servem como agentes redutores, bem como estabilizadores no controle do crescimento de partículas e para prevenir a agregação entre partículas.^{8,9,24} Na síntese, os compostos precursores são suspensos em um poliol líquido, agitados e aquecidos até a temperatura de ebulição do poliol. Durante essa reação, o precursor metálico torna-se solubilizado na fase diol, formando um composto intermediário e reduzido para formar núcleos metálicos, que então passam pelo processo de nucleação, formando as partículas metálicas. Em comparação com outros métodos, a superfície das SPIONs pode ser revestida por ligantes polióis hidrofílicos, sendo então facilmente dispersas em meios aquosos ou outros solventes polares.^{8,9,24}

Já o método por coprecipitação é um dos métodos por rota química mais simples, que pode produzir dispersões em meio aquoso.^{15,24} O método Massart foi uma das primeiras técnicas de precipitação a partir de cloretos férricos e ferrosos.⁶⁴ Os óxidos de ferro dispersos são coprecipitados a partir de uma solução de sais férrico e ferroso. O controle do tamanho, forma e composição das SPIONs depende do tipo de sal de ferro utilizado, da razão estequiométrica entre os férricos e ferrosos, do pH do meio reacional e da base usada. A oxidação da magnetita pode ser evitada, durante a síntese, adicionando um material de revestimento, bem como um gás inerte (nitrogênio ou argônio).^{24,53}

Mohammad-Beigi e colaboradores⁶⁵, estudaram a influência do tipo de base no meio reacional e encontraram que ao utilizar NH_4OH , ao invés de NaOH , as propriedades magnéticas melhoraram e a faixa de distribuição de tamanho foi mais estreita. Gribanov e colaboradores⁶⁶ também confirmaram esse resultado, alegando que utilizar uma base forte pode levar à formação de componentes não magnéticos (fase α - FeOOH), e uma com base fraca permite um controle mais preciso do pH. Os estudos obtidos por Wei demonstraram a importância da razão entre os íons de ferro na síntese das NPMs e ambos os grupos averiguaram que mantendo a razão de, no mínimo 2:1 ($\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$), obtém-se SPIONs homogêneas em tamanho, em distribuição e de maior

qualidade.⁶⁷ Lodhia e colaboradores¹² constataram que além das proporções estequiométricas, o pH do meio influenciava bastante a formação de pequenas SPIONs, que é a magnetita pode ser formada numa faixa de pH de 9-14. Sun e colaboradores estudaram a influência da temperatura do meio reacional com a distribuição de tamanho das SPIONs, revelando que o aumento de temperatura pode levar a diminuição do seu tamanho.⁶⁸ A vantagem do método de coprecipitação consiste em sua simplicidade, reações em baixas temperaturas, tempo de reação relativamente curto, possibilidade de processamento em grande escala e ser economicamente mais viável. A desvantagem é vista no controle de tamanho da SPIONs, a baixa cristalinidade e a possibilidade de agregação.²⁴

3.2.3. Estabilização e modificação de superfície

Os materiais de revestimento desempenham um papel importante na estabilização de suspensões aquosas de SPIONs. Qualquer que seja a aplicação biomédica, a estabilidade dos nanomateriais em condições fisiológicas é um dos fatores chave para a sua utilização com êxito. Devido à grande razão entre a área superficial/volume e sua natureza magnética, as partículas tendem a se desestabilizar, pois as forças de Van der Waals e as forças magnéticas entre as SPIONs podem conduzir à agregação. Além disso as SPIONs, quando em contato com proteínas do plasma, em sistemas biológicos, pode levar ao aumento do tamanho das partículas por adsorção de proteínas na superfície, levando então à aglomeração. Portanto idealmente, as SPIONs devem ser capazes de evadir o sistema reticuloendotelial (RES), ter estabilidade em meio aquoso e em salinidade fisiológica. Por isso, a etapa de estabilização é essencial para obter um ferrofluido que seja estável em meio fisiológico e mediante a ação de um campo magnético.^{69,70}

Tipicamente a estabilização pode ser realizada pela presença de cargas ositivas e negativas, polímeros ou surfactantes sobre a sua superfície. A estabilização eletrostática ocorre quando as cargas da superfície de duas partículas são capazes de evitar agregação pela repulsão da dupla camada elétrica interparticular. Já a estabilização estérica são observados dois efeitos devido à interpenetração da cadeia do material de revestimento. Quando duas partículas se aproximam, ocorre um efeito

osmótico pelo aumento na concentração de espécies adsorvidas e um efeito entrópico, devido à perda de graus de liberdade de movimentação das cadeias poliméricas. A estabilização ocorre quando o solvente se desloca para solvatar novamente as partículas, gerando uma barreira que dificulta a aproximação das partículas, e pela retomada da entropia, na qual forças repulsivas afastam as partículas devolvendo grau de liberdade do movimento das cadeias poliméricas (Figura 3.4).^{24,71}

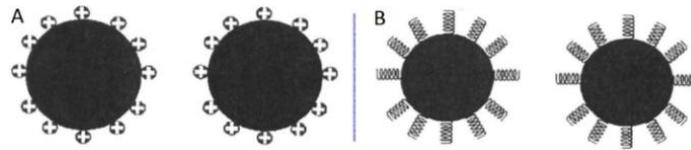


Figura 3.4. Partículas estabilizadas pela camada eletrostática (A); partículas estabilizadas por repulsão estérica (B) (adaptado da ref. 24).

O material de revestimento nas SPIONs diminui sua energia de superfície, evitando agregação. A teoria de *Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek* (DLVO) explica que a energia potencial total entre dois corpos é resultante da ação combinada entre as forças atrativas de Van der Waals e as forças repulsivas da dupla camada elétrica formada em solução aquosa.⁷² Os revestimentos, além de atuar como uma barreira estérica, estabilizam a dispersão e auxiliam na prevenção de agregação, na biocompatibilidade, nas alterações estruturais, e de biodegradação quando expostas ao meio fisiológico. Os diversos tipos de materiais de revestimento podem ser classificados de acordo com a Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Classificação dos materiais estabilizantes de SPIONs.

Materiais	Estabilizantes	Referências
Iônicos	Carboxilatos, fostatos, sulfatos	73, 74
Inorgânicos	Ouro, sílica, gadolínio	75, 58, 76
Polímeros	Dextrana, quitosana, polietileno-glicol, álcool polivinílico	60, 70, 77 78, 79, 80

As principais classes empregadas a SPIONs são polímeros biocompatíveis, bem como materiais inorgânicos como óxido de silício e ouro. Abaixo são detalhadas as características de materiais de revestimentos usados nesse trabalho.

3.2.3.1. Dextrana e quitosana

A dextrana e a quitosana são polissacarídeos biocompatíveis, considerados não tóxicos e que possuem grupos químicos que permitem aumentar a funcionalização das SPIONs (Figura 3.5). A dextrana é produzida tanto por bactérias (*Leuconostoc mesenteroides*), como por síntese química. É composta por moléculas de glicose $(C_6H_{10}O_5)_n$ e monômeros de α -D-glucopiranosil, com ramificações de cadeias de diferentes comprimentos.^{71,81}

A estabilidade da dextrana como revestimento para SPIONs pode variar em relação às possíveis modificações de superfícies para a fixação de biomoléculas. Em soluções aquosas, a dextrana interage com a superfície das NPs por interações polares (de quelação e de ligação de hidrogênio). Embora as ligações de hidrogênio sejam relativamente fracas, a energia de ligação total das ligações de hidrogênio ao longo do comprimento da molécula de polissacarídeo pode ser elevada, devido ao grande número de grupos hidroxil presente na molécula de dextrana. O comprimento das cadeias e o peso molecular (M_w) da dextrana desempenham um papel fundamental para a absorção das SPIONs no meio biológico. As dextranas de baixo peso molecular, normalmente menores que 10 kDa, são eliminados do organismo através da filtração glomerular que ocorre nos rins e, no caso de seu uso em partículas maiores que 80 nm, podem ser assimiladas pelo sistema reticuloendotelial (RES). Para as dextranas de peso molecular maior, a eliminação passa por uma metabolização através de enzimas, dextranase, que se encontra presente em diversos órgãos do corpo humano como fígado, rins ou cólon.^{9 24,82}

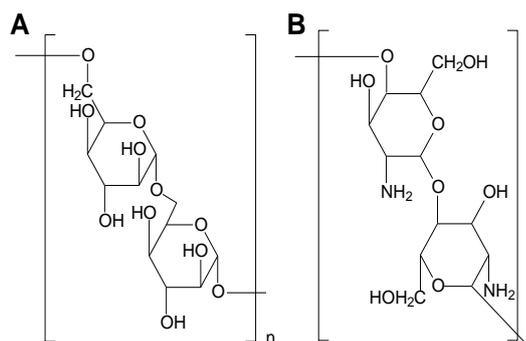


Figura 3.5. Estruturas dos polissacarídeos dextrana (A) e quitosana (B).

As SPIONs revestidas com dextranas têm sido desenvolvidas desde 1978, a partir do trabalho publicado por Syusaburo e colaboradores⁸³, na qual as SPIONs foram produzidas em meio aquoso. Porém, as SPIONs preparadas por este método não são estáveis o suficiente devido à fraca adsorção da dextrana na superfície das NPMs. No método *in situ* desenvolvido por Molday⁸⁴, a dextrana foi funcionalizada após a estabilização de óxido de ferro por oxidação com periodato para criar mais grupos hidroxil e permitir a ligação dos grupos aminados de proteínas.

O efeito de redução de grupos de glicose terminais na formação e estabilidade das SPIONs revestidas com dextranas tem demonstrado ser importante para o tamanho de partícula, a estabilidade e as propriedades magnéticas. Para as dextranas de baixo peso molecular (< 10k Da), o processo de redução resultou numa diminuição de 10 vezes na proporção necessária de dextrana/ferro durante a formação das SPIONs com tamanhos menores de 20 nm.²⁴ Hong e colaboradores⁶⁰ usaram hidrazina como redutor e obtiveram as mesmas respostas, tamanhos de partículas menores e melhorias nas propriedades magnéticas. Xu e colaboradores⁸⁵ estudaram a relação de absorção da dextrana de diferentes pesos moleculares na superfície das SPIONs e observaram que quanto maior o peso molecular, menos dispersas tornaram-se as SPIONs. Os autores também mostraram que ao modificar a temperatura de reação de 60 °C para 90 °C, obtiveram uma maior cristalinidade e tamanhos menores de SPIONs (valores de 25 nm). As moléculas de dextrana podem ser desorvidas da superfície das SPIONs por aquecimentos acima de 120 °C ou em alta diluição. De modo a evitar isso, utiliza-se um agente reticulante, normalmente a epicloridrina.^{16,24}

Já a quitosana é um copolímero natural biocompatível e biodegradável obtido pela desacetilação da quitina em meio alcalino.^{71,86} É composta de unidades monoméricas 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose. O tratamento da quitina em meio alcalino e temperaturas próximas a 100 °C, resulta na desacetilação da quitina, sendo isso que determina as principais características da quitosana: o peso molecular e o grau de desacetilação (GD) (porcentagem de grupos NH₂ livres). Quando o GD da quitina alcança aproximadamente 50%, o polímero torna-se solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos (ácidos fracos). A solubilidade da quitosana está relacionada com a quantidade de grupos amino protonados (NH₃⁺) na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade desses grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e também maior a solvatação em água. A alta quantidade desses grupos permite modificações químicas de carboxilação, acilação, sulfonação, amidação, entre outros. A classificação da quitosana está relacionada à massa molecular, considerado de baixa (100 kDa), média (500 kDa) e elevada massa molecular (1.000 kDa).

Bhattacharya e colaboradores⁸⁷ realizaram a síntese de SPIONs com quitosana e uma posterior etapa de modificação de superfície com grupamentos amina, carboxila, tióis, com a proposta de obter um material bioativo. O método *in situ* utilizado por Unsoy e colaboradores⁸⁸ envolveu a coprecipitação de sais de ferro na presença de quitosana em meio ácido. A quitosana foi capaz de interagir com os grupos hidroxil presentes na superfície das SPIONs.

3.2.3.2. Polietilenoglicol

O PEG, também conhecido como óxido de polietileno (PEO), é sintetizado a partir da polimerização do polietileno em água e apresenta fórmula estrutural H(OCH₂CH₂)_nOH (Figura 3.6). Os PEGs são solúveis na maioria dos solventes orgânicos (benzeno, clorofórmio) e também em água, mas a solubilidade diminui com o aumento do peso molecular.^{70,89}

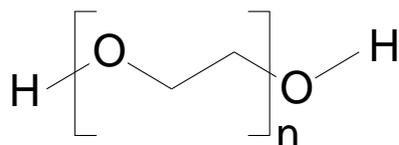


Figura 3.6. Estrutura do composto químico polietilenoglicol.

Diversas técnicas têm sido empregadas para obter SPIONs modificadas com PEG.^{90,91} García e colaboradores⁹² mostraram a formação de suspensões aquosas estáveis de SPIONs com PEG não modificado, sendo a interação dada entre os grupos éter do PEG com a superfície positiva das SPIONs. Rinaldi e colaboradores⁹³ sintetizaram NPMs monodispersas em água pelo método de decomposição térmica, trocando as moléculas de ácido oléico por cadeias de PEG-silano. Larsen e colaboradores⁸¹ também sintetizaram SPIONs com ácido oléico e posteriormente revestidas com PEG-silano, utilizando como agente de revestimento para MRI.

O processo de adição de PEG nas SPIONs também é chamado de peguilação (do inglês, *pegylation*), desenvolvido por Abuchowsky⁹⁴ que resulta na diminuição da hidrofobicidade da superfície do complexo formado. Estudos mostraram que em solução aquosa cada subunidade de etileno glicol está fortemente associada com duas ou três moléculas de água. O polímero PEG, juntamente com as moléculas de água associadas, atua como um escudo para proteger o composto ligado da degradação enzimática, depuração renal rápida e interações com proteínas de superfície celular, limitando, assim, os efeitos imunológicos adversos. Por isso, o PEG é utilizado amplamente para aumentar a solubilidade aquosa de fármacos hidrofóbicos. Um revestimento de PEG minimiza a absorção por fagocitose e aumenta o tempo de circulação no corpo. O PEG também atua como um espaçador para a posterior ligação de diferentes biomoléculas. O processo de peguilação demonstrou ser uma boa estratégia para minimizar a agregação de SPIONs em condições fisiológicas devido à hidrofiliidade e repulsão estérica das cadeias de PEG.^{95,96}

Diferentes grupos funcionais (fosfato, carboxilato, silano e dopamina ou seus derivados) podem ser usados para ligar PEG à superfície de SPIONs. Amstad e colaboradores⁹⁷ estudaram a influência dos grupos funcionais na estabilidade das SPIONs revestidas com PEG em condições fisiológicas e demonstraram que esses grupos

com alta afinidade de ligação podem introduzir um revestimento PEG de alta densidade e proporcionar elevada estabilidade coloidal.⁹⁵

3.2.3.3. Sílica

A sílica é geralmente escolhida como revestimento por formar facilmente partículas *core-shell*, com elevada estabilidade contra a coagulação e para sua transparência óptica. A modificação de sua superfície é fácil em virtude da existência de grupos silanol na camada de sílica que são compatíveis com vários grupos funcionais, como aminas, tióis ou carboxilas. Moléculas como proteínas, corantes podem ser ligados covalentemente à superfície da sílica. Isso permite diferentes aplicações, principalmente nas áreas biomédicas e áreas industriais, como no tratamento de efluentes.⁹⁸ Por exemplo, Mohammadi e colaboradores⁹⁹ sintetizaram SPIONs revestidas com sílica (SPION@SiO₂) funcionalizada com efedrina como um solvente para captura de íons de chumbo e cobre em águas. Yoon e colaboradores¹⁰⁰ utilizaram SPIONs de sílica para marcação de células estaminais para o rastreamento *in vivo* ou para o encapsulamento de corante. A sílica auxiliou na separação óptica entre as SPIONs e o corante, evitando a anulação de fluorescência do corante.

Dentre os processos de obtenção de NPs revestidas com SiO₂, o sol-gel é um método de síntese bastante utilizado na produção de materiais nanoestruturados inorgânicos e híbridos. SPIONs revestidas com sílica via o método sol-gel podem ser obtidas a partir de dois tipos de precursores: sais de metais alcalinos ou alcóxidos. Dentre os alcóxidos mais utilizados, destacam-se o tetraetilortossilicato (TEOS), o 3-aminopropilmetoxissilano (APTES) e 3-(trietoxissilil)propilsuccínico anidrido (TEPSA).^{62,65,101}

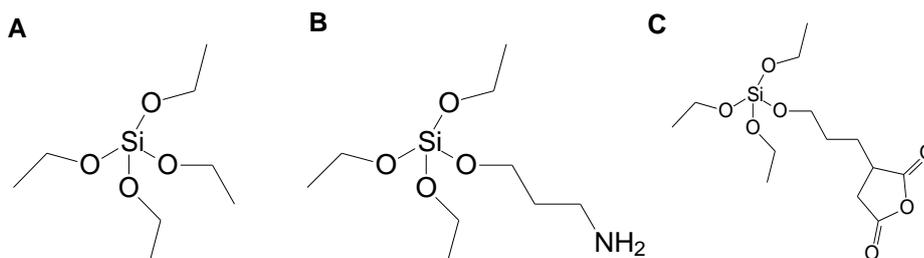


Figura. 3.7. Estruturas dos compostos químicos TEOS (A), APTES (B) e TEPSA (C).

A síntese por sol-gel permite o controle da homogeneidade e das características estruturais dos materiais obtidos, a partir do controle das condições da reação, tais como o pH do meio, os precursores, o catalisador e o solvente.⁵⁶ O método Stöber foi a primeira síntese de NPs puras de sílica pela reação de hidrólise e condensação. Usa-se organoalcoxissilanos em solução alcoólica e a amônia como catalisador, obtendo-se nanoesferas de sílica com uma distribuição de tamanho bastante homogênea. Stöber estudou a influência do tipo de álcool, meio básico, água e a quantidade do precursor alcoxissilano.¹⁰²

Mohammad-Beigi e colaboradores⁶⁵ estudaram o efeito do pH na síntese das SPIONs, a estabilização pós-síntese com grupos citratos e a influência do revestimento de sílica perante o processo sol-gel. Assim como Stöber, os autores descreveram que o uso de solução de amônia no controle do pH da reação diminuiu a dispersão das SPIONs e o uso de íons citrato como estabilizante tornou as SPIONs mais homogêneas, não influenciando no processo sol-gel. Estudos realizados por Deng e colaboradores¹⁰³ mostraram que o aumento da polaridade do álcool leva a formação de SPIONs revestidas com óxido de silício com morfologia mais irregular. O uso de metanol praticamente não permite o efeito de revestimento, enquanto etanol promove melhor revestimento à SPIONs (razão de EtOH/H₂O de 1 a 4). O aumento da quantidade de precursor gerou partículas maiores e mais monodispersas. As SPIONs de sílica muitas vezes são funcionalizadas, formando SPIONs híbridas. Por exemplo, pela adição de grupos amino para posterior bioconjugação.¹⁰⁴ Dimitri e colaboradores^{62,101} sintetizaram SPIONs revestidas com derivado de carboxissilano, o TEPSA. Os resultados demonstraram que a fina camada de TEPSA obtida revelou boa estabilidade coloidal às SPIONs e a presença de grupos carboxílicos facilitou a conjugação de grupos fluoróforos, melhorando o desempenho das SPIONs como agentes de contraste multimodais.

3.3. Imageamento biomédico assistido por nanopartículas

3.3.1. Princípios de ressonância magnética

Imagens por ressonância magnética (IRM; MRI – do inglês *magnetic resonance imaging*) é uma técnica de imagens médicas vinda dos princípios de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Baseia-se na detecção de sinais de RMN emitidos por prótons presentes no corpo em contato com um campo magnético externo.^{105,106}

Comparando com outras modalidades de imagens, como tomografia de emissão de pósitrons (*Pósitron emission tomography* – PET) e a tomografia computadorizada (*Computed tomography* – CT), o MRI tem as vantagens de não utilizar radiação ionizante, reduzindo o risco aos pacientes, e uma vasta possibilidade de manipulação do contraste melhorando a diferenciação de tecidos não-saudáveis e saudáveis, com boa resolução espacial.¹⁰⁶ Na medicina, MRI é usada para produzir imagens anatômicas de órgãos e também fornecer informações sobre o estado físico dos tecidos, vascularização e, em alguns casos, sua função. Há limitações a pacientes portadores de dispositivos eletrônicos, ou similares, bem como de visualização de tecidos mais densos, como os ossos¹⁰⁶. Contudo, atualmente a MRI têm sido um dos métodos mais poderosos para a investigação não invasiva da anatomia humana.^{107,108,109}

O torque exercido pelo campo externo no momento angular de *spin* resulta em um movimento de precessão. A frequência com que o núcleo precessiona sobre o campo magnético é conhecida como a frequência de Larmor (ω_0). A frequência de precessão é proporcional à intensidade do campo magnético externo:

$$\omega_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi}, \quad (3.3)$$

na qual ω_0 é a frequência de precessão (frequência de Larmor), γ é a razão giromagnética e B_0 a intensidade do campo magnético externo. O hidrogênio (^1H) possui um

alto momento magnético nuclear e é um elemento químico abundante no corpo humano; por isso, é o nuclídeo escolhido para a obtenção de imagens em MRI.¹⁰⁵

O movimento de precessão dos prótons ocorre em torno do eixo z, chamado de eixo longitudinal, que é dado pela direção do campo magnético aplicado (B_0). O plano xy é chamado de plano transversal. Os *spins* remanescentes dos cancelamentos formam uma componente de magnetização residual (M_z) (Figura 3.8A). Os momentos magnéticos individuais precessionam no plano transversal, sem ter coerência de fase entre eles, portanto a magnetização em M_x e M_y são iguais a zero, não havendo magnetização no plano xy. Um segundo campo magnético (B_1) de curta duração pode ser usado para reorientar o vetor de magnetização (Figura 3.8B). Ao aplicar um pulso de radiofrequência ressonante, variável com o tempo, perpendicular a B_0 e oscilando em ω_0 , os prótons mudam seu nível de *spin*, formando coerência de fase aos *spins* no plano xy. Um pulso de 90° (B_1 , ao longo do eixo x) traz o vetor de magnetização ao plano xy. A partir do instante em que o pulso de radiofrequência é desligado, o sistema excitado dos *spins* relaxa e volta ao seu estado de equilíbrio, reemitindo a radiofrequência que é captada através de correntes induzidas em bobinas receptoras no equipamento. O processo através do qual os *spins* dos prótons voltam para o seu estado original, é referido como relaxação magnética nuclear.^{105,110}

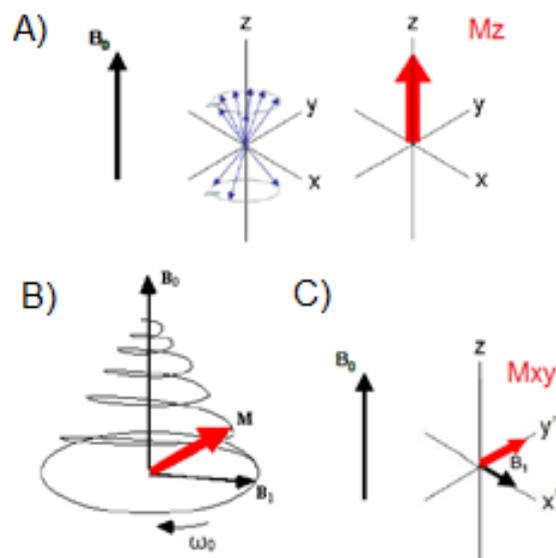


Figura 3.8. Conjunto de prótons com momento magnético líquido na presença de um campo magnético externo B_0 (A). Momento magnético precessionando em torno do B_0 , na frequência de Larmor (ω_0) (B). Segundo campo externo aplicado a 90° perpendicular ao B_0 , oscilando no plano M_{xy} (C) (adaptado da ref. 33).

3.3.1.1. Relaxação nuclear

A relaxação nuclear é o processo na qual os *spins* excitados retornam ao estado de equilíbrio devido a liberação de energia para o ambiente. O efeito de relaxação dos *spins* é devido a trocas de energia entre *spins* (*spin-spin*) e entre os *spins* e suas vizinhanças (*spin-rede*), fazendo com que o vetor de magnetização volte a orientar-se paralelamente ao B_0 (equilíbrio). Esses dois processos são denominados relaxação transversal (T2) e relaxação longitudinal (T1).^{105,111,110}

A relaxação longitudinal (T1), ou *spin-rede*, é o retorno da magnetização do plano xy ao estado inicial de equilíbrio ao longo do eixo z. Por definição, T1 é o tempo necessário para a magnetização longitudinal recuperar 63% do seu valor inicial. Essa recuperação segue em processo exponencial com uma constante de tempo (T1), que quantifica a rapidez do acoplamento dipolar dos momentos de prótons para o meio envolvente, descrito na Equação 3.4.^{106,110}

$$M_z(t) = M_0 \left(1 - e^{-t/T_1}\right) + M_z(0)e^{-t/T_1} \quad (3.4)$$

O termo *spin-rede* refere-se ao fato de que esse próton excitado (o *spin*) transfere sua energia para seu ambiente (a rede). Essa transferência de energia pode ser induzida pela presença de algum movimento molecular de vibração ou rotação na vizinhança do próton com uma frequência ω_1 equivalente a frequência ressonante de ω_0 . Quanto mais próximo for o valor de ω_0 de ω_1 , mais eficiente é a transferência de energia para a rede e o retorno dos prótons ao equilíbrio.^{106,110}

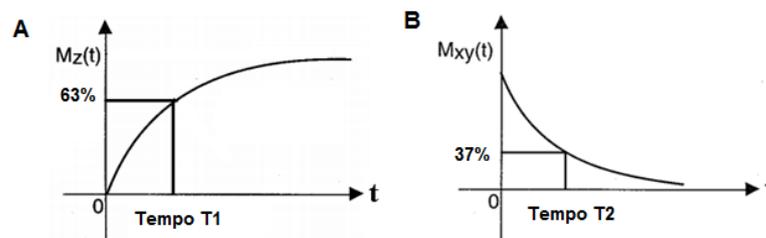


Figura 3.9. Gráficos da recuperação da magnetização longitudinal em função do tempo (A) e do decaimento da magnetização transversal em função do tempo (B) (adaptado da ref. 111).

A relaxação transversal (T2), ou *spin-spin*, é o processo necessário para que a componente transversal de M_{xy} decaia 37% do seu valor inicial, através de processos irreversíveis. Após o pulso de 90° , os momentos magnéticos individuais dos *spins* terão coerência de fase (Figura 3.10B). Com o tempo, essa coerência de fase desaparece devido as interações magnéticas com outros prótons nos tecidos e o valor de magnetização no plano xy diminui à zero. Portanto, o relaxamento *spin-spin* refere-se a essa transferência de energia de um próton excitado para outro próton próximo e a energia absorvida permanece como excitação de *spin*, ao invés de ser transferida para o ambiente como o processo de relaxação T1.^{106,110}

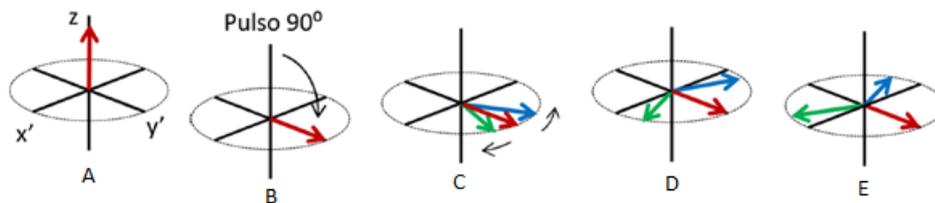


Figura 3.10. Magnetização M_z orientado paralelo com o B_0 (A). Rotação da magnetização para o plano M_{xy} após o pulso de radiofrequência de 90° (B). Defasagem dos *spins* individuais (C). Decaimento da M_{xy} devido à defasagem dos *spins* individuais (D). Decaimento completo da M_{xy} (E) (adaptado da ref. 111).

A relaxação no plano xy é relativamente rápida em relação a relaxação no plano z, e é descrita de acordo com a Equação 3.5.^{105,111,110}

$$M_{xy}(t) = M_{xy(0)} e^{-t/T_2} \quad (3.5)$$

Existem duas causas principais para a perda de coerência de fase no plano xy. A primeira é o campo magnético dos próprios *spins* adjacentes que flutua devido a vibrações ou rotações moleculares (interação *spin-spin*) e a segunda seria pela não homogeneidade do campo magnético local, aumentando mais a relaxação no plano xy e acelerando o decaimento do sinal.^{105,106} Devido a esse segundo processo, foi definida outra constante de tempo, denominada T_2^* , a qual descreve um tempo de relaxação menor, seguindo a Equação 3.6:

$$\frac{1}{T2^*} = \frac{1}{T2} + \gamma\Delta B_0 , \quad (3.6)$$

onde $\gamma\Delta B_0$ representa a taxa de decaimento do sinal devido a não uniformidades do campo. De modo a compensar o decaimento do sinal devido as não-uniformidades de campo, pode ser usado uma sequência de pulsos *spin eco*.¹⁰⁶ A intensidade do sinal obtido por MRI depende dos parâmetros descritos pela Equação 3.7:

$$SI = k_{\rho H} \left(1 - e^{-TR/T1}\right) \cdot e^{-TE/T2} , \quad (3.7)$$

na qual k é a constante de proporcionalidade dependente do fluxo, perfusão e difusão, ρH é a densidade de *spins* da amostra (densidade de prótons), TR é o tempo de repetição (intervalo de tempo entre as repetições da sequência) e TE é o tempo entre o pulso de 90 ° e o máximo de amplitude no eco, e T1 e T2 são as velocidades de relaxação longitudinal e transversal.^{110,111}

Os tempos de relaxação podem ser utilizados para redefinir o contraste das imagens de MRI com o auxílio de uma sequência de pulso específico e o ajuste de seus tempos (parâmetros extrínsecos). Imagens ponderadas em T1 e T2 foram desenvolvidas para produzir diferentes tipos de contraste no tecido.¹¹¹

3.3.1.2. Agentes de contraste em imagens por ressonância magnética

As imagens de MRI podem ser definidas apenas modulando o contraste da imagem a partir das diferenças naturais dos tempos de relaxação T1, T2 e densidade dos prótons da água nos diferentes tecidos. No entanto, quando essa resolução não é suficiente, é necessária a administração de um agente de contraste (AC). Os ACs são compostos químicos que podem localizar-se em determinadas regiões anatômicas, a fim de melhorar a visibilidade das estruturas internas do corpo, diferenciando tecidos.¹¹² Os ACs são capazes de alterar as propriedades de relaxação dos prótons no tecido em que o agente se acumula, ocasionando um melhor contraste.¹¹²

Os agentes de contraste podem ser divididos em dois grupos: agentes positivos e agentes negativos. O contraste positivo aumenta o sinal ponderado em T1 nas imagens, encurtando T1, formando imagens mais claras. São predominantes em complexos de compostos com propriedades paramagnéticas, principalmente de metais de transição, como gadolínio (Gd^{+3}), manganês (Mn^{+2} , Mn^{+3}), ferro (Fe^{+2} , Fe^{+3}), lantânio (La^{+3}) e disprósio (Dy^{+3}).^{107,113,114}

Os agentes de contraste T1 a base de gadolínio são os mais utilizados, devido à presença de sete elétrons não emparelhados, alta relaxividade e um número de coordenação total igual a nove. Contudo, metais paramagnéticos não podem ser utilizados como agentes de contraste na forma totalmente iônica por apresentar altos níveis de toxicidade.^{107,115} Os agentes à base de gadolínio podem causar uma reação tóxica conhecida como fibrose sistêmica nefrogênica (FSN) em pacientes com problemas renais graves. Como consequência, para evitar a liberação de íons livres de gadolínio, é necessário usar compostos quelantes para formar estruturas de complexos estáveis, os quais usualmente são excretados de maneira intacta por vias metabólicas, reduzindo significativamente a toxicidade.^{107,112,116} Os quelatos de gadolínio como Gd-DTPA (*Magnevist®*, Schering AG, Alemanha), Gd-DTPA-BMA (*Omniscan®*, Amersham-Nycomed, Noruega), Gd-DO3A-HP (*ProHance®*, Bracco Imaging, Itália) e Gd-DTOA (*Dotarem®*, Guerbet SA, França), são agentes de contraste atualmente em uso clínico.^{107,114}

Já os agentes de contraste negativos diminuem o sinal ponderado em T2, ocasionando um encurtamento do tempo T2, formando imagens mais escuras. São predominantes em compostos que possuem propriedades ferromagnéticas e superparamagnéticas.^{115,116} Diversas proteínas contendo ferro (como ferritina e hemoglobina) produzem contraste endógeno de T2. As SPIONs geram efeitos em T2 particularmente potentes e já estão sendo usadas como agentes de imagens anatômicas e moleculares.^{112,116,117} A maioria dos agentes de contraste SPIONs possuem um núcleo com tamanhos de 5 a 20 nm com um revestimento biocompatível e inerte, tornando-os solúveis em meio aquoso. Os núcleos possuem propriedades superparamagnéticas e, conseqüentemente, maior relaxividade em comparação às substâncias paramagnéticas, devido seus momentos magnéticos serem maiores quando expostas a um campo magnético.^{115,116,117}

Os agentes de contraste superparamagnético ultra-pequenos (*ultra-small superparamagnetic iron oxide nanoparticles* - USPIOs) são preparados por fracionamento de tamanho de óxidos de ferro maiores e heterogêneos. Um subconjunto destes contém apenas um único cristal de óxido de ferro e são referidos como NPs de óxido de ferro mononucleares (MIONs). Essas partículas são geralmente revestidas com polissacarídeos ou PEG, e com diâmetros de partícula totais de 20-50 nm.¹¹²

Como as partículas são eficientemente eliminadas pelas células reticuloendoteliais (RES), as partículas de óxido de ferro foram avaliadas como agentes do sistema RES para imagens do fígado, baço, linfonodos e bacia (uso oral); e para imagens de perfusão de cérebro, miocárdio e rim; angio-RM; e imagiologia vascular tumoral. No entanto, uma nova geração de partículas USPIOs com tamanhos inferiores a 10 nm também foi reportada como tendo excelentes propriedades de aumento de T1, dependendo da sequência de TE e TR utilizada no equipamento.^{107,116}

A capacidade intrínseca de um agente de contraste afetar os tempos de relaxação T1 e T2 é denominada de relaxividade, r_1 e r_2 , respectivamente. A relaxividade (r_i) é definida como a capacidade de uma solução 1 mM de agente de contraste aumentar a taxa de relaxação dos prótons da água (diminuir os tempos de relaxação T1 e T2) e expressa em unidade de $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (ou $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), definida por:

$$\frac{1}{T_{i,obs}} = \frac{1}{T_{i,p}} + \frac{1}{T_{i,d}} = r_i[M] + \frac{1}{T_{i,d}} \quad i = 1, 2, \quad (3.8)$$

na qual $T_{i,obs}$ é o tempo de relaxação longitudinal ($i=1$) e transversal ($i=2$) observados, $T_{i,d}$ e $T_{i,p}$ são as contribuições diamagnética e paramagnética dos tempos de relaxação nucleares, respectivamente, M é a concentração das espécies paramagnéticas ou superparamagnéticas (mM ou $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) e r_i é a relaxividade longitudinal (r_1) ou transversal (r_2).¹¹²

A razão r_2/r_1 é um indicador das propriedades de relaxação para um agente de contraste e é usada para classificá-lo. Os agentes T1 têm geralmente valores de razão r_2/r_1 próximos de 1-2, enquanto que os agentes T2 normalmente têm valores de razão r_2/r_1 igual ou maior que 5.^{112,116}

De maneira geral, as variações nas taxas de relaxação surgem devido a campos magnéticos flutuantes gerados pelo próprio agente de contraste. Em baixas concentrações (<10 mM), as interações entre as próprias moléculas de agente de contraste são negligenciáveis e observam-se taxas de relaxação do solvente que variam linearmente com a concentração do agente de contraste.¹¹⁶

3.3.2. Princípios de Fluorescência

A absorção e emissão de luz são causadas por transições dos elétrons entre níveis de energia. Ao chegar ao estado eletrônico excitado, a dissipação de energia no átomo ou molécula pode ocorrer por diferentes mecanismos de desativação, incluindo processos de transição não radiativo, processos radiativos (com emissão de luz) ou reações fotoquímicas. Nos processos radiativos (Figura 3.11), responsáveis pela emissão de luz, quando a energia é reemitida a partir do primeiro estado singlete excitado (S_1) após conversão interna entre níveis excitados, o fenômeno corresponde a fluorescência, e as transições eletrônicas responsáveis ocorrem entre os estados de mesma multiplicidade e não envolvem mudança de *spin* eletrônico. Também pode ocorrer transições menos prováveis singleto-triplete correspondentes a intensidade de fosforescência.^{118,119} A diferença de comprimento de onda do fóton de excitação e do fóton emitido é chamada de deslocamento de Stokes.

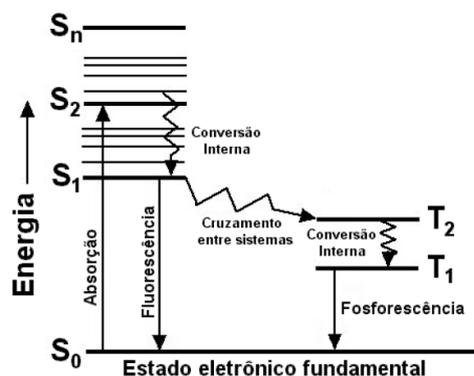


Figura 3.11. Diagrama de Jablonski (adaptado da ref. 120).

Diversas moléculas absorvem radiação no ultravioleta ou visível, porém poucas apresentam o mecanismo de fluorescência.^{115,118} Contudo, alguns fatores são importantes para que ocorra o mecanismo de fluorescência em moléculas, tais como: a rigidez da molécula, para que tenha menor perda de energia não radiativa, o que leva ao aumento de transições radiativas; a estrutura e planaridade da molécula, a conjugação de elétrons pi, grupos funcionais substituintes. Os corantes fluorescentes (fluoróforos) normalmente contém grupos aromáticos conjugados, moléculas planares ou cíclicas com várias ligações π conjugadas. Alguns fatores podem ocasionar desativação da molécula excitada, como a temperatura, o pH e a concentração e tipo de solvente.^{118,118}

3.3.2.1. Fluoróforos

Moléculas com propriedades fluorescentes podem ser usadas como ferramenta em diversas áreas, como em técnicas analíticas, ensaios de imunofluorescência, em estudos de estrutura e dinâmica da matéria, ou em estudos de sistemas vivos a nível molecular.¹²¹ Uma sonda fluorescente é um fluoróforo concebido para responder a um estímulo específico ou para ser direcionado a uma região específica de uma amostra biológica.^{118,122 123}

Um fluoróforo eficaz para aplicações biomédicas tem de apresentar uma boa intensidade luminescente e um espectro de emissão livre de interferências causadas pelos emissores de substâncias presentes no material analisado. Um elevado desvio de Stokes é uma característica interessante para uma sonda fluorescente, pois permite uma melhor separação da luz da excitação e da luz reemitida pela amostra.^{80,47,124} Na faixa no NIR com comprimentos de onda entre 600-900 nm é caracterizada por baixa absorção de tecido e, portanto, poderia também ser adaptada para transiluminação biológica e imagens de refletância.¹¹⁵

Os compostos luminescentes podem ser constituídos por materiais orgânicos como hidrocarbonetos aromáticos (naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno, etc), isotiocianato de fluoresceína (FTIC),¹²⁵ rodaminas, derivados de cumarina¹²⁶, difenilpolíenos, pontos quânticos⁶³, benzoxazóis^{127,128}, benzotiazóis^{129,120,130}, aminoácidos (triptofano, tirosina, fenilalanina),⁴² entre outros. Também podem ser por compostos

inorgânicos, tais como íons lantanídeos (Eu^{+3} , Tb^{+3})¹¹³, ou composto organometálico como complexos de rutênio ($\text{Ru}(\text{bPy})_3$)¹¹⁸. Proteínas de origem natural são também utilizadas como produtos de genes para monitorizar a expressão gênica ou substituindo o gene alvo.^{118,131,132} O sistema mais conhecido é a proteína fluorescente verde (GFP), presente na água-viva (*Aequorea Victoria*), utilizado como marcador em estudo de ensaios celulares para tecidos.¹³³ Outra proteína fluorescente isolada de fonte natural é a proteína fluorescente vermelha (dRFP) do coral *Discosoma*.¹¹⁵ Outra classe de compostos fluorescentes é por transferência protônica ESIPT (*Excited-state intramolecular proton transfer*).

3.3.2.2. Derivados de benzotiazóis

Os benzotiazóis são compostos orgânicos contendo heterociclos aromáticos ligados ao anel tiazol (Figura 3.12). Esses compostos são comumente sintetizados a partir da condensação de aminotiofenóis com aldeídos, ácidos carboxílicos ou cloretos de ácido.¹²⁰ É utilizado como molécula de partida para a síntese de estruturas maiores, normalmente bioativas. A presença do aromático o torna uma molécula relativamente estável, tendo locais reativos que permitem posterior funcionalização.

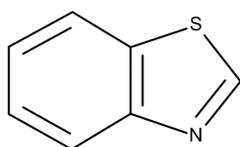


Figura 3.12. Estrutura química do benzotiazol.

Nos anos 50, diversos derivados do 2-aminobenzotiazóis e do 2-arilbenzotiazóis foram estudados por possuírem atividade biológica. Devido a isso, constituem a base de diversos fármacos em aplicações terapêuticas, como tratamento de inflamações, fungos, malária, tuberculose, tumores.^{134,135} Com a descoberta do *Riluzole* (6-trifluorometoxi-2-benzotiazolamina) em mecanismos bioquímicos de interferência na neurotransmissão de glutamato, diversos benzotiazóis vem sendo estudados como

inibidores de atividade bacteriana e viral^{136,137}, e principalmente em estudos de desordens neurodegenerativas.^{129,138} Verificou-se até então que os benzotiazóis possuem grande atividades biológicas.^{134,135}

A molécula 2-(2'-hidroxifenil)benzazol exibe duas bandas de emissão e é conhecido por ser altamente sensível à natureza do microambiente circundante do núcleo fluorogênico.^{120,121} São corantes em que a desativação do estado excitado ocorre através de uma reação de transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT, do inglês, *excited state intramolecular proton transfer*).

O mecanismo ESIPT é descrito, em solventes apolares e apróticos, o isômero conformacional enol-cis, de maior predominância estado fundamental, possui uma forte ligação de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio fenólico e o átomo de nitrogênio (Figura 3.13). A excitação dessa molécula gera o enol-cis excitado, sendo que sucessivamente se converte ao tautômero ceto excitado através da transferência intramolecular do hidrogênio fenólico para o átomo de nitrogênio.^{120,121,127}

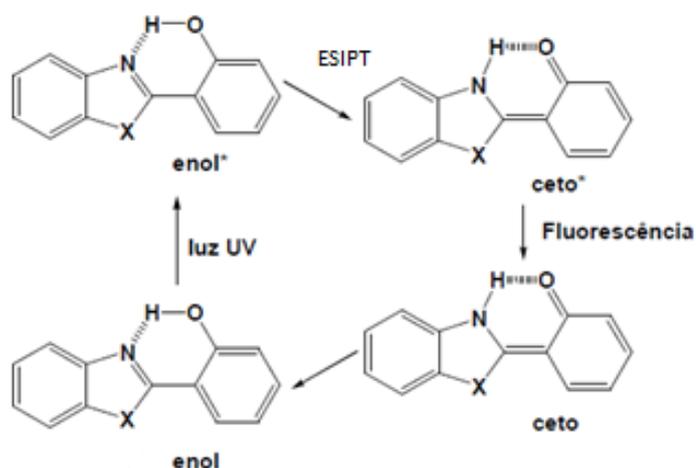


Figura 3.13. Mecanismo ESIPT de HBT (adaptado da ref. 120).

Em relação ao uso de benzotiazóis em doenças neurodegenerativas, existem diversos agentes de ligação específicos para as placas beta-amiloides (β -amiloides), presentes em pacientes que possuem a Doença de Alzheimer (DA). Esses agentes de ligação são derivados de compostos aromáticos como naftaleno, benzotiazol, estilbeno ou outros derivados homo ou heterocíclicos, que contenham um grupo doador de elétrons em um dos anéis aromáticos. A preferência por 2-arilbenzotiazóis baseia-

se na sua semelhança estrutural com a Tioflavina T (ThT), marcador eficiente para identificar as placas β -amiloide. Como a ThT é carregada positivamente, ela é incapaz de penetrar na barreira do cérebro-sangue, e por esse motivo, o desenvolvimento de derivados neutros da ThT ainda é um objeto de pesquisa. Outros compostos, análogos usados para detecção de placas β -amiloides em exames histopatológicos, tais como Crisamina G, Vermelho do Congo e estirilbenzenos, não são adequados como agentes marcadores para as placas β -amiloides, devido à limitada captação no cérebro depois de injeção intravenosa.¹³⁹ Para alcançar uma elevada afinidade e penetração no cérebro, normalmente utilizam-se compostos neutros, pequenos e lipofílicos.¹⁴⁰

Os derivados do 2-arilbenzotiazóis também podem ser ligados a radionuclídeos de meia-vida curta, como flúor-18 ou carbono-11, formando radiofármacos, radiotraçadores utilizados em Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET).¹⁴¹ Entre os radiofármacos conhecidos para o diagnóstico da DA, destacam-se o composto marcado (¹⁸F)-2-(1-(2-(N-(2-fluoroetil)-N-metilamino)naftaleno-6YL)-etileno)malononitril, conhecido por (¹⁸F)FDDNP¹⁴², e o composto (¹¹C)-2-(4-(metilamino)fenil)-6-hidroxibenzotiazol, conhecido como (¹¹C)-6-OH-BTA-1, derivado do 2-arilbenzotiazóis.¹²⁹ Esse último, conhecido por (¹¹C)-PIB, é considerado padrão ouro no diagnóstico da DA devido à capacidade de atravessar rapidamente a barreira hematoencefálica e ter elevada seletividade às placas β -amiloide.^{129,143,144}

3.3.3. Nanopartículas magnetofluorescentes

Nos últimos anos, nanopartículas multifuncionais contendo metais (Au, Ag, Fe, etc), com propriedades magnéticas com componentes fluorescentes, como pontos quânticos (QDs) ou corantes orgânicos, estão sendo investigados como sistemas versáteis para diagnóstico e terapia de doenças.¹⁴⁵ Atualmente combinações complementares de imagens foram desenvolvidas, incluindo MRI/óptica. Cada modalidade de imagem (óptica e ressonância magnética) tem suas próprias limitações, mas a combinação de duas técnicas formando uma imagem bimodal pode melhorar a qualidade diagnóstica de tumores.¹⁴⁵ A combinação de ressonância magnética e imagem óptica está sendo bastante estudada ultimamente, devido ao fato de ambas serem

complementares e amplamente utilizadas em práticas clínicas. Por exemplo, o imageamento óptico pode fornecer detalhes funcionais de eventos moleculares usando diferentes sondas fluorescentes com alta sensibilidade, mas fornece informações anatómicas insuficientes.¹⁴⁶

Para combinar imagens óticas e de MRI, as SPIONs são normalmente conjugadas com corantes fluorescentes.^{25,145} Na literatura, as SPIONs reticuladas (do inglês, *crosslinked iron oxide nanoparticles*-CLIO) marcadas com um corante fluorescente no infravermelho próximo (NIR), a cianina Cy5.5 são usadas para imagens de linfonodos.^{16,147}

Recentemente, NPs heteroestruturadas compostas de ouro e óxido de ferro foram conjugadas com o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e complexos com európio, aumentando a eficiência de fluorescência. Em comparação com a conjugação direta de corantes fluorescentes, a encapsulação de NPs em corantes fluorescentes dentro da casca de sílica tem várias vantagens. A matriz de sílica protege os corantes de mecanismos de *quenching* (anulação da fluorescência) e a fotoestabilidade pode ser reforçada. Além disso, a encapsulação de múltiplos corantes leva à amplificação de sinais de fluorescência.

Pinheiro e colaboradores²³ produziram nanosondas bifuncionais, utilizando estruturas núcleo-casca de SPIONs com óxido de silício e polieletrólitos de polietilenoimina (PEI), acoplado a FITC para estudos em células de neuroblastos. Estruturas do tipo núcleo-casca aumenta o efeito de contraste em MRI, assim como os sinais de fluorescência. Chekina e colaboradores¹²⁵ também produziram SPIONs bifuncionais de silício e marcadas com FITC, testadas em células tronco mesenquimais. Yoon e colaboradores¹⁰⁰ sintetizaram SPIONs com óxido de silício a partir de sílica funcionalizada com fluoresceína e rodamina B, ambas com agrupamento amina como marcadores biológicos de proteínas. Santra e colaboradores¹⁸ co-encapsularam o corante lipofílico dialquilcarbocianina, que emite no NIR, e o fármaco anticancerígeno Taxol enxertado numa matriz polimérica de poli(ácido acrílico) como também sonda bifuncional e direcionadas para terapia do câncer.

Ao invés de corantes orgânicos, os pontos quânticos são NPs de semicondutores fluorescentes inorgânicos. Essas NPs surgiram como novas sondas ópticas com vantagens sobre os corantes orgânicos, devido ao elevado rendimento quântico, ao espectro de absorção mais amplo e grande deslocamento de Stokes, e a excelente

fotoestabilidade e estabilidade química. Contudo, sua toxicidade devido ao uso de metais pesados ainda é uma grande preocupação e limitante para as aplicações *in vivo*. As NPs acopladas a lantanídeos apresentam o fenômeno de conversão ascendente de energia (do inglês, *upconverting nanoparticles* - UCNP), sendo atualmente uma nova classe de materiais com um potencial de aplicação em sondas de imagem óptica para o diagnóstico e tratamento de doenças. Ao contrário dos fluoróforos convencionais, os UCNPs emitem luz visível de alta energia quando excitados na região do NIR, em que a absorção sequencial de dois ou mais fótons permite a emissão de um fóton único com comprimento de onda menor. O processo em UCNP é tão eficiente que uma única partícula pode ser detectada.^{145, 148}

3.4. Nanotoxicidade

3.4.1. Toxicidade das nanopartículas de óxido de ferro

Devido ao uso crescente das NPs em diversos setores industriais nas últimas décadas, é extremamente importante determinar quais os possíveis impactos e riscos relacionados a exposição das NPs em seres vivos e também ao meio ambiente. O conhecimento atual da toxicologia de materiais em escala macroscópica (*bulk*) não pode prever de forma confiável a toxicidade de nanomateriais e suas respectivas rotas e mecanismos moleculares, biodistribuição, degradação, eliminação.^{149,150,151}

As propriedades das NPs, como tamanho e forma, também são importantes na citotoxicidade. Diferentes estudos relativos à dependência da toxicidade conforme o tamanho e a forma das NPs demonstraram os impactos biocinéticos, como alteração de absorção celular, adsorção de proteínas, entre outros. Possivelmente, essas alterações são efeitos da elevada área superficial presente nas NPs. Portanto, a toxicidade e a biocompatibilidade das NPs em suas diferentes formulações devem ser avaliadas, com ênfase na compreensão das propriedades físico-químicas que estão relacionadas às respostas biológicas adversas e desconhecidas.¹⁵²

O sistema imunológico tem como função principal a defesa contra a entrada de diferentes compostos. As células dendríticas apresentando antígenos, macrófagos e

outras células fagocíticas podem reconhecer e responder a estímulos externos, incluindo as NPs.²⁷ A superfície das NPs pode ser revestida por diversas biomoléculas, quando no primeiro contato com esses fluidos biológicos, principalmente, pela interação com células influenciadas por proteínas/biomoléculas presentes na membrana plasmática, que circundam as NPs instantaneamente ao entrar em contato com o plasma. A ligação com essas proteínas (formando proteínas corona) e opsonização são processos adicionais que alteram as propriedades da superfície das NPs e, portanto, sua absorção. Dependendo da classe de NPs (poliméricas, metálicas, etc) e o fluido biológico de contato, apenas certas proteínas com afinidade à superfície das NPs podem se aderir e permanecer fortemente ligadas por um longo tempo.^{27,153}

Estudos experimentais já mostraram que as NPs são incorporadas na célula por endocitose. Uma vez que as NPs capturadas por células-alvo, são direcionadas para a via endossomal/lisossômica, e então degradadas. Certos tipos de NPs penetram diretamente na membrana das vesículas (ou células) e entram no citossol, onde podem induzir o estresse oxidativo. Além disso, pode ocorrer a interação com organelas, por exemplo, com mitocôndrias ou núcleos celulares (Figura 3.14).

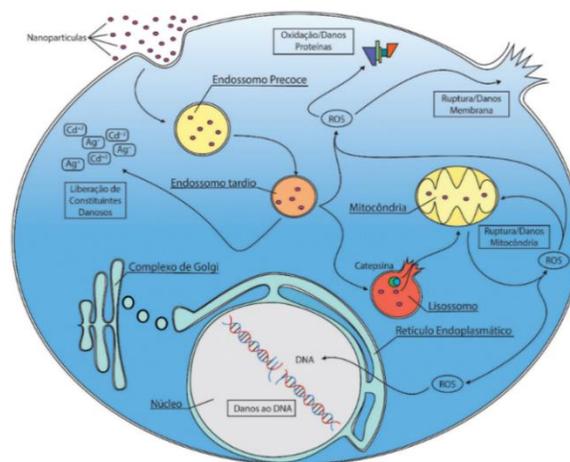


Figura 3.14. Possíveis efeitos tóxicos celulares provocados pela presença de nanopartículas (adaptado da ref. 150).

A presença de junções ocluidoras evita que as NPs maiores que 2 nm sejam eliminadas da circulação. Já as NPs maiores (>100 nm) são encontradas, principalmente, no fígado e no baço, enquanto partículas menores (> 50 nm) podem extravasar

para a medula óssea. Da circulação, as NPs são eliminadas pelo fígado, baço e através da filtração glomerular. O mecanismo de absorção depende das características físico-químicas intrínsecas das NPs (tamanho, forma, composição, estabilidade), bem como na via de exposição, a reatividade química e a composição desempenham um papel importante na estabilidade da NPs. Enquanto algumas NPs são rapidamente degradadas, outras podem permanecer no corpo por um longo tempo e sua acumulação no corpo pode causar sérios danos.^{149,154} Diversos estudos demonstraram efeitos tóxicos das NPs, tais como inflamação, estresse oxidativo, apoptose^{155,156}, bem como alterações na expressão gênica.¹⁵⁷

As SPIONs em contato com o plasma sanguíneo são capturadas, principalmente, pelo sistema reticuloendotelial (RES) presentes no fígado e no baço. Dentro das células são degradadas pelos lisossomos, podendo liberar íons de ferro, o que leva a alterações do metabolismo comum do ferro no corpo. O ferro livre pode ser armazenado na célula por proteínas, como a ferritina. No entanto, quando sua capacidade de armazenamento de ferro é excedida, a célula entra em um estado de sobrecarga e pode desencadear estresse oxidativo (ROS), resposta inflamatória e levar à necrose/apoptose.¹⁵⁴ Atualmente diversos estudos foram realizados para investigar seus potenciais efeitos tóxicos.¹⁵⁶ Estudos clínicos e experimentais indicaram que devido ao tamanho pequeno das SPIONs e elevada superficial, aumenta a geração de ROS. A geração de ROS induzida pelas SPIONs afeta a sinalização celular em três estágios: primeiro um baixo nível ROS aumenta a transcrição de genes de defesa através do fator de transcrição *nrf2*; segundo nível mais elevado ativo a sinalização de inflamação através do *NFkB*; e níveis muito altos estão relacionados com a ativação de caminhos apoptóticos e necrose. Essa alteração nas vias de sinalização celular está também associada aos efeitos cancerígenos das NPs.^{15,158}

Os primeiros estudos toxicológicos em SPIONs foram relatados com NPs revestidas com dextrana, com principal foco dos estudos nos mecanismos celulares envolvidos após exposição. Os autores relataram que uma variedade de células pode ser eficientemente rotulada com as SPIONs por incubação e serem utilizadas como agentes de contraste para ensaios de rastreamento celular *in vivo*.^{26,159} Por exemplo, Mueller e colaboradores¹⁶⁰ relataram que alguns tipos de SPIONs apresentaram alta toxicidade. Berry e colaboradores^{161,162} mostraram que SPIONs não revestidas ou revestidas com dextrana podem causar diferentes graus de morte celular e são capazes

de induzir a formação de vacúolos e disrupções no esqueleto de fibroblastos. Soenen e colaboradores¹⁶³ estudaram quatro tipos de SPIONs, com diferentes revestimentos e em uma variedade células (progenitoras neurais, feocromocitoma de PC12 e endoteliais de sangue humano). Os autores avaliaram o efeito das SPIONs sobre a morfologia celular, a proliferação, espécies reativas de oxigênio, funcionalidade, viabilidade e homeostasia celular. Os resultados revelaram que para os diferentes tipos de SPIONs os valores de concentração segura para toxicidade variaram, aproximadamente, de 67-18 pgFe/kg, dado extremamente dependente do tipo de SPIONs. Shukla e colaboradores¹⁶⁴ estudaram SPIONs revestidas com quitosana e avaliaram o efeito do revestimento sobre a estabilidade e toxicidade utilizando células de carcinoma cervical humano (HeLa), carcinoma pulmonar humano (A549), rim embrionário humano (Hek293) pelo ensaio de MTT (ensaio de brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio), juntamente com o estudo de integridade, potencial de membrana e da mitocondrial e produção de ROS. As SPIONs apresentaram formas esféricas, estáveis e também indicou que o uso da quitosana resultou na diminuição do dano celular e na produção moderada de ROS, diminuindo o impacto citotóxico em relação às SPIONs sem revestimento.

Desde então, uma variedade de estudos *in vitro* já foram avaliados em diferentes linhagens celulares, e cada uma revela um comportamento diferenciado, causa depende da dose e do tipo de SPIONs testada. Um pequeno resumo de ensaios de viabilidade celular de diferentes NPs está descrito na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Ensaio da toxicidade *in vitro* por MTT de SPIONs com diferentes revestimentos.

Tipos de célula	Revestimentos	Concentração SPIONs	Tempos de exposição	Resultados	Referências
Fibroblastos	PEG	0-1 mg.mL ⁻¹	24 h	25% tóxicas (SPIONs; 250 µg/mL); não tóxicas para 99% (SPIONs-PEG)	165,166, 167,168
	Etilenoglicol	1 mg.mL ⁻¹	24 h	Não tóxicas	169
Pulmonar (A549)	Sílica	4 mg.mL ⁻¹	24 h	IC ₅₀ =4 mg/mL	170
Renal (Cos-7)	Tetrametilamônio	51 mg.L ⁻¹ - 1,3g/L	4 h	Não tóxicas	171
Macrófagos	Dextrana	1-10 mg.L ⁻¹	14 dias	Levemente tóxica na dose maior	160
Fígado (SMMC-7721)	Quitosana	0-123,5 mg.L ⁻¹	24 h	tóxica na dose maior	172
Fígado (BRL 3A)	Diversos metais	0-25 mg. L ⁻¹	24 h	Redução de 25% na viabilidade (250 mg.L ⁻¹)	173

3.4.2. Peixe zebra como animal modelo para toxicidade

O peixe zebra, *Danio rerio*, também chamado de zebrafish, foi primeiramente descrito por Francis Hamilton, em 1822. É classificado como um teleósteo, da família Cyprinidae. Na década de 1930, o peixe zebra foi bastante utilizado como modelo clássico de desenvolvimento e de embriologia. Os estudos iniciais basearam-se na combinação única da claridade óptica dos embriões e das larvas (permitindo a visualização *in vivo* de eventos biológicos) e na manipulação embriológica para fazer várias

observações importantes. O pesquisador George Streisinger iniciou estudos de técnicas de análise mutacional para investigar o desenvolvimento embrionário desse modelo.¹⁷⁴

O peixe zebra é naturalmente encontrado no sul e sudeste da Ásia.¹⁷⁵ Normalmente, seu tamanho é de 3-4 cm, facilmente adaptado a aquários, além de possuir baixo custo, em comparação a outros animais, alta taxa de fecundação, embriões transparentes (permite a observação e manipulação) e rápida maturação sexual (3-6 meses). Em 24 horas pós-fertilização (24 hpf), o eixo do corpo do animal já está consolidado e todas as células precursoras e tecidos do cérebro, olhos e coração estão formados. A embriogênese (desenvolvimento da fase embrionária) está completa por volta de 72 hpf, e a maioria dos órgãos internos como o intestino, fígado e rins estão completamente desenvolvidos. Após 72 hpf, ocorre a eclosão da larva, facilitando o acompanhamento dos processos de evolução em tempo real, principalmente genotoxicidade e teratogenia.¹⁷⁶ O rápido desenvolvimento do peixe zebra pode ser comparável ao desenvolvimento de um embrião humano de três meses. Sua conservação gênica é grande, o desenvolvimento do sistema nervoso, renal, cardíaco, avaliação de angiogênese, apoptose e respostas toxicológicas, tornando-o um animal modelo interessante para estudos do sistema biológico (Figura 315).¹⁷⁷

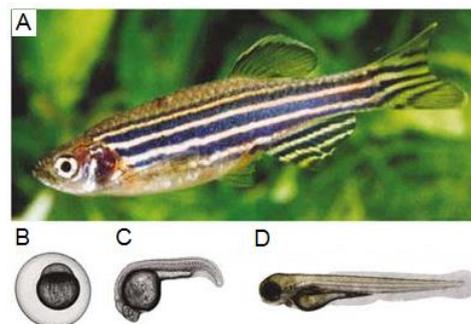


Figura 3.15. Imagens das diferentes fases de desenvolvimentos do peixe zebra. (A) peixe zebra na fase adulta, (B) 24 hpf, (C) 3 dpf e (D) 5 dpf (adaptado da ref. 174).

O peixe zebra possui sensibilidade a produtos químicos e é capaz de absorver de maneira rápida o que é adicionado na água e acumular em diferentes tecidos, principalmente no sistema nervoso central, importante para estudos farmacológicos e toxicológicos.^{174,178}

Uma maneira inicial de avaliar a toxicidade em NPs é empregar ensaios que utilizam cultura de células *in vitro*, porém não é possível obter os mesmos resultados para a complexidade de um sistema *in vivo*. Apesar de ensaio *in vitro* serem mais simples e econômicos, já foi demonstrado na literatura uma pequena divergência nos resultados entre a toxicidade *in vivo* e *in vitro* de SPIONs.¹⁷⁹

Atualmente, existe uma necessidade de modelos vivos que avaliem o grau de toxicidade de nanomateriais. Diferentes estudos já foram publicados envolvendo esse tema, tais como indicador de toxicidade e de estudos dos mecanismos metabólicos envolvendo NPs ouro^{180,181,182,183,184}, prata^{185,186}, cobre¹⁸⁷, titânio^{188,189}, sílica^{151,190}, zinco¹⁹¹, utilizando o peixe zebra, tanto em fase larval quanto em fase adulta.¹⁹² Portanto, como alternativa, o peixe zebra mostra-se como um modelo rápido e fácil de avaliar o potencial toxicológico de nanomateriais.

Em relação à toxicidade de SPIONs, Zhu e colaboradores¹⁹³ publicaram um dos primeiros trabalhos envolvendo embriões e larvas do peixe zebra em exposição às SPIONs puras. Os resultados mostraram que nas concentrações maiores que 10 mg.L⁻¹ de Fe provocaram toxicidade no desenvolvimento dos embriões, mortalidade, malformação e atraso na taxa de eclosão. O mesmo grupo também discute um protocolo eficaz para avaliar o potencial toxicológico das NPs.

Atualmente, poucos estudos descrevem a exposição de diferentes SPIONs em peixes zebra, principalmente estudos adicionais em relação aos efeitos tóxicos de SPIONs com diferentes revestimentos, bem estudos comportamentais.^{187,193,194,195,196}

Nosso grupo de pesquisa já vem trabalhando em colaboração, utilizando o peixe zebra para ensaios de nanotoxicidade, com foco nos efeitos no comportamento e perfil de expressão após a exposição às SPIONs.^{197,198}

4. MATERIAIS E MÉTODOS

No presente capítulo, serão apresentados os aspectos associados aos materiais e reagentes utilizados, procedimentos experimentais, técnicas de caracterização e equipamentos utilizados.

4.1. Materiais e reagentes

Na realização da parte experimental, foram utilizados reagentes sem nenhuma purificação prévia. As Tabelas 4.1 e 4.2 apresentam os reagentes e materiais utilizados, com suas respectivas especificações técnicas.

Tabela 4.1. Reagentes utilizados nas etapas experimentais.

Reagentes	Fórmula Molecular	Procedência
3-(trietoxisilil)propilsuccínico anidrido (TEPSA)	$C_{13}H_{25}O_6Si$	TCI
Ácido acético	CH_3COOH	Merck
Ácido clorídrico	HCl	Merck
Ácido nítrico	HNO_3	Sigma-Aldrich
Água ultrapura	H_2O	Sistema Milli-Q
álcool etílico 70%	CH_3CH_2OH	Merck
Álcool isopropílico	CH_3CHOCH_3	F. MAIA
Brometo de potássio	KBr	Merck
Tampão fosfato-salino (PBS)	NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4	Sigma-Aldrich
Citrato de sódio	$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	Merck
Cloreto de ferro III	$FeCl_3$	Riedel-de Haën
Cloreto de ferro II tetraidratado	$FeCl_2 \cdot 4H_2O$	Merck
Cloreto de ferro III hexaidratado	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	Merck
Cloreto de sódio	NaCl	Nuclear
Dextran T10	$H(C_6H_{10}O_5)_xOH$	Pharmacosmos
Dietilenoglicol (DEG)	$C_4H_{10}O_3$	Merck
Dimetilformamida (DMF)	C_3H_7NO	Sigma-Aldrich
DMEM (meio)	-	Thermo Fisher

Epícloridrina	C_3H_5ClO	Sigma-Aldrich
Etanol (EtOH)	C_2H_6O	Sigma-Aldrich
Hidróxido de amônio 25%	NH_4OH	Merck
Hidróxido de sódio	$NaOH$	Merck
hidróxido de tetrametilamônio (TMAOH)	$C_4H_{13}NO$	Sigma-Aldrich
N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimidahidrocloro - (EDC)	$C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$	Sigma-Aldrich
O-(2-amin.oetil)-O'-metilpolietileneglicol (Amino-PEG)	$NH_2(CH_2CH_2O)_nH$	Sigma-Aldrich
Peróxido de hidrogênio	H_2O_2	Merck
Quitosana (50-190 kDa)	$(C_6H_{11}O_4N)_n$	Sigma-Aldrich
Soro fisiológico (comercial)	$NaCl$	Lifar
Tetraetilortosilicato (TEOS)	$Si(OC_2H_5)_4$	Sigma-Aldrich
β-amilóide (1-42)	$C_{203}H_{311}N_{55}O_{60}S$	Sigma-Aldrich

Tabela 4.2. Equipamentos utilizados nas etapas experimentais.

Equipamento/utensílio	Modelo	Marca
Agitador tipo vortex	Vortex 1	IKA
Centrífuga	KC5 – 40 kHz	Kindly
Difratômetro de raio-X	7000	Shimadzu
Dispersão de relaxação magnética nuclear	Stelar	Mede
Espalhamento de luz dinâmico	Zetasizer - ZEN3600	Malvern
Espectroscopia na região do infravermelho	Spectrum Onde	Perkin Elmer
Espectroscopia por fluorescência	LS 55	Perkin Elmer
Estufa	Q317M	Quimis
Imagens por ressonância magnética	450 W	G&E
Liofilizador	Micromodulic-115	Thermo Fisher
Magnetômetro de amostra vibrante	EZ9	MicroSense
Micro-ondas	Mega MLS-1200	Milestone
Microscópio eletrônico de transmissão	JEM-2010	JEOL
Relaxometria nuclear	Minispect	Bruker
Sistema de purificação	Célula de agitação para 50 mL	Millipore
Tubos de ultrafiltração	Amicon 50 kDa	Millipore
Ultrassonificador	UltraSonic Cleaner	Unique

4.2. Procedimentos experimentais de síntese

Na primeira etapa desse trabalho, foram sintetizadas NPs compostas com o núcleo de óxido de ferro (NPOFe) e revestimentos de dextrana, quitosana, sílica e polietilenoglicol. Também foi realizada síntese dos derivados do benzotiazol e o seu acoplamento às NPs. Os procedimentos utilizados na preparação dessas amostras diferiram entre si e serão descritos no decorrer desse capítulo. As NPs obtidas foram caracterizadas quanto a sua morfologia, sua composição, suas propriedades magnéticas e ópticas, e toxicidade.

4.2.1. Nanopartículas de óxido de ferro sem revestimento

As NPOFe sem revestimento foram sintetizadas por duas rotas sintéticas: por coprecipitação e por poliol, descritas a seguir. A coprecipitação é um método convencional baseado em suspensões aquosas de óxido de ferro em meio alcalino. Esse método leva a produção de NPOFe que necessitam de um revestimento subsequente para assegurar a sua estabilidade em pH fisiológico. O método poliol é um método de síntese em alta temperatura com dietilenoglicol (DEG). Segundo os estudos de Caruntu e colaboradores, o DEG pode ser usado como solvente para a síntese e atuar como um agente de cobertura das partículas.^{199,200}

4.2.1.1. Rota de síntese por coprecipitação (NPOFe-C)

As NPOFe foram preparadas por coprecipitação de sais de ferro em meio alcalino, de acordo com o protocolo adaptado de Mohammad-Beigi e Digigow.^{65,104} Aproximadamente, 8,6 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 3,3 g de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ foram dissolvidos em 370 mL de água deionizada (previamente purgada com gás N_2). Então, 30 mL de NH_4OH foram adicionados vagarosamente, em constante agitação, ainda em fluxo de N_2 . Após, as NPOFe foram ultrassonificadas por 20 minutos, e lavadas sucessivamente com água através de decantação magnética. Devido à dificuldade de dispersão das NPs em água, as mesmas foram estabilizadas com íons citratos. Portanto, as NPOFe

decantadas foram redispersas em 50 mL de uma solução de citrato de sódio $7,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ e aquecidas a $80 \text{ }^\circ\text{C}$, em fluxo de N_2 , por 30 minutos. Por fim, o pH foi ajustado a 7 e as NPs estocadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Essas NPs foram denominadas de NPOFe-C.

4.2.1.2. Rota de síntese por poliol (NPOFe-P)

As NPOFe foram preparadas por rota poliol na presença de dietilenoglicol, de acordo com o protocolo adaptado de Forge.¹⁹⁹ Aproximadamente, 8,9 g de $\text{FeCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$ e 9,1 mL de solução de FeCl_3 foram misturados e homogeneizados, e então adicionado 250 mL de dietilenoglicol. O sistema ficou em agitação mecânica por 30 minutos, na temperatura de $170 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, 15 g de NaOH foram adicionados à mistura, ainda em agitação mecânica, e mantido assim por 1h. No término do tempo, esperou-se a solução de NPOFe chegar à temperatura ambiente para realizar a separação por decantação magnética. As NPs foram lavadas 5 vezes com uma solução de HNO_3 $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, também por decantação magnética. O sólido remanescente foi redisperso em 100 mL de água deionizada e deixado em agitação magnética por 18 h. A solução de NPs foi centrifugada a 10.000 rpm por 45 minutos para a decantação das NPOFe maiores. Por fim, o sobrenadante contendo as NPs menores foi extraída e estocada. Essas NPs foram denominadas por NPOFe-P.

4.2.2. Nanopartículas de óxido de ferro com dextrana (NPOFe-DX)

As NPOFe revestidas com dextrana foram preparadas de forma *in situ*, na qual a dextrana foi adicionada junto às soluções de sais de ferro, de acordo com o protocolo de Wunderbaldinger e Palmacci.^{201,202} Primeiramente, 9 g de dextrana foram dissolvidas em 30 mL de água, e 0,65 g de $\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$ foram adicionados na solução de dextrana em banho de gelo por 30 minutos. Posteriormente, 0,40 g de $\text{FeCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$ foi adicionado à mistura, ainda em banho de gelo e em fluxo de N_2 . Então, 10 mL de NH_4OH foi gotejado na solução e deixado em constante agitação por 90 minutos, entre $75\text{-}80 \text{ }^\circ\text{C}$. Após o término do tempo, esperou-se a solução de NPOFe chegar à temperatura ambiente e o excesso de dextrana foi eliminado com sucessivas lavagens

com água em tubos *Amicon* de 50 kDa (Millipore) e centrifugados a 4000 rpm, por 30 minutos. Foram adicionadas vagarosamente, na solução remanescente de NPOFe, 35 mL de NaOH 5 M gelado, em agitação magnética por 15 minutos, e logo adicionado mais 14 mL de epícloridrina para a reticulação da dextrana. Posteriormente, 60 mL de NH₄OH foram adicionados à mistura, anterior que ficou em agitação magnética por 24 h. Após, o NH₄OH remanescente foi removido por diálise, com o auxílio de uma membrana celulose de 10-12 kDa, submergindo-a em água destilada e a água trocada a cada 1h, por 9 vezes. Por fim, a solução de NPOFe foi purificada em tubos *Amicon* de 50 kDa com lavagens com água e centrifugadas a 3.500 rpm por 15 minutos. O produto resultante foi redisperso em tampão de citrato com pH igual a 8,3 e estocadas a 4 °C. Essas NPs foram denominadas por NPOFe-DX.

4.2.3. Nanopartículas de óxido de ferro com quitosana (NPOFe-QS)

As NPOFe revestidas com quitosana foram preparadas em meio de ácido acético, de acordo com o protocolo de Mohammadi-Samani.²⁰³ Primeiramente 21,6 mg de quitosana foram dissolvidas em 30 mL de ácido acético 0,1M. Então, 70 mg das NPOFe-C foram também dissolvidos em 30 mL de ácido acético 0,1 mol.L⁻¹ e colocado no ultrassom por 20 minutos. A solução de NPOFe foi gotejada na solução de quitosana e deixada em agitação magnética por 18 h. Após, a solução de NPOFe foi centrifugada a 3.600 rpm por 30 minutos. A solução de NPOFe foi purificada em tubos *Amicon* de 50 kDa, lavadas quatro vezes com água e centrifugada a 3.500 rpm por 30 minutos. Por fim, a solução final foi estocada a 4 °C. Essas NPs foram denominadas por NPOFe-QS.

4.2.4. Nanopartículas de óxido de ferro com derivados de polissilanos

4.2.4.1. Nanopartículas de óxido de ferro pela rota poliálcool com revestimento de polissilano TEPSA (NPOFe-T)

As NPOFe revestidas com uma fina camada de óxido de silício foi preparadas a partir do precursor polisilano 3-(trietoxisilil)propilsuccínico anidrido (TEPSA) em meio alcalino, de acordo com o protocolo de Bridot.⁶² As NPOFe-P foram solubilizadas em 50 mL de DMF e a água presente na solução foi removida em rotavapor a 80 °C, por 1h. Então, 7 mL de TEPSA 0,1 mol.L⁻¹ foram adicionados à solução de NPOFe, em constante agitação magnética, em refluxo a 100 °C. Após o término do tempo de refluxo, a solução de NPOFe foi precipitada em éter/acetona (50:50 v/v), e lavadas várias vezes com acetona. As NPs foram redispersas em 80 mL de água deionizada e o pH ajustado a 8,5 (hidróxido de tetrametilamônio). As NPOFe foram purificadas em uma célula de agitação com membranas de 30 kDa, e o sistema lavado cinco vezes com água. Essas NPs foram denominadas por NPOFe-T.

4.2.4.2. Nanopartículas de óxido de ferro pela rota poli-ol com revestimento de óxido de silício (NPOFe-P-SiO₂)

As NPOFe revestidas com óxido de silício foram preparadas pelo processo Stöber, a partir do precursor tetraetilortosilicato (TEOS) em catálise básica em meio alcóolico e partindo das NPOFe-P.²⁰⁴ A superfície das NPOFe-P foram primeiro ativadas por um tratamento ácido. Aproximadamente 2,0 mL de NPOFe-P foram misturadas em ácido cítrico 10 mmol.L⁻¹, em agitação por 20 minutos. As NPOFe foram precipitadas em acetona com auxílio de um ímã, e então redispersas em 12 mL de água deionizada, tendo o pH ajustado a 10 (hidróxido de tetrametilamônio). Uma mistura de 75 mL de etanol, 23,5 mL de água deionizada e 1,5 mL de NH₄OH ficaram em agitação magnética por 2 minutos e, então, a solução de NPOFe-P foi adicionada na mesma, que ficou por mais 5 minutos em agitação. Por fim, 850 µL de TEOS foi adicionado e o sistema ficou em agitação por 18 h. Após, a solução de NPOFe foi centrifugada duas vezes a 10.000 rpm, por 45 minutos. Foram realizadas diversas lavagens com etanol e o sólido remanescente foi disperso em água deionizada por 30 minutos no ultrassom. Essas NPs foram denominadas por NPOFe-P-SiO₂.

4.2.4.3. Nanopartículas de óxido de ferro pela rota coprecipitação com revestimento de óxido de silício (NPOFe-C-SiO₂)

As NPOFe revestidas com óxido de silício foram preparadas pelo processo Stöber, a partir do precursor tetraetilortosilicato (TEOS) em catálise básica em meio alcóolico, de acordo com o protocolo de Deng¹⁰³ e partindo das NPOFe-C. As NPOFe-C estabilizadas com íons citrato foram diluídas em 40 mL de água, dispersadas em 160 mL de etanol e 6 mL de hidróxido de amônia, sendo essa mistura homogeneizada em banho de ultrassom. A solução preparada foi deixada em constante agitação e 2 mL de TEOS foi lentamente gotejado à solução de NPOFe e deixada em agitação mecânica por 4h. A solução final de NPOFe foi centrifugada e lavada com etanol por diversas vezes. Por fim, as NPs decantadas foram secas à 80 °C. Essas NPs foram denominadas por NPOFe-C-SiO₂.

Paralelamente ao trabalho desenvolvido no período de doutorado, houve uma colaboração associada a um aluno de doutorado do curso de Pós-Graduação de Materiais Dentário-PUCRS, no Departamento de Odontologia Restauradora. O trabalho desenvolvido relacionou a adaptação da nossa síntese de NPs de óxido de silício, sem o óxido de ferro (NPs-SiO₂ puras), como o intuito de serem utilizadas para avaliar as propriedades mecânicas de gessos dentários após a adição dessas NPs em diferentes concentrações. Essa parceria resultou em um artigo mostrado no Anexo 1.

4.2.5. Nanopartículas de óxido de ferro com polietilenoglicol (NPOFe-PEG)

As NPOFe revestidas com uma fina camada de polietilenoglicol foram preparadas com o polímero amino-PEG, de acordo com o protocolo de Stanicki¹⁰¹, a fim de assegurar uma melhor estabilidade coloidal e solubilidade das NPOFe-T citadas anteriormente. Essas NPOFe foram preparadas com o polímero amino-PEG pela reação de acoplamento com EDC. Foram adicionados à solução de NPOFe-T, aproximadamente, 34 mg de amino-PEG (pH=8,6) e 8,6 mg de EDC, o pH ajustado a 7, em agitação magnética por 18 h, em temperatura ambiente. A solução de NPOFe foi purificada em uma célula de agitação com membranas de 30 kDa, e o sistema lavado diversas vezes com água. Essas NPs foram denominadas por NPOFe-PEG.

4.2.6. Síntese da molécula 2-(4-N-(metilaminofenil))-6-hidroxibenzotiazol (6-OH-BTA-1) e da molécula 2-[5'-N-(3-trietoxisilil)propilurea-2'-hidroxifenil] benzotiazol (2'OH-BTA-Si)

A molécula 2-(4-N-(metilaminofenil))-6-hidroxibenzotiazol (6-OH-BTA-1) foi sintetizada de acordo com o protocolo Klunk.^{120,144} e a molécula 2-[5'-N-(3-trietoxisilil)propilurea-2'-hidroxifenil] benzotiazol (2'OH-BTA) foi sintetizada de acordo com o protocolo Campo¹²⁰. Essas moléculas foram obtidas em colaboração com a Profa. Dra. Leandra F. Campo, no Laboratório de Fotoquímica Orgânica Aplicada- UFRGS.

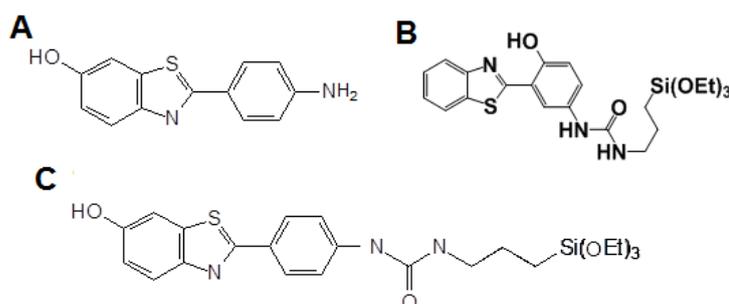


Figura 4.1. Estruturas químicas derivadas dos hidroxobenzotiazóis: 2-(4-N-(metilaminofenil))-6-hidroxibenzotiazol (6-OH-BTA-1) (A); 2-[5'-N-(3-trietoxisilil)propilurea-2'-hidroxifenil] benzotiazol (2'OH-BTA) (B); 2-[5'-N-(3-trietoxisilil)propilurea-2'-hidroxifenil]benzotiazol silanizado (C) .

4.2.7. Conjugação da molécula 2-[5'-N-(3-trietoxisilil)propilurea-2'-hidroxifenil]benzotiazol silanizado (NPOFe-C-Si-BTA-1) e da molécula 2-[5'-N-(3-trietoxisilil)propilurea-2'-hidroxifenil] benzotiazol nas NPOFe-C-SiO₂

A NPOFe-C-SiO₂ foi conjugada com a molécula fluorescente através dos grupos silanol da superfície da sílica. As conjugações de ambas moléculas foram realizadas pelo mesmo processo de síntese. Dissolveu-se 240 mg de NPOFe-C em 30 mL de acetato de etila e 21,3 mg de Si-BTA-1 em 30 mL de acetato de etila. A mistura foi agitada à temperatura ambiente, sob refluxo durante 48 horas. O sólido resultante foi purificado lavando com etanol até remover todo o corante não ligado e seco a 80 °C.

4.2.8. Conjugação da molécula 2-(4-N-(metilaminofenil))-6-hidroxibenzotiazol na nanopartícula NPOFe-T (NPOFe-T-BTA-1)

A conjugação da molécula fluorescente 6-OH-BTA-1 foi realizada na amostra NPOFe-T, preparada via reação de acoplamento com o EDC, de acordo com o protocolo adaptado de Stanicki.¹⁰¹ Primeiro 2,7 mg de 6-OH-BTA-1 foi dissolvido em 500 µL de DMF e homogeneizado em vortex. Foi misturado a solução de 6-OH-BTA-1 em 5 mL de NPOFe-T e o pH ajustado a 7,5, e posteriormente, adicionado 15 mg de EDC. A mistura ficou em agitação magnética por 15 h. A solução de NPs foi purificada em uma célula de agitação com membranas de 30 kDa, e o sistema foi lavado diversas vezes com água até que não houvesse mais fluorescência no líquido filtrado. Essas NPs foram denominadas por NPOFe-T-BTA.

4.3. Estudos de toxicidade

4.3.1. Cultura de células e citotoxicidade *in vitro*

Os ensaios de toxicidade foram realizados para estudar possíveis efeitos nocivos das NPOFe perante as células. Os testes foram realizados em colaboração com o Laboratório de Farmacologia Aplicada - PUCRS.

4.3.1.1. Cultivo celular e tratamento

A linhagem celular de tecido epitelial de rim de macaco (VERO) foi proveniente da ATCC (Rockville, Maryland, EUA). Estas células foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), sob condições ideais de cultivo e mantidas em incubadora de células umidificada (37 °C, 5% CO₂, 95% umidade).

Ao atingir a semi-confluência, as células foram tratadas com as seguintes substâncias: soluções das NPOFe com concentrações de ferro iguais a 4 mmol.L⁻¹, 2 mmol.L⁻¹, 1 mmol.L⁻¹, 0,5 mmol.L⁻¹, 0,25 mmol.L⁻¹, 0,100 mmol.L⁻¹, 0,05 mmol.L⁻¹. Os tratamentos foram divididos em 24 h para fins da formação de uma curva de relação tratamento versus resposta.

4.3.1.2. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT, decorridas 24 h da adição dos tratamentos conforme descrito no item 4.3.1.1. O meio de cultura presente nos poços foi desprezado e substituído por 100 µL de uma mistura de 90% DMEM e 10 % de uma solução de MTT 5 mg.mL⁻¹ (PBS). A seguir, as células foram incubadas por 3 h em condições ideais de cultivo (37 °C e 5 % de CO₂). Após esse período, o meio foi novamente desprezado e adicionado 100 µL de DMSO por poço, a fim de dissolver os cristais de formazan, resultantes da reação. A absorbância em 570 nm foi quantificada em leitor de placas de 96 poços (Spectra Max M2e, Soft Max® Pro 5, Molecular Devices).

A reação do MTT ocorre em células metabolicamente ativas. A intensidade da reação é uma estimativa da viabilidade mitocondrial dos controles comparadas às células tratadas. Através da equação, calcula-se a razão tratadas/controle (4.1)

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \left(\frac{OD_{570}(amostra)}{OD_{570}(controle)} \right) \times 100, \quad (4.1)$$

na qual OD₅₇₀(amostra) representa a densidade óptica dos poços tratados com as diferentes NPs, e OD₅₇₀(controle) representa os poços tratados apenas com o meio de cultura.

Para contagem celular foram plaqueadas a 20x10³ células/poço por poço, em placas de 24 poços, com meio DMEM suplementado com FBS a 10% e crescido durante 24 h. Após esse tempo, as células foram tratadas conforme descrito no item 4.3.1.1. Ao final do período de tratamento, o meio foi removido e as células foram lavadas com tampão PBS e adicionados 200 µL de solução de tripsina/EDTA a 0,25

% para soltar as células dos poços. O número de células foi determinado utilizando o método de exclusão pelo corante Tripán Blue utilizando um contador de células (Countess FL II, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Os resultados foram expressos em número absoluto de células em relação ao controle.

4.3.2. Ensaio de toxicidade em peixe-zebra

Os ensaios de toxicidade em peixe-zebra foram realizados em colaboração com o Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso e ZebLab da PUCRS. Para o potencial tóxico foi realizada a separação dos grupos e delineamento experimental para definição das concentrações de NPOFe a serem usadas, a fim de minimizar o número utilizado de animais. Foi caracterizado o potencial tóxico das NPOFe e o estudo com curva de dose-resposta de seus diferentes componentes, conforme descrito na Figura 4.2. Os ensaios toxicológicos foram realizados para as NPOFe com os revestimentos de dextrana, quitosana, sílica e polietilenoglicol. As doses utilizadas foram de $0,125 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($6,975 \text{ mg.L}^{-1}$), $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($22,3 \text{ mg.L}^{-1}$), $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($111,6 \text{ mg.L}^{-1}$), e $8,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ ($446,4 \text{ mg.L}^{-1}$), relativo à quantidade de Fe presente.



Figura 4.2. Esquema representativo do desenho experimental do peixe zebra.

Conforme o padrão para testes embriotóxicos nessa espécie, os animais foram testados em n de 16 por grupo, em duplicata, e o meio trocado diariamente. Desses, todos foram monitorados com relação à embriotoxicidade (sobrevivência e morfologia)

diariamente durante os 5 dias que seguiram as exposições. Após completarem 5 dias pós fertilização (dpf), todos foram eutanasiados por crioeutanásia.

4.3.2.1. Animais

Os animais foram obtidos no biotério do CeMBE-PUCRS e criados no ZebLab. Os animais utilizados são da espécie *Danio rerio*, também chamado de peixe zebra ou *zebrafish*, da linhagem AB selvagem. Para a reprodução, foram utilizados animais adultos para acasalamento numa proporção de 2 machos para 1 fêmea. Esses animais foram mantidos em um sistema de recirculação com água do sistema (água própria para peixes - osmose reversa equilibrada com sal marinho - *Instant Ocean*[®]) e um ciclo dia-noite de 14/10 horas. Os animais foram alimentados 3 vezes ao dia com ração e paramécio. Parâmetros de qualidade de água, incluindo condutividade, pH e temperatura (28 ± 2 °C) foram monitorados.²⁰⁵ À noite, antes do acasalamento, os machos e as fêmeas foram separados por uma barreira transparente, e removida na manhã seguinte. Após 30 minutos, os embriões fertilizados foram limpos e colocados em placas de petri com água do sistema para os respectivos tratamentos e logo após foram mantidos em estufa BOD até o final do tratamento, com duração de 5 dias. Todos os procedimentos e protocolos foram aprovados pelo CEUA-PUCRS (número de licença 7127), seguindo as instruções do Conselho Canadense de Cuidados com Animais (CCAC) para uso de peixes na pesquisa e da legislação brasileira (COBEA, N ° 11.794/08).

4.3.2.2. Monitoramento de embriotoxicidade e teratogênese

Durante o tratamento dos embriões, cada grupo foi monitorado diariamente, individualmente em estereomicroscópio a fim de avaliar a taxa de mortalidade de cada grupo através da técnica de Kaplan Meier e possíveis alterações teratogênicas no plano corporal, coluna vertebral, olhos, coração e vitelo. Esses parâmetros foram acompanhados todos os dias no turno da manhã até os animais completarem 5 dpf. O *n* amostral foi de 16 animais, em duplicata.

4.3.2.3. Teste de locomoção e exploração de um novo ambiente

O comportamento exploratório foi realizado 5 dpf, com as larvas do peixe zebra colocadas em placas de 24 poços, com 3 mL de água do sistema, 1 larva por poço, sendo analisados quatro animais por vez (Figura 4.3). Após, os animais ficaram durante 2 minutos para climatizar-se com o ambiente e o comportamento exploratório das larvas foi registrado usando uma webcam digital HD (Logitec) durante 5 minutos. Os vídeos gravados foram analisados, usando um *software* de rastreamento de vídeo (Ethovision). A distância total percorrida, a velocidade média, o tempo gasto na área externa do poço e os ângulos de volta do corpo absoluto foram os principais parâmetros examinados nessa análise.

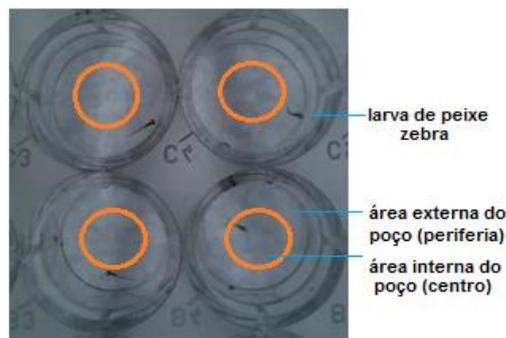


Figura 4.3 Configuração do procedimento para avaliação da capacidade locomotora e exploratória.

A capacidade cognitiva dos animais foi avaliada através do teste de comportamento aversivo, realizado após o comportamento exploratório. As larvas dos grupos experimentais foram colocadas em uma placa de 6 poços, 5 larvas por poço e expostas a um estímulo aversivo.^{206,207} Placas de 6 poços foram colocadas sobre uma tela de LED com uma apresentação em PowerPoint, com um estímulo aversivo consistindo de uma bola vermelha saltando na metade inferior de cada poço, oscilando da esquerda para a direita (Figura 4.4). O número de animais que evitou eficientemente o hemisfério de estímulo, a cada vinte segundos, foi o principal parâmetro para respostas cognitivas de escape em ensaios consecutivos.

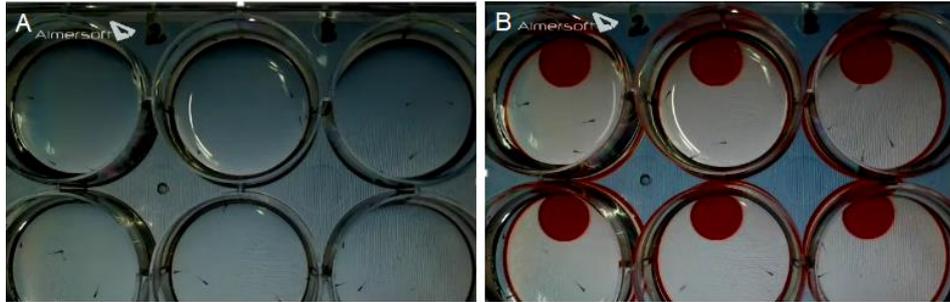


Figura 4.4. Configuração do procedimento para avaliação do comportamento aversivo sem (A) e com estímulo (B).

4.4. Ensaio *in vitro* com o peptídeo β -amilóide

4.4.1. Preparação do peptídeo beta-amilóide

O peptídeo β -amilóide foi preparado em três formas estruturais: monômero, oligômero e placa. A partir da solução estoque de β -amilóide, fez-se uma solução de 1 mmol.L^{-1} de cada. Na forma monomérica, o pó liofilizado foi resuspenso em água deionizada, titulado com uma solução de NaOH 1 mol.L^{-1} até pH neutro, agitado até homogeneizar. Diluiu-se o produto em PBS para armazenar a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, seguindo protocolo de Cameron.²⁰⁸ A forma oligomérica foi obtida incubando o monômero durante 3-5 dias a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, seguindo protocolo de Pontrello.²⁰⁹ As placas, foram obtidas incubando a solução de monômero sob agitação (800 rpm) a $23 \text{ }^\circ\text{C}$ por 36 h. Após a incubação, o produto foi centrifugado (10 minutos, 15000 g), armazenado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, seguindo protocolo de O'Hare.²¹⁰

4.4.1.1. Estudo da afinidade do 6-OH-BTA-1 ao peptídeo beta-amilóide

A interação do 6-OH-BTA-1 com as diferentes formas nas três formas estruturais do peptídeo beta-amilóide (monômero, oligômero e placa) foi avaliada pelo método de titulação por supressão de fluorescência. Para isso, foi preparado um volume fixo de 6-OH-BTA-1 em tampão PBS (pH 7,0, 3 mL) e adicionadas alíquotas do peptídeo (5-50 μL) até a concentração desejada. Os espectros de fluorescência foram

monitorados utilizando o comprimento de onda de excitação de 330 nm e o comprimento de onda de emissão em 415 nm.

4.5. Procedimentos de caracterização

A seguir serão descritas as caracterizações realizadas para todas as NPs sintetizadas. Essas NPs estão na forma de dispersão, portanto para algumas caracterizações, as amostras foram secas em estufa e/ou liofilizadas para a obtenção da fase sólida.

4.5.1. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A análise da distribuição de tamanhos e da morfologia das NPOFe foram realizadas em um microscópio eletrônico de transmissão (TEM), equipado com espectrômetro de raios X por dispersão em energia (EDS), modelo Tecnai G2 T20 – FEI, localizado no Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCEMM), da PUCRS. As amostras em solução foram diluídas em água deionizada (~300x), ultrasonificadas por 5 minutos e gotejada em grades de cobre/carbono, até sua total evaporação. As grades com as NPOFe depositadas foram mantidas sob vácuo por pelo menos 24 h, antes da análise no TEM. O diâmetro médio das NPOFe foi medido no software *ImageJ*, com uma contagem de no mínimo 100 partículas por imagem.

4.5.2. Difração de raio-X (XRD)

As medidas da estrutura cristalina das NPOFe foram realizadas em um equipamento de difração de raio X (XRD), modelo 7000 - Shimadzu, localizado no Centro Interdisciplinar de Nanociências e Micro-Nanotecnologia - NanoPUC, utilizando-se radiação Cu-K α ($\lambda=1,54056$ Å), 40 kV e 30 mA. Os difratogramas foram obtidos variando-se 2θ de 15-80 °, com passo de 0,05 ° e tempo de aquisição de 4 s por ponto.

Para o cálculo do diâmetro médio dos cristalitos foi estimado pela Equação de *Scherrer* e o valor de largura a meia altura do pico de maior intensidade do difratograma.³¹ O equipamento da Shimadzu não é apropriado para medir o diâmetro média das NPOFe, porém as amostras também foram medidas no equipamento Bruker D8 Advanced (potência de 40 kV/30 mA, com um tubo de Cu, comprimento de onda de $\lambda = 1,5418 \times 10^{-10}$ m), em trabalho paralelo, e os resultados não diferiram entre si. As amostras sólidas foram dispostas diretamente no porta-amostras de vidro disponível no equipamento.

4.5.3. Magnetômetro de amostra vibrante (VSM)

As curvas de magnetização foram obtidas por um magnetômetro de amostra vibrante (VSM), EZ9 - MicroSense, localizado no Laboratório de Magnetismo da UFRGS. As amostras liofilizadas foram pesadas e dispostas no porta-amostras de vidro. O campo magnético aplicado variou de -20 a 20 kOe e as medidas foram realizadas a temperatura ambiente, considerando a magnetização em relação à massa total de NPs pesada.

4.5.4. Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

A estrutura química das NPOFe e inserção de grupos funcionais foram avaliadas por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), modelo Spectrum One - Perkin Elmer, localizado na Escola de Ciência da PUCRS. Foram confeccionadas pastilhas das amostras de NPs com KBr, e secas em estufa a 110 °C. Os espectros foram obtidos no intervalo de 400-4000 cm^{-1} .

4.5.5. Espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta (ZP ou ζ)

As medidas do diâmetro hidrodinâmico das NPOFe em dispersão foram realizadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) em diferentes solventes: água deionizada, buffer fosfato (PBS) e água de osmose reversa do aquário dos peixes (equilibrada com sal marinho - *Instant Ocean*[®]). Para todas as análises de DLS, foi considerada a medida com ponderação em distribuição por número e as medidas realizadas a 25 °C. A estabilidade coloidal e os valores dos pontos isoelétricos das amostras foram realizados, utilizando a técnica por mobilidade eletroforética (ME). As amostras foram avaliadas em diferentes valores de pH. As análises foram realizadas com as amostras numa concentração de 10 mmol.L⁻¹ (relativo ao Fe), sendo o pH variado na faixa de 2-12. Ambas as análises foram realizadas em um Zetasizer, modelo ZEN3600 – Malvern, localizado no Centro Interdisciplinar de Nanociências e Micro-Nanotecnologia – NanoPUC.

4.5.6. Relaxometria magnética nuclear (RN)

As medidas da taxa de relaxação magnética nuclear longitudinal (R1) e transversal (R2) em 0,47 e 1,41 T foram realizados num relaxômetro Minispec mq – Bruker, da Universidade de Mons - Bélgica, durante o estágio de doutorado no exterior. As taxas de relaxação foram medidas em função da concentração molar de Fe presente nas NPs em 0,47 (20 MHz) e 1,41 T (60 MHz), a fim de calcular as relaxividades r_1 e r_2 , definida como a taxa de relaxação dos prótons de água por 1 mM de solução do agente de contraste (Hz/mM ou mM⁻¹.s⁻¹).

4.5.7. Imagens por ressonância magnética (MRI)

As medidas dos tempos de relaxação magnéticas T1 e T2 foram realizadas no equipamento de ressonância magnética, modelo 450 W gen - G&E, com campo de 1.5 T, localizado no Hospital São Lucas da PUCRS. A análise foi realizada com o *phantom* em uma bobina de crânio (*head 24*), utilizando sequências de fast *spin eco*

(FSE). Para os mapas T1, foi empregado o modo de recuperação de inversão com tempo TR de 3000 ms e TI de 50, 70, 90, 110, 130, 150, 200, 400, 600, 800, 1000, 1300 ms, com quatro fatias em cada seringa e uma matriz de 512x512 pixels. Para os mapas T2, foi usado um TR de 1000 ms e TE de 7.4, 10, 14, 18, 25, 35, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ms, também numa matriz de 512x512 pixels.

As medidas de relaxometria de cada amostra foram feitas em solução das NPOFe com concentrações de $C_0/100$; $C_0/200$; $C_0/500$; $C_0/1000$ e $C_0/2000$, na qual C_0 é a concentração da solução estoque das NPOFe. Cada amostra diluída foi colocada em seringas plásticas de 3 mL e dispostas em um *phantom* cilíndrico de espuma, com quinze orifícios, ao longo de sua borda e uma abertura central, no qual uma solução controle de água foi adicionada como referência, de acordo com a Figura 4.5.

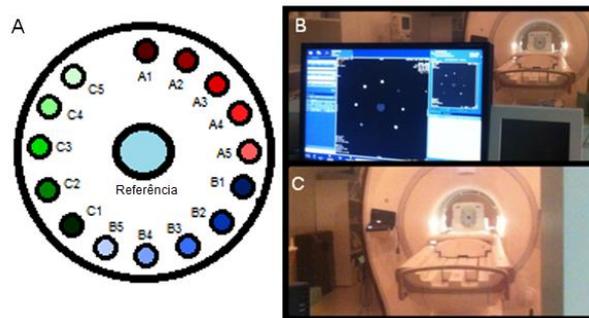


Figura 4.5. Imagem do *phantom* no equipamento de MRI. As posições das seringas com as NPs nas cinco concentrações estão descritas de A1-A5 ($C_0/100$ - $C_0/2000$), no sentido horário da mais concentrada. No centro está como referência a água (A). Imagem do equipamento de MRI com o *phantom* instalado (B e C).

A partir destes dados, foram determinados os tempos de relaxação T1 e T2, para as diferentes concentrações de NPOFe, o que permite o cálculo da relaxividade da dispersão.

4.5.8. Teor de ferro

A concentração de ferro total foi medida por espectrofotometria na região visível (UV-vis). Utilizou-se cubetas de plástico descartáveis, com caminho óptico de 10 mm.

Foi preparada uma solução estoque do padrão de ferro e, a partir deste padrão, nove concentrações diferentes foram preparadas (variando de 0,1 a 10 mg.mL⁻¹) para montar a curva de calibração. Para cada cubeta, adicionou-se 10 µL de cada solução padrão, mais 10 µL de H₂O₂ e 980 µL de HCl 6 mol.L⁻¹. Para a leitura no espectrofotômetro, utilizou-se o comprimento de onda $\lambda = 410$ nm.²⁰¹ Para a leitura de cada amostra, fez-se o mesmo preparo realizado nos padrões. As medidas de absorção foram obtidas no espectrofotômetro UV-Vis modelo Lambda 35, fabricado pela Perkin Elmer, localizado Centro Interdisciplinar de Nanociências e Micro-Nanotecnologia-NanoPUC.

A concentração de ferro total foi também determinada medindo a taxa de relaxação longitudinal R1 de acordo com o protocolo Henoumont e Boutry, num relaxômetro de 0,47 T da Minispec mq-Bruker, da Universidade de Mons-Bélgica, durante o estágio de doutorado no exterior.^{212,211 212} As amostras foram digeridas em micro-ondas (Mega MLS-1200, Milestone) e o valor R1 das soluções resultantes foi analisado em 0,47 T, a 37 °C, o que permitiu a determinação da concentração de ferro usando a Equação:

$$[Fe] = (R1_{amostra} - R2_{diam}) \times 0.0915, \quad (4.2)$$

em que R1 é a taxa de relaxação diamagnética de água (0,36 s⁻¹) e 0,0915 (mmol.L⁻¹.s⁻¹) é a inclinação da curva de calibração.

4.5.9. Espectroscopia por fluorescência (FL)

Inicialmente, foram analisados os espectros de absorção e emissão das moléculas fluorescentes em diferentes solventes (etanol, acetato de etila, clorofórmio, acetona, e buffer PBS). Os espectros de absorção e emissão em meio aquoso e no estado sólido foram registados à temperatura ambiente e em 40 °C em um espectrofotômetro LS 55-Perkin Elmer. As amostras foram diluídas e medidas nos respectivos comprimentos de onda de absorção máxima e emissão máxima. Os espectros foram obtidos no intervalo de comprimento de onda de 300-600 nm, com comprimento de onda de excitação de 330 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesse capítulo, inicialmente, serão abordadas as características estruturais e morfológicas das NPOFe sem revestimento (NPOFe-C e NPOFe-P). Em seguida, serão apresentados os resultados obtidos da caracterização físico-química e relaxividade magnética nuclear e propriedades fotofísicas das NPs magnetofluorescentes das NPOFe com os revestimentos de dextrana (NPOFe-DX), de quitosana (NPOFe-QS), de polietilenoglicol (NPOFe-PEG) e de polissilanos (NPOFe-T e NPOFe-P-SiO₂). Posteriormente, os resultados do estudo da interação do 6-OH-BTA-1 com os peptídeos beta-amiloide. E por fim, serão apresentados os ensaios toxicológicos *in vitro* em células VERO e *in vivo* com o peixe zebra.

5.1. Características estruturais e morfológicas das nanopartículas de óxido de ferro sem revestimento

Como já descrito no item 4.2.1, para a produção de NPOFe sem revestimento, foram sintetizadas suspensões aquosas seguindo dois métodos: por coprecipitação alcalina e por poliol. As Figuras 5.1 e 5.2 apresentam as imagens de TEM das NPOFe sintetizadas pelo método de coprecipitação (NPOFe-C) e poliol (NPOFe-P), respectivamente. Para todas as imagens de TEM, foram realizadas medidas de EDS em regiões específicas da amostra para a confirmação dos elementos presentes. Em todas as amostras, os espectros de EDS confirmaram a presença do elemento ferro. Observou-se também o formato, preferencialmente, esférico das NPOFe.

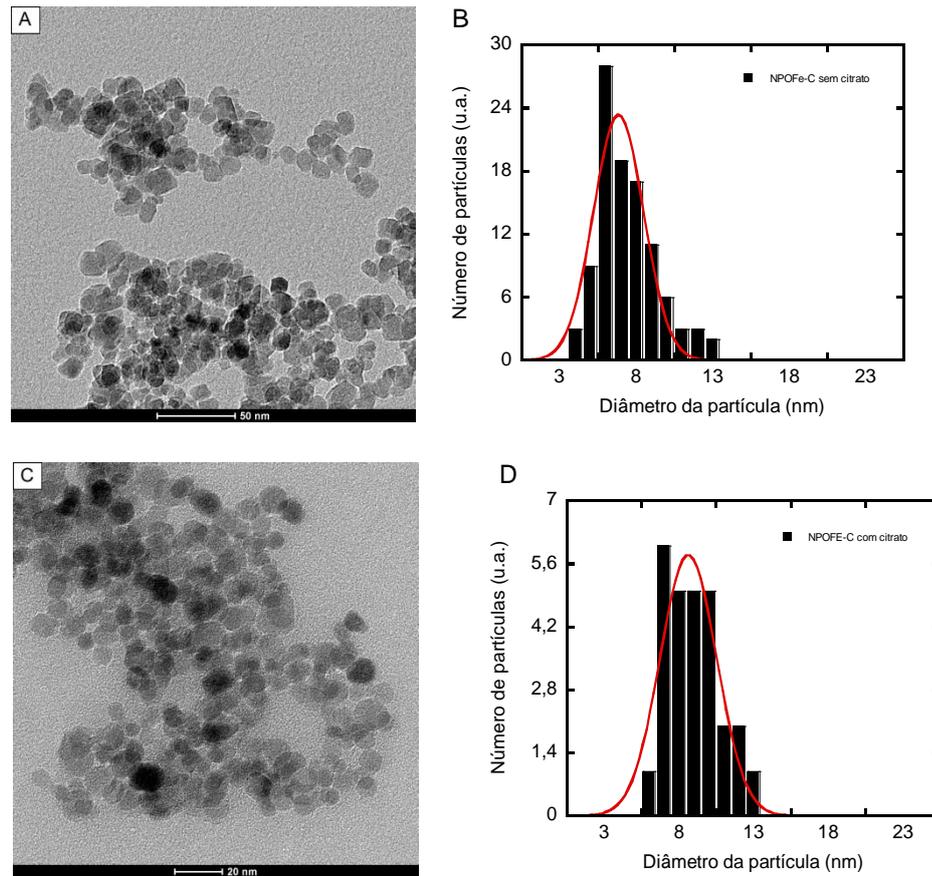


Figura 5.1. Imagens de TEM e a distribuição de tamanho das NPOFe obtidas por coprecipitação (NPOFe-C) sem (A e B) e com estabilizante de citrato (C e D).

As NPOFe-C apresentaram distribuição de tamanho médio de $(7,9 \pm 1,9)$ nm para a amostra sem citrato (Figura 5.1A) e de $(9,5 \pm 1,7)$ nm para amostra com citrato (Figura 5.1C). A Figura 5.2 apresenta as imagens de TEM das NPOFe sintetizadas por poliol (NPOFe-P).

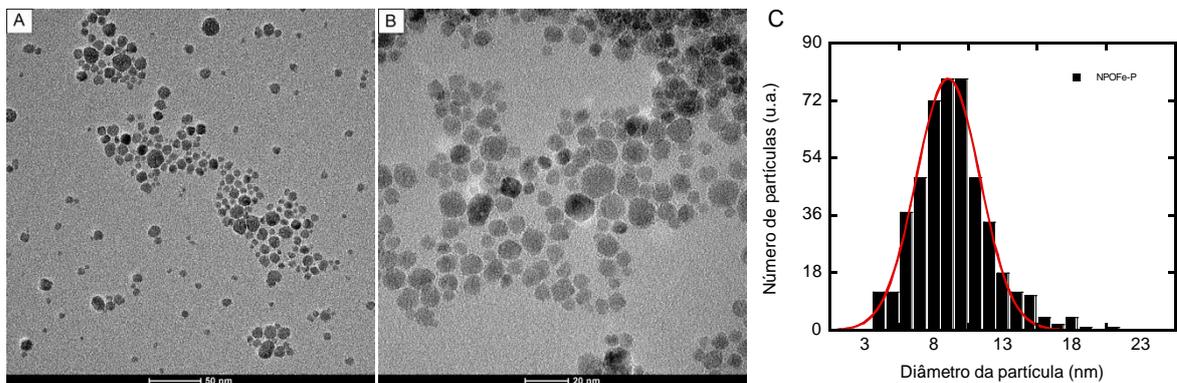


Figura 5.2. Imagens de TEM das NPOFe obtidas pela rota poliol (NPOFe-P) (A e B); a distribuição de tamanho obtida por TEM (C).

As NPOFe-P apresentaram distribuição de tamanho médio de $(9,8 \pm 2,7)$ nm. Não houve diferenças significativas nos tamanhos médios das NPOFe obtidas pelos dois métodos (Tabela 5.1).

Informações da estrutura cristalina e tamanho das NPOFe foram também obtidas por XRD. A Figura 5.3 mostra uma comparação entre os difratogramas de XRD das NPOFe sem revestimento.

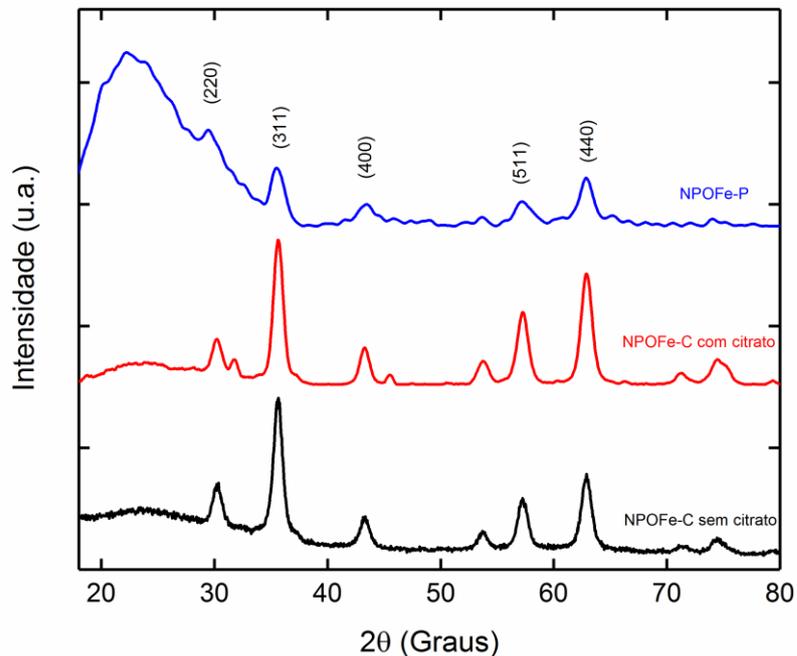


Figura 5.3. Difratograma de XRD das NPOFe-P e das NPOFe-C sem citrato e com citrato.

O padrão de difração das NPOFe-C e NPOFe-P mostrou picos distintos em 2θ de, aproximadamente, $30,3^\circ$, $35,6^\circ$, $43,3^\circ$, $53,8^\circ$, $57,2^\circ$ e $62,7^\circ$, representando os planos cristalinos (220), (311), (400), (422), (511), e (440), da estrutura cúbica espínio inverso da magnetita (Fe_3O_4), segundo a ficha cristalográfica JCPDS, n° 19-629. Observou-se também que no difratograma da NPOFe-C há três picos referentes ao cloreto de sódio (PDF n° 5-628 JCPDS), correspondente ao sal halita, com picos em 2θ de aproximadamente $27,4^\circ$, $31,9^\circ$ e $45,5^\circ$, proveniente provavelmente do sal remanescente da síntese. O tamanho médio dos cristalitos foi calculado de acordo com a Equação de Scherrer.

$$D = (K \cdot \lambda) / (\beta \cos(\theta)), \quad (5.1)$$

na qual K é uma constante igual a 0,94, λ é o comprimento de onda do raio X, β é a largura a meia altura do pico e θ é o ângulo de Bragg correspondente ao pico. De acordo com a largura do pico de maior intensidade (311), o tamanho do cristalito foi de 10,9 nm para as NPOFe-C sem citrato, 10,1 nm para as NPOFe-C com citrato e 9,0 nm para as NPOFe-P (Tabela 5.1) com boa concordância com os dados de TEM.

Os grupos químicos presentes nas NPs podem ser identificados nos espectros de absorção na região do infravermelho, apresentado na Figura 5.4.

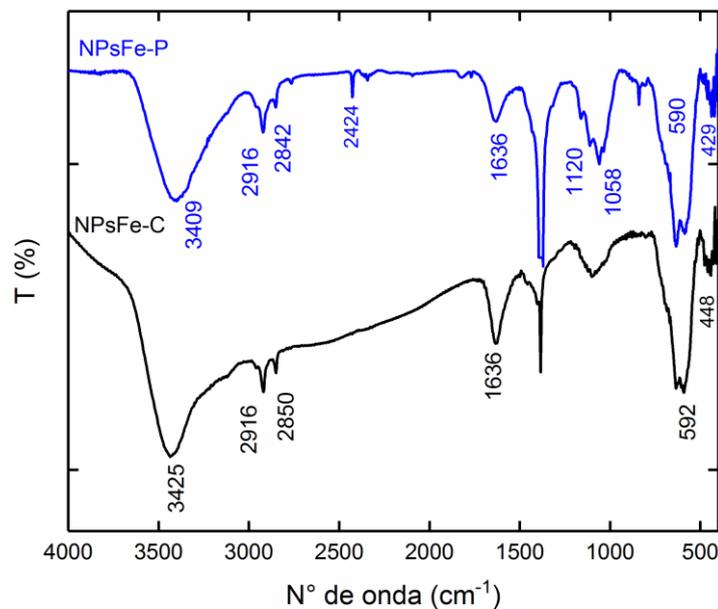


Figura 5.4. Espectro de infravermelho das NPOFe-C (—) e NPOFe-P (—).

Os picos largos em torno de 3400 cm^{-1} são referentes às vibrações de estiramento OH e os picos em 1636 cm^{-1} são referentes às deformações angulares do grupo OH. Como ambas as sínteses das NPOFe sem revestimento foram realizadas em meio aquoso, a superfície do óxido de ferro permaneceu encoberta por grupos hidroxil, por isso o aparecimento dessas duas bandas distintas. Os espectros mostram picos de absorção em torno de $590\text{-}429 \text{ cm}^{-1}$, atribuídos à deformação das ligações Fe-O. De acordo com Ozkaya e Maity^{61,213}, a diferença entre os picos das ligações Fe-O podem ser devido às pequenas diferenças estruturais da magnetita e da magne-

mita, regido pelo número de sítios octaédricos e tetraédricos. Os dois picos em, aproximadamente, 2916 e 2842 cm^{-1} , são atribuídos aos estiramentos de grupos C-H assimétrico e simétrico, respectivamente, pertencentes aos grupos CH_2 presentes nas estruturas do dietilenoglicol, que pode ter ficado remanescente das lavagens e do citrato. Já os picos em, aproximadamente, 1120 cm^{-1} são atribuídos à presença da ligação C-O também presentes nas estruturas do dietilenoglicol e do citrato.

5.2. Propriedades coloidais e estabilidade das nanopartículas de óxido de ferro sem revestimento

A Figura 5.5 apresenta a distribuição de tamanho médio (com ponderação em número) obtidas por DLS das soluções aquosas das amostras NPOFe-C e NPOFe-P.

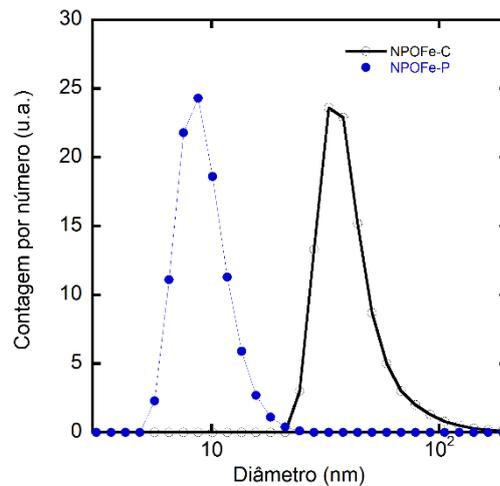


Figura 5.5. Distribuição de tamanho por DLS das NPOFe-C (○) e NPOFe-P (●) em solução aquosa.

As NPOFe-C apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de 49,3 nm e as NPOFe-P de 9,5 nm. A amostra NPOFe-C obteve o valor do diâmetro hidrodinâmico médio em solução aquosa consideravelmente maior do que o diâmetro obtido por TEM (Tabela 5.1), demonstrando a sua menor estabilidade coloidal e maior tendência de aglomeração.

Tabela 5.1. Tamanho médio obtida por TEM, DLS XRD e potencial zeta das NPOFe.

Amostras	Diâmetro (nm)		Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Potencial zeta (mV)	pH _{final} *
	TEM	XRD	DLS		
NPOFe-C	9,5 ± 1,7	10,1	49,3 ± 23	-41,4	8,4
NPOFe-P	9,5 ± 2,7	9,0	9,8 ± 0,3	+46,6	5,0

* pH_{final} relativo à solução de NPOFe numa concentração de Fe de 10 mmol.L⁻¹ para medidas de ZP.

Os valores de potencial zeta (ζ) obtidos para as NPOFe-C e NPOFe-P foram de -41,4 mV e +46,6 mV, respectivamente. Nessas medidas o pH final das suspensões não ficou igual devido a diferenças nos estabilizantes presentes e sua diluição (Tabela 5.1). O valor do potencial zeta das NPOFe-C indica carga superficial negativa, relacionadas à presença de íons citrato adsorvidos na superfície das NPs, os quais são constituídos por grupos aniônicos carboxilatos (Figura 5.6).²¹⁴ A adição de citrato diminui possíveis efeitos de agregação, formando uma barreira repulsiva eletrostática ao redor das partículas.^{215,216} O valor positivo potencial zeta das NPOFe-P indica carga superficial positiva, pela presença de contra-íons de nitrato, realizado pelas lavagens ácidas. Essa carga positiva é caracterizada pelos grupos hidroxil protonados em meio ácido (pH_{final}=5,0) (Figura 5.6).²¹⁷

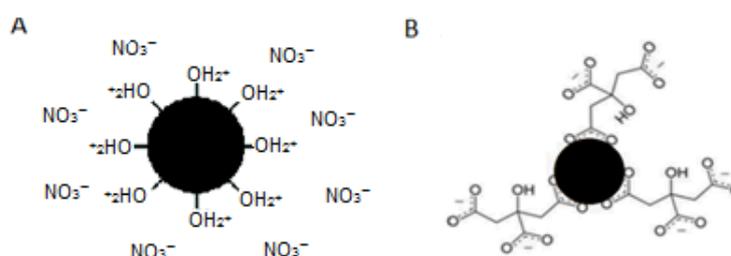


Figura 5.6. Esquema representando a NPOFe estabilizada com o contra-íon nitrato (A) e estabilizada com íons citrato (B).

A estabilidade das NPOFe sem revestimento dispersas em meio aquoso foi avaliada pela mobilidade eletroforética. Utilizou-se para isso as medidas de potencial zeta e de diâmetro hidrodinâmico, variando o pH do meio. A Figura 5.7A apresenta a titulação do potencial zeta das NPOFe com adições de solução ácida e básica. De

acordo com a literatura, a estabilidade das NPOFe em meio aquoso é dada pela repulsão eletrostática entre partículas carregadas e flocculam em torno do ponto isoelétrico, estabelecido em torno de pH 7 para a magnetita e maguemita.²⁴

Os valores dos pontos isoelétricos (PI, valor de pH que representa carga elétrica líquida igual a zero) encontrados foram de 2,43 mV para a NPOFe-C com citrato, 6,31 mV para NPOFe-C sem citrato e 6,92 para NPOFe-P.

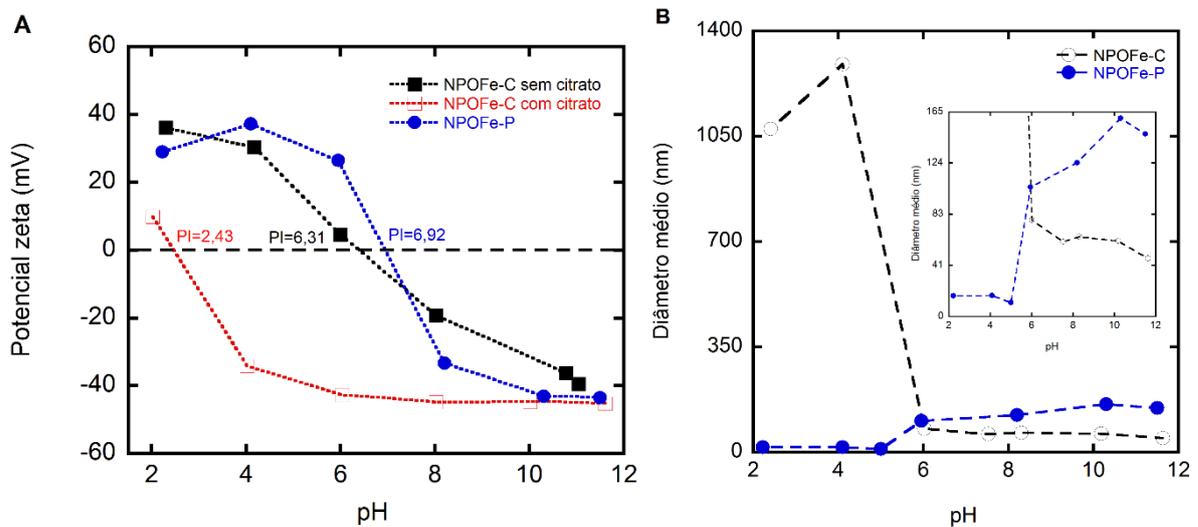


Figura 5.7. Gráfico do potencial zeta em função do pH das NPOFe-C com citrato (\square) e sem citrato (\blacksquare) NPOFe-P (\bullet) (A); diâmetros médios em função do pH para as NPOFe-C com citrato (\circ) e NPOFe-P (\bullet) (B).

A adição dos íons citrato melhorou a estabilidade em meio aquoso das NPs, em comparação com a NPOFe-C sem citrato. Observou-se também na Figura 5.7A que para a mostra NPOFe-C o PI foi deslocado da região em torno de 6 para 3, uma região mais ácida, confirmando a modificação da superfície da partícula pelos íons citrato. Observa-se também que os valores de potencial zeta em pH acima de 8 mostraram-se mais elevados, melhorando sua solubilidade nesta faixa de pH.

Comparando as amostras NPOFe-C e NPOFe-P, a estabilização através de lavagens em meio ácido levou a uma melhora na distribuição de tamanho, apesar do PI da amostra NPOFe-P estar próximo da NPOFe-C sem citrato. O ácido nítrico utili-

zado nas lavagens contém o nitrato, considerado um contra-íon que estabiliza eletrostaticamente as NPs. De acordo com Bridot e colaboradores⁶², essas lavagens conferem melhor solubilidade das NPOFe em meio aquoso.

A Figura 5.7B apresenta o diâmetro hidrodinâmico médio em função das diferentes faixas de pH. As NPOFe-C, na faixa de pH inferior a 5, apresentaram tamanho médio muito grande, devido a repulsão eletrostática entre as partículas não ter sido suficiente para preservar a estabilidade coloidal da solução, levando a sua precipitação. O tamanho médio das partículas diminuiu na medida que aumentou o pH. O contrário foi observado em relação a NPOFe-P, as quais apresentaram uma distribuição de tamanho mais estável, na faixa de pH inferior a 5.

Na região de valores de pH entre 6-8, que é ideal para aplicações biológicas, as NPOFe sem revestimento não apresentaram boa estabilidade, reforçando a necessidade de modificações na superfície para melhorar esse parâmetro.

A estabilidade temporal também foi avaliada. A Figura 5.8 apresenta o diâmetro hidrodinâmico médio, em solução aquosa, das NPOFe sem revestimento medidas durante vários dias consecutivos. Observou-se uma maior oscilação nos diâmetros hidrodinâmicos médios das NPOFe-C no decorrer do tempo, em comparação às NPOFe-P. Já para a NPOFe-P, observou-se pouca variação nos diâmetros hidrodinâmicos médios, ocorrendo mudanças só a partir do sétimo dia de medida.

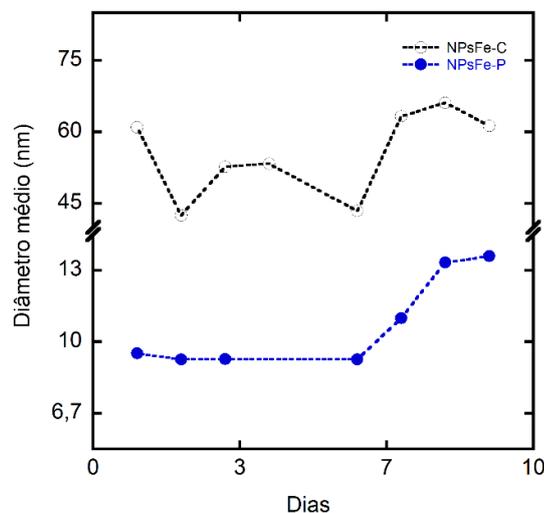


Figura 5.8. Diâmetro médio das NPOFe-C (○) e NPOFe-P (●) em solução aquosa durante 9 dias.

5.3. Características estruturais e morfológicas das nanopartículas de óxido de ferro com diferentes revestimentos

Diferentes rotas de sínteses foram realizadas para a confecção das NPOFe com os revestimentos, conforme descrito no item 4.2. As Figuras 5.9 a 5.14 apresentam as micrografias de TEM e as distribuições de tamanho médio das NPOFe com os revestimentos de dextrana (NPOFe-DX), quitosana (NPOFe-QS), polietilenoglicol (NPOFe-PEG) e sílica (NPOFe-T, NPOFe-P-SiO₂, NPOFe-C-SiO₂).

Pode ser observado nas imagens de TEM o formato aproximadamente esférico das partículas. Os valores de tamanho médio de cada partícula vistos no TEM estão dispostos na Tabela 5.2 e variaram de 6 a mais de 200 nm, dependendo do tipo de revestimento. Naturalmente, os revestimentos orgânicos de baixo número atômico não são claramente visíveis no TEM. Nas NPs com óxido de silício foi visível e contribuiu para o diâmetro total medido. Também foi medido o EDS em regiões específicas da grade (*grid*), o que confirmou a presença do elemento ferro (espectro de EDS não mostrado aqui).

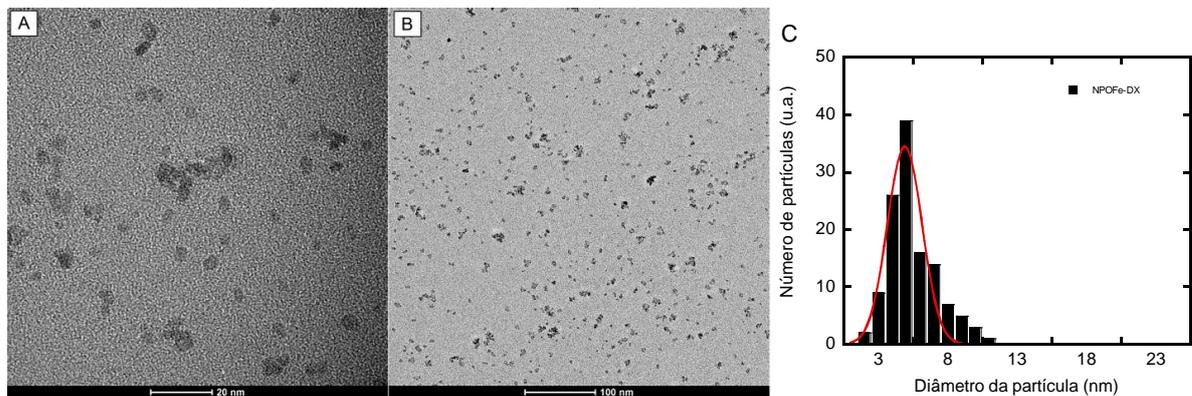


Figura 5.9. Micrografias de TEM (A e B) e histograma (C) representando a distribuição de tamanho das NPOFe-DX.

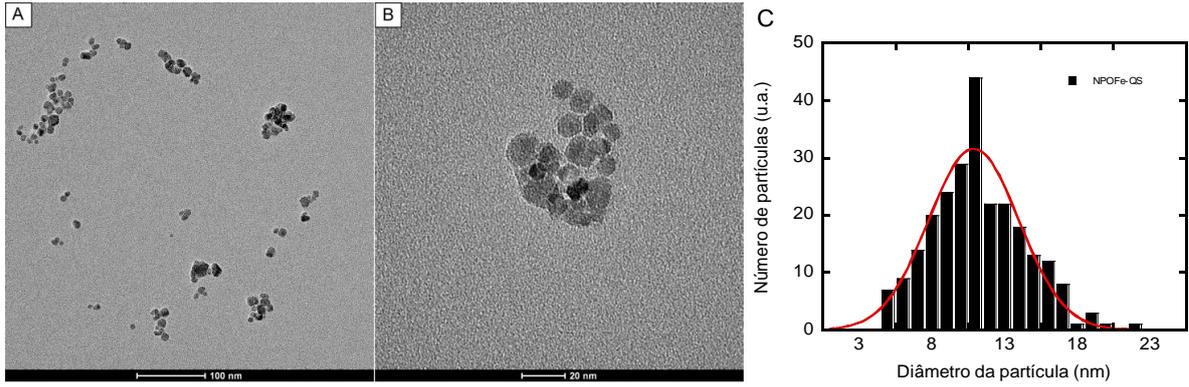


Figura 5.10. Micrografias de TEM (A e B) e histograma (C) representando a distribuição de tamanho das NPOFe-QS.

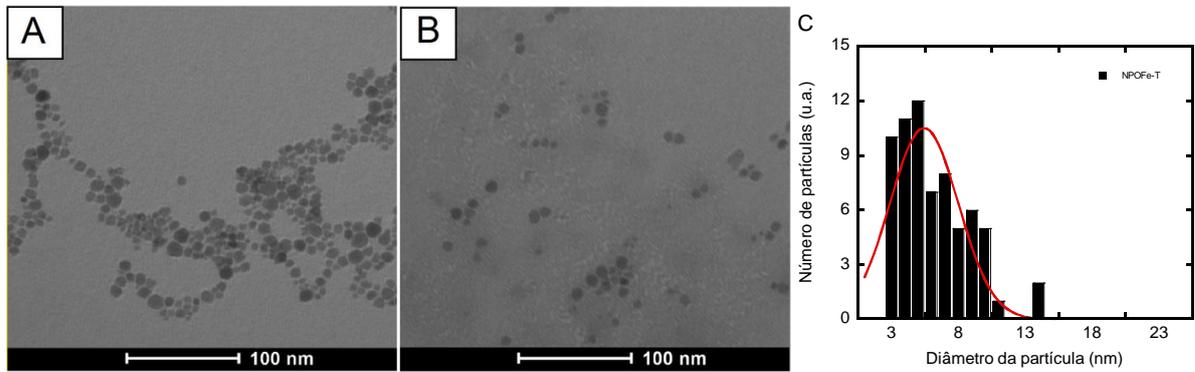


Figura 5.11. Micrografias de TEM (A e B) e histograma (C) representando a distribuição de tamanho das NPOFe-T.

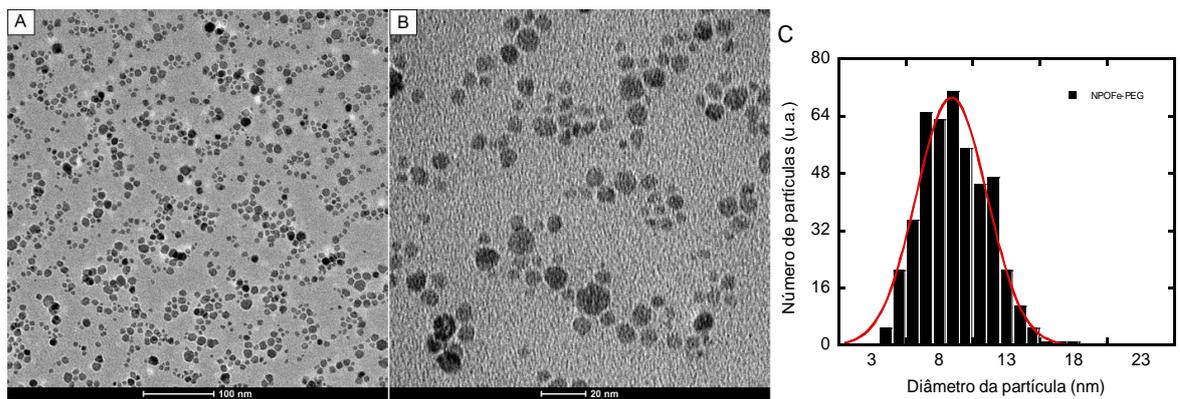


Figura 5.12. Micrografias de TEM (A e B) e histograma (C) representando a distribuição de tamanho das NPOFe-PEG.

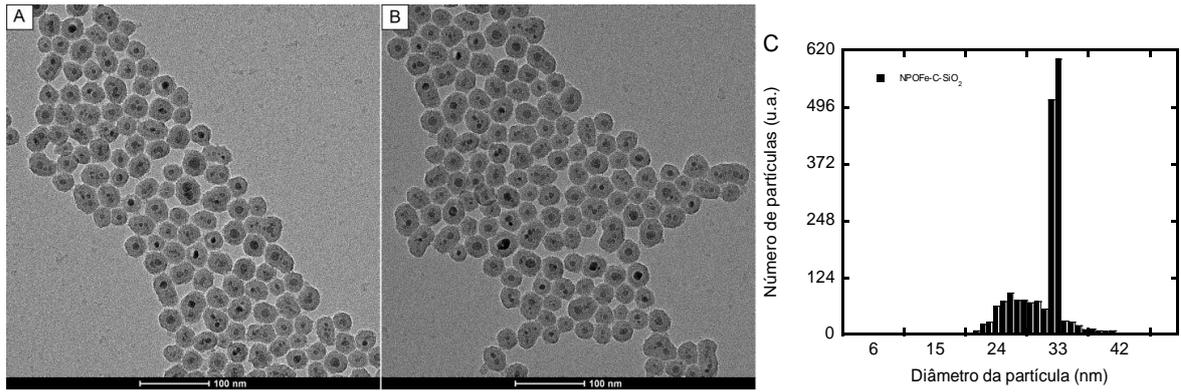


Figura 5.13. Micrografias de TEM (A e B) e histograma (C) representando a distribuição de tamanho das NPOFe-P-SiO₂.

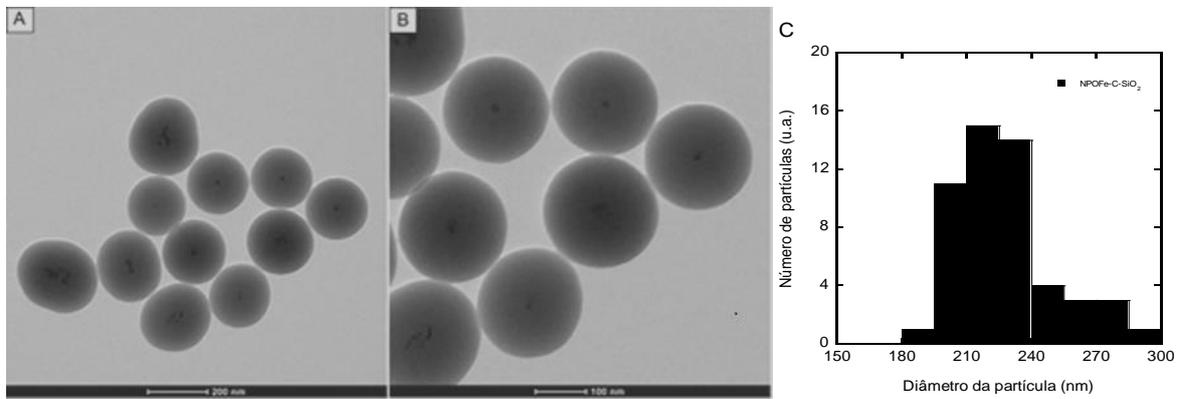


Figura 5.14. Micrografias de TEM (A e B) e histograma (C) representando a distribuição de tamanho das NPOFe-C-SiO₂.

Tabela 5.2. Diâmetro médio e valores de potencial zeta das NPOFe com diferentes revestimentos obtidos por DLS, TEM e XRD.

Amostras	Diâmetro (nm)		Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Potencial zeta (mV)	pH _{final} *
	TEM	XRD	DLS		
NPOFe-C	9,5 ± 1,7	10,1	49,3 ± 23	-41,4	8,4
NPOFe-P	9,5 ± 2,7	9,0	9,8 ± 0,3	+46,6	5,0
NPOFe-DX	5,9 ± 1,7	5,2	22,0 ± 1,4	+11,6	8,3
NPOFe-QS	11,7 ± 3,1	9,1	23,3 ± 3,6	+58,7	3,7
NPOFe-T	6,7 ± 2,6	6,9	10,2 ± 0,9	-37,0	7,7
NPOFe-PEG	9,5 ± 2,5	7,4	13,8 ± 0,1	-11,5	6,8
NPOFe-P-SiO₂	29,5 ± 4,6	-	35,9 ± 1,7	-19,5	5,6
NPOFe-C-SiO₂	226 ± 22	-	207 ± 18	-51,2	-

*pH_{final} relativos a solução de NOFe numa concentração de Fe de 10 mmol.L⁻¹ para medidas de ZP.

A análise por XRD confirmou a estrutura cristalina do óxido de ferro em todas as NPs com diferentes revestimentos, como pode ser visto nos difratogramas da Figura 5.15. O tamanho dos cristalitos também foi calculado de acordo com a equação 5.1 e foram de 5,2 nm para as NPOFe-DX, de 9,1 nm para as NPOFe-QS, de 6,9 nm para as NPOFe-T e 7,4 nm para as NPOFe-PEG (Tabela 5.2). Para a NPOFe-P-SiO₂, a fase predominante foi a da sílica amorfa, já que essas NPs possuem uma camada espessa de sílica ao redor do núcleo de óxido de ferro. Além do mais, o porta-amostra utilizado na medida é composto por vidro, o que também influenciou nos difratogramas de algumas NPs, aparecendo um pequeno sinal em ângulos mais baixos (< 30 °).

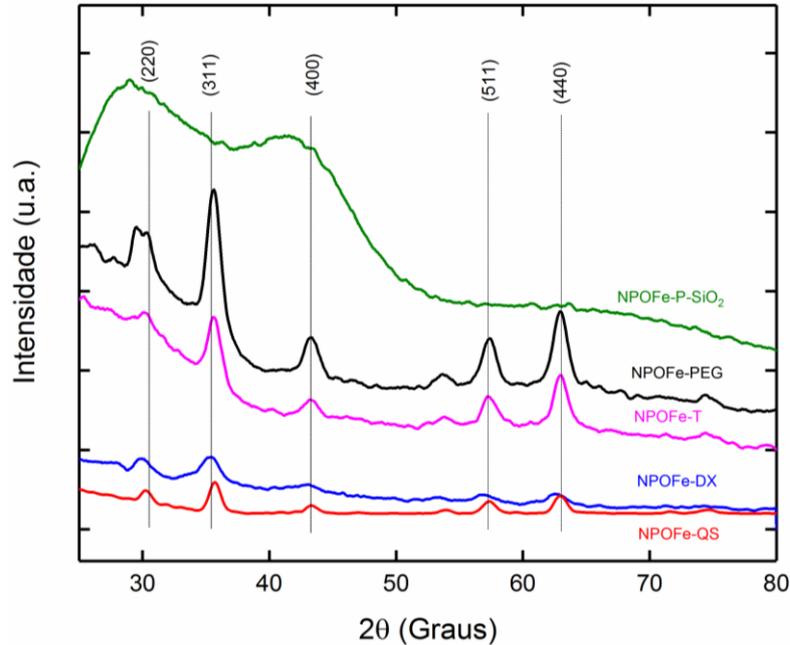


Figura 5.15. Difratoograma de RX das NPOFe com os diferentes revestimentos.

Os espectros de absorção na região do infravermelho e a tabela com as principais atribuições obtidas para as NPOFe com diferentes revestimentos estão descritos na Tabela 5.3 e na Figura 5.16. Os picos em, aproximadamente, $3421\text{-}3394\text{cm}^{-1}$ estão presentes nos espectros de todas as amostras, e correspondem a bandas de absorção do grupo hidroxila (OH) das estruturas dos diferentes revestimentos ligados à superfície das partículas. Os grupos hidroxila estão presentes nas estruturas dos polissacarídeos (dextrana e quitosana), na estrutura das NPs de óxido de silício, por sua superfície ter terminações do tipo Si-OH, bem como nas NPs que possuem moléculas com polietilenoglicol e o polissiloxano. Em seguida, as duas bandas de absorção formando dois picos consecutivos em $2919\text{-}2916\text{cm}^{-1}$, e também em $2855\text{-}2839\text{cm}^{-1}$, são atribuídos aos grupos metilênicos (CH_2) presente nas estruturas dos diferentes revestimentos, com exceção da amostra NPOFe-P-SiO₂. Os picos de bandas de absorção em torno de $600\text{-}488\text{cm}^{-1}$ são atribuídos à deformação das ligações Fe-O. Os picos descritos na região de 1710 e 1725cm^{-1} são dos grupos carbonila (C=O) presentes nas estruturas do polissiloxano, que estão presentes nas amostras NPOFe-T. Os picos descritos em 1069 e 1066cm^{-1} são atribuídos ao modo de deformação do anel α -glucopiranosose dos polissacarídeos. As bandas de absorção características de ligações Si-O-Si aparecem em frequências próximas de 1098cm^{-1} nas amostras NPOFe-P-SiO₂ e NPOFe-C-SiO₂ (não apresentado na Figura 5.16), 1984cm^{-1} na amostra

NPOFe-PEG e 1111 cm^{-1} na amostra NPOFe-T. Os picos em 953 e 949 cm^{-1} são referentes a vibrações de ligações Si-OH das amostras NPOFe-P-SiO₂, e NPOFe-T, respectivamente, enquanto que para a amostra NPOFe-PEG está deslocado para 797 cm^{-1} . As NPOFe-DX e NPOFe-QS (que passaram por um processo de aminação), têm a presença de grupos amina (NH₂), em torno de 1630 - 1640 cm^{-1} . O pico de absorção em 1630 cm^{-1} pela presença de grupos amina primária e pico em 1540 - 1553 cm^{-1} é devido a presença de grupo amida, observado na amostra NPOFe-PEG (devido a reação dos grupos amina da molécula amino-PEG com os grupos carboxilas do TEPSA) e nas amostras NPOFe-QS.

Tabela 5.3. Posições das bandas e atribuições dos espectros FTIR das NPOFe com diferentes revestimentos.

Amostras	Atribuições							
	Número de onda (cm^{-1})							
	OH	CH ₂	Fe-O	C=O	Si-O-Si/Si-OH	C-H	N-H	N-C=O
NPOFe-DX	3394	2920 / 2855	587	-	-	1066	1634	-
NPOFe-QS	3403	2920 / 2839	600	-	-	1069	1630	1553
NPOFe-T	3412	2916 / 2848	636	1710	1111 / 949	-	-	-
NPOFe-PEG	3417	2916 / 2851	636	-	-	1084	1639	1540
NPOFe-P-SiO₂	3421	-	466	-	1098 / 953	-	-	-

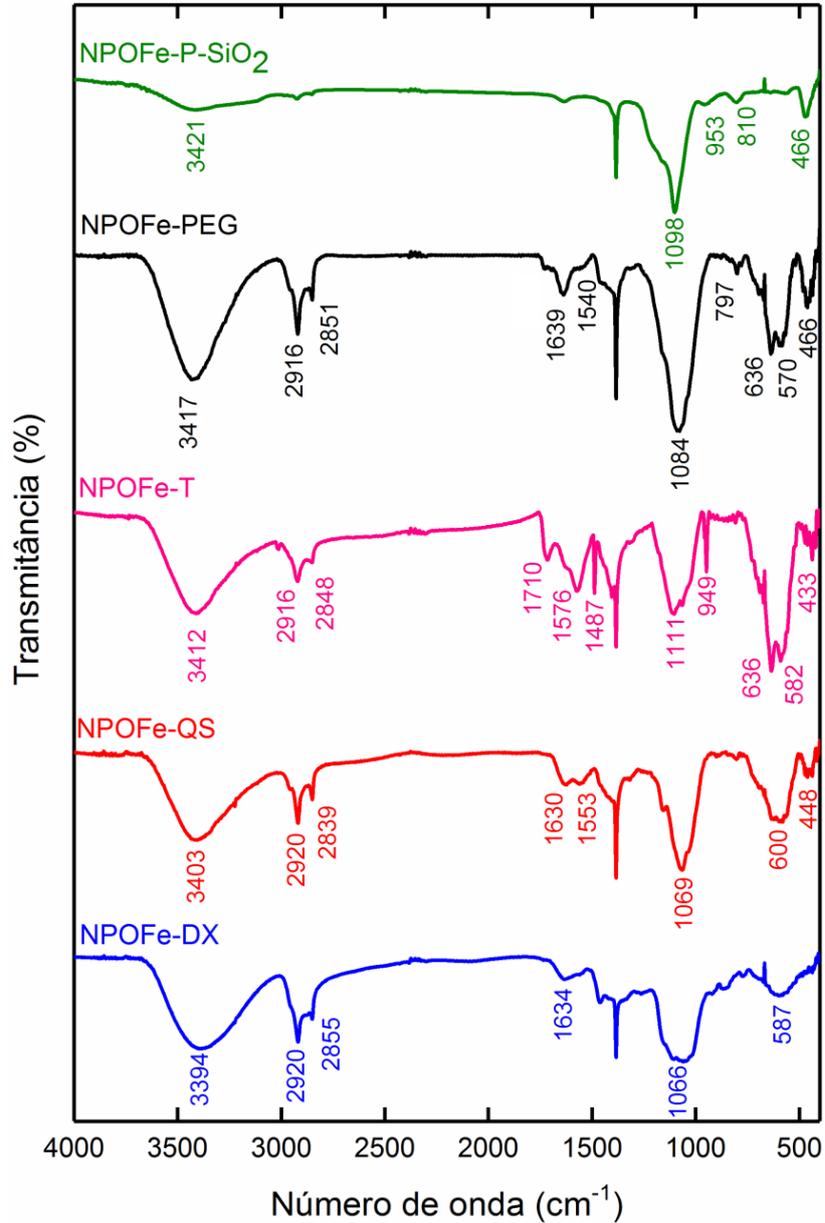


Figura 5.16. Espectro de infravermelho das NPOFe com os diferentes revestimentos.

5.4. Propriedades coloidais e estabilidade das nanopartículas de óxido de ferro com os diferentes revestimentos

O gráfico da Figura 5.17 apresenta a distribuição de tamanho (com ponderação em número) obtido por DLS das soluções aquosas das NPOFe com os diferentes revestimentos. Os valores dos diâmetros hidrodinâmicos médios obtidos foram de 22,0 nm para as NPOFe-DX, de 23,3 nm para as NPOFe-QS, de 10,2 nm para as NPOFe-T, de 13,8 nm para as NPOFe-PEG, 35,9 nm para as NPOFe-P-SiO₂ e de 207,2

nm para NPOFe-C-SiO₂. As NPOFe-C-SiO₂ apresentaram uma baixa solubilidade em água e distribuição de tamanho larga.

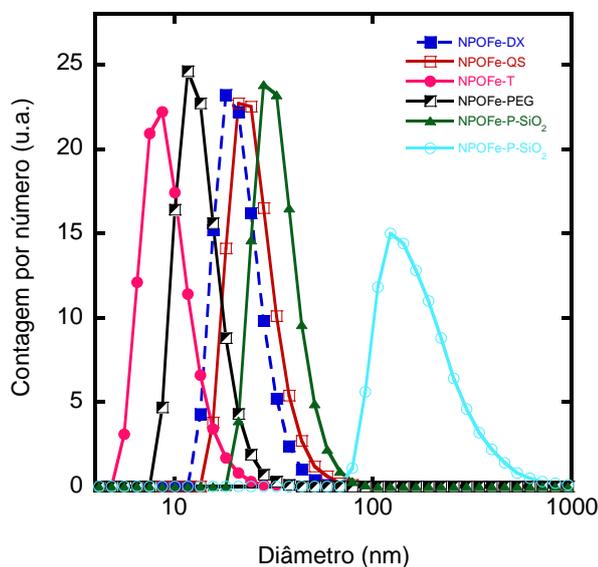


Figura 5.17. Distribuição de tamanho por DLS das NPOFe-DX (■), NPOFe-CS (□), NPOFe-T (●), NPOFe-PEG (▣), NPOFe-P-SiO₂ (▲) e NPOFe-C-SiO₂ (○) em solução aquosa, T= 25°C, nos pH _{finais} (Tabela 5.2).

Os valores de potencial zeta obtidos pela análise de mobilidade eletroforética diferiram entre si, de acordo com o tipo de revestimentos. Observou-se para as NPOFe-DX um potencial zeta de +11,6, possivelmente devido a presença de grupos NH₃⁺ na superfície da dextrana após processo de aminação. Trabalhos já realizados em nosso grupo (anexo 1; artigo 4) mostraram diferenças no potencial zeta das NPs revestidas com dextrana pela presença ou não das etapas de reticulação e aminação. Há um deslocamento do potencial zeta para valores negativos ($\zeta = -6,38$ mV) na ausência da etapa de reticulação e aminação. Observou-se também, através de análises térmicas, que a reticulação deslocou a temperatura inicial de degradação da dextrana para temperaturas mais altas ($\Delta T \sim 40$ °C), resultando então numa estrutura mais resistente a variações de temperatura. E também observado carga superficial positiva para as NPOFe-QS ($\zeta = +58,7$ mV), pela quitosana apresentar grupos amino em sua estrutura, em pH ácido.⁸⁸ Para as NPOFe-T o sinal negativo foi observado devido a presença da camada carboxilada do polissiloxano ($\zeta = -37,0$ mV).⁶² Para as NPOFe-

PEG, NPOFe-C-SiO₂ e NPOFe-P-SiO₂, o sinal de carga negativo é devido a presença de grupos hidroxilas na superfície das NPs.^{62,65}

A Figura 5.18A apresenta o gráfico da titulação do potencial zeta das partículas com diferentes revestimentos em função do pH, com adições de solução ácida ou básica e a Tabela 5.4 apresenta as medidas de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico das partículas em pH=7 e seus respectivos pontos isoelétricos (PI).

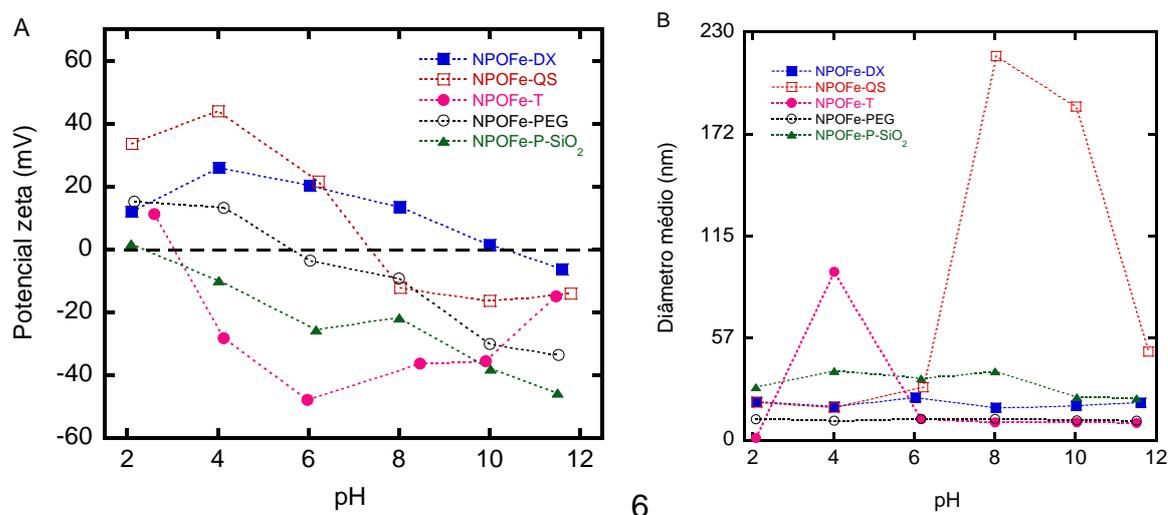


Figura 5.18. Gráfico da titulação do potencial zeta das NPOFe-DX (■), NPOFe-QS (□), NPOFe-T (◆), NPOFe-PEG (●), NPOFe-P-SiO₂ (▲) em função do pH. (A); e acompanhamento da distribuição de tamanho em função do pH (B).

De acordo com a literatura, quanto maior for o valor do potencial zeta, melhor é a estabilidade das NPs.^{218,219} Observa-se que a partir de pH ~ 6, o diâmetro hidrodinâmico das NPOFe com revestimentos não foi alterado de maneira expressiva, bem como os valores dos diâmetros hidrodinâmicos médio em pH neutro (pH=7) (Tabela 5.4), não havendo muitas diferenças, com exceção da amostra NPOFe-QS. Nas dispersões NPOFe-QS, quando o pH da amostra está em ~7, gera um enorme aumento no diâmetro hidrodinâmico médio. Observou-se que as NPOFe-QS se tornam mais estáveis em valores de pH baixo. Nessa faixa de pH o grupamento amino estar protonado, dando maior estabilidade para a molécula.²²⁰

Tabela 5.4. Tabela com os valores de potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico médio em pH=7, pH_{final} e seus pontos isoelétricos.

Amostras	Potencial zeta (mV)*	Diâmetro (nm)*	Potencial zeta pH=7	Diâmetro (nm) (pH=7)	pH _{final} *	Ponto isoelétrico (PI)
NPOFe-C	-41,4	49,3	-44,0	70,0	8,4	2,43
NPOFe-P	+46,6	9,5	-1,61	112,7	5,0	6,92
NPOFe-DX	+11,6	22,0	+17,20	21,1	8,3	10,1
NPOFe-QS	+58,7	23,3	+7,18	112,0	3,71	7,33
NPOFe-T	-37,0	10,2	-43,8	11,5	7,7	3,02
NPOFe-PEG	-11,5	13,8	- 6,77	12,3	6,8	5,62
NPOFe-P-SiO₂	-19,5	35,9	-24,6	35,7	5,6	5,62

*pH_{final} relativos a solução de NPOFe numa concentração de Fe de 10 mmol.L⁻¹.

A Tabela 5.5 mostra os valores do diâmetro hidrodinâmico médio das NPOFe com os diferentes revestimentos em solução de água ultrapura (Milli-Q), de buffer PBS e de água do sistema (osmose reversa equilibrada com sal marinho-Instant Ocean® utilizada na exposição das partículas ao peixe zebra). Isso permite uma comparação da estabilidade das partículas em meios normalmente utilizados em estudos biológicos.

Tabela 5.5. Diâmetro hidrodinâmico e condutividade elétrica das NPOFe com os diferentes revestimentos em H₂O, PBS e água do sistema.

Amostras	H ₂ O		PBS		H ₂ O do sistema	
	Diâmetro (nm)	Cond. elétrica (mS/cm)	Diâmetro (nm)	Cond. elétrica (mS/cm)	Diâmetro (nm)	Cond.elétrica (mS/cm)
NPOFe-DX	22,0	0,0262	20,8	2,08	17,2	0,358
NPOFe-QS	23,3	0,0442	65,8	1,88	28,8	0,432
NPOFe-T	10,2	0,0119	11,1	1,99	11,4	0,320
NPOFe-PEG	13,8	0,0265	18,1	2,17	15,6	0,322
NPOFe-P-SiO₂	35,9	0,0369	32,4	2,17	48,2	0,315

Observaram-se apenas pequenas diferenças nos diâmetros hidrodinâmicos das NPOFe nos diferentes meios aquosos nos casos das NPOFe-DX, NPOFe-T e NPOFe-PEG. As NPOFe-QS foram a mais sensível à salinidade com mudanças de quase um fator 3 no diâmetro em PBS quando comparada com água ultrapura (Milli-Q).

A Figura 5.19A apresenta o diâmetro hidrodinâmico médio, em solução aquosa, das NPOFe-DX, NPOFe-T e NPOFe-PEG medidas durante dias consecutivos. Observaram-se apenas pequenas oscilações nos diâmetros hidrodinâmicos médios das partículas, sem uma tendência clara de aumento com o tempo. Em termos de comparação da estabilidade das NPs para um período de 24 h, a Figura 5.20B apresenta uma comparação do diâmetro médio das NPOFe-C com as NPOFe-DX realizada em trabalhos paralelos.¹⁹⁸ Observou-se estabilidade das NPs a partir do tempo de 12 h horas.

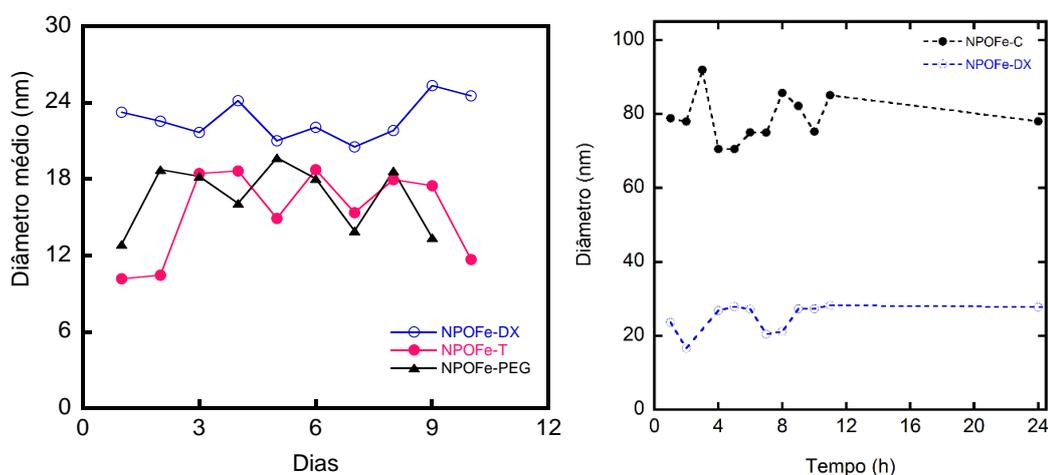


Figura 5.19. Diâmetro médio das NPOFe-DX (○), NPOFe-T (●) e NPOFe-PEG (▲) em solução aquosa medidas durante 10 dias (A). Comparação do diâmetro médio das NPOFe-C e NPOFe-DX durante 24h.

5.5. Propriedades magnéticas

5.5.1. Curvas de magnetização

As propriedades magnéticas das NPOFe antes e após os revestimentos foram avaliadas por VSM. A curva de magnetização (M) em função do campo magnético

externo (H), na temperatura ambiente, é apresentada na Figura 5.20 e os respectivos valores de magnetização de saturação (M_s). Os valores estão descritos na Tabela 5.6. As NPOFe sem revestimento apresentaram valores de magnetização de saturação de 61,8 e 38,1 emu/g para NPOFe-C e NPOFe-P, respectivamente, e para comparação, o valor da magnetização de saturação de uma NPOFe sem revestimento comercial (NPOFe-Padrão) foi de 75 emu/g. Os valores de magnetização de saturação das NPOFe sem revestimento são inferiores em relação a magnetita *bulk* (100-85 emu/g)⁸. As curvas de magnetização das NPOFe sem revestimento não mostraram magnetização residual em campo magnético externo, nem histerese, resposta magnética característica de comportamento superparamagnético.

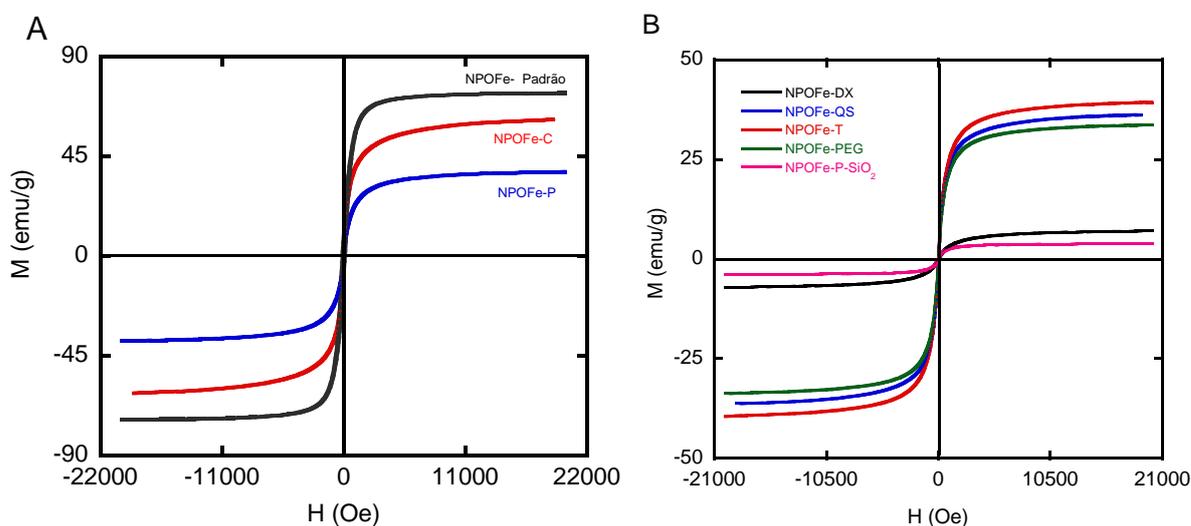


Figura 5.20. Curvas de magnetização em função do campo magnético à temperatura ambiente das NPOFe puras (NPOFe-C, NPOFe-P e NPOFe Padrão) (A). Curvas de magnetização em função do campo magnético à temperatura ambiente das NPs com diferentes revestimentos (B).

As NPOFe com os diferentes revestimentos também mostraram comportamento superparamagnético, indicando que as propriedades magnéticas das NPs se conservaram mesmo após as etapas de modificação de superfície, mas com valores de magnetização de saturação inferior às NPOFe sem revestimento. Esse resultado é esperado, pois a magnetização de saturação é medida por unidade de peso da amostra, não de ferro, e leva-se em consideração a presença de componentes não magnéticos (camada diamagnética) na superfície do núcleo de óxido de ferro.

Tabela 5.6. Valores de magnetização de saturadas das NPOFe sem e com os diferentes revestimentos.

Amostras	Magnetização de saturação (emu/g)
NPOFe-Padrão	75,0
NPOFe-C	61,8
NPOFe-P	38,1
NPOFe-DX	7,04
NPOFe-QS	36,4
NPOFe-T	39,5
NPOFe-PEG	33,8
NPOFe-P-SiO ₂	3,81

5.5.2. Relaxividade magnética nuclear

Para investigar a eficiência das NPOFe como agentes de contraste, as relaxividades r_1 e r_2 (taxas de relaxação $R_2=1/T_2$ e $R_1=1/T_1$ por concentração de Fe em mM (mmol.L^{-1}) em dispersões aquosas com as NPs foram medidas em campos magnéticos de 0,47 e 1,47 T (equivalentes a frequências de ressonância de 20 e 60 MHz), usando um relaxômetro. As medições de relaxação magnética nuclear das NPs também foram realizadas num equipamento de MRI clínico de 1,5 T (equivalente a frequência de 61,22 MHz). Um conjunto de imagens utilizando sequências de *fast spin eco*, com bobinas receptoras de cabeça foram realizadas para se obter os mapas de T1 e de T2 das regiões de interesse (metodologia descrita no item 4.5.7). Um tempo de eco efetivo (TE) variável foi usado para obter curvas de relaxação T2 e de imagens de recuperação de inversão rápida com diferentes valores de tempo para inversão (TI) para obter os valores de T1.

As medidas foram realizadas em temperatura de 37 °C no relaxômetro e temperatura ambiente no equipamento de MRI. As relaxividades obtidas estão apresentadas na Tabela 5.7.

Uma imagem típica de MRI de uma fatia com seringas com suspensões em cinco concentrações diferentes de ferro para três NPs está ilustrado na Figura 5.21. Observa-se diferença no contraste pelo nível de cinza, sendo que com o aumento de concentração de NPs a intensidade de sinal decai mais rapidamente.

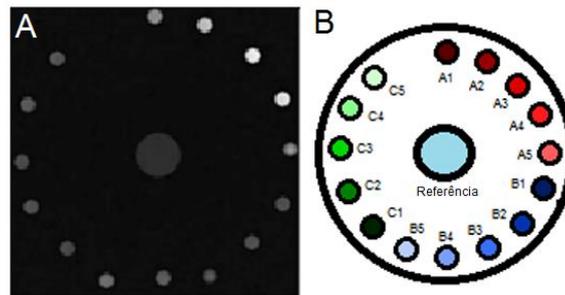


Figura 5.21. Imagem de ressonância magnética (FSE com TR = 1000 ms e TE = 7,4 ms) do *phantom* mostrando dispersão de três NPs em diferentes concentrações (A) e ilustração do *phantom* com a localização das NPs; A1-A5 são NPOFe-DX, B1-B5 são as NPOFe-T, são as C1-C5 NPOFe-PEG).

As Figuras. 5.22 a 5.26 mostram curvas de intensidade de sinal $S(t)$ como uma função de TE e TI para as diferentes NPs. Os tempos de relaxação T2 foram extraídos ajustando a equação do sinal em função de TE, e os tempos de recuperação T1 foram obtidos ajustando à curva da intensidade do sinal em uma função de TI, utilizando as equações 3.5 e 3.6. Esse procedimento foi repetido para cada concentração.

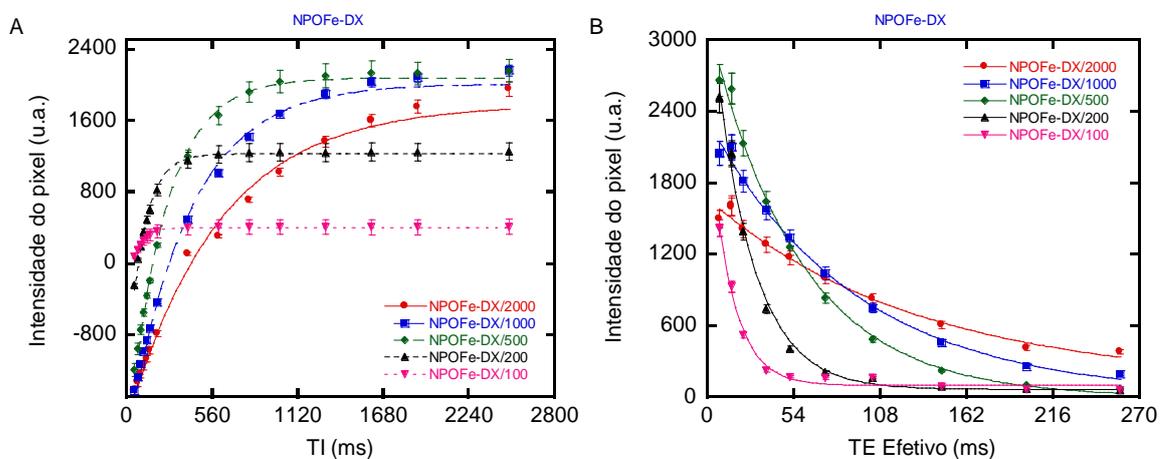


Figura 5.22. Intensidade do pixel em função de TI efetivo (A) e TE (B) para soluções aquosas com diferentes concentrações de NPOFe-DX.

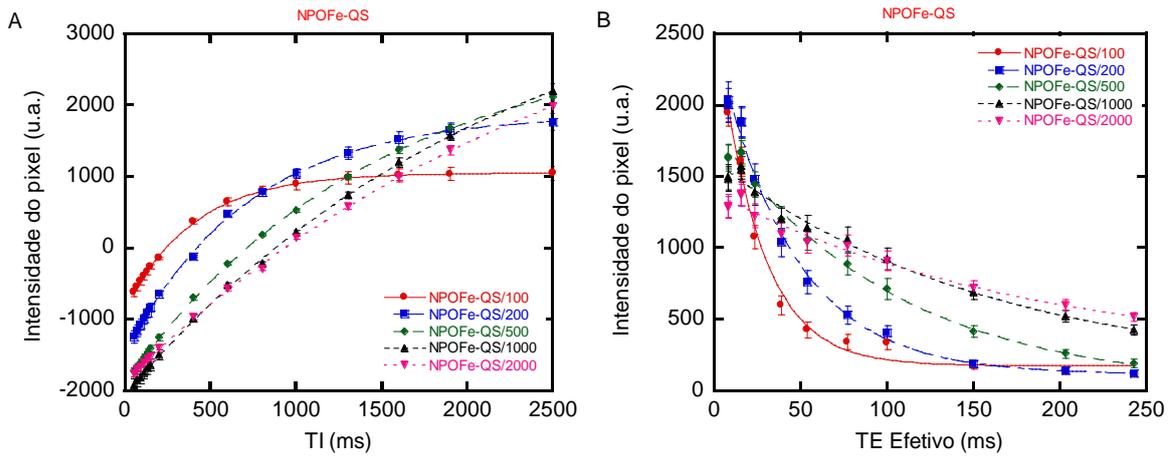


Figura 5.23. Intensidade do pixel em função de TI efetivo (A) e TE (B) para soluções aquosas com diferentes concentrações de NPOFe-QS.

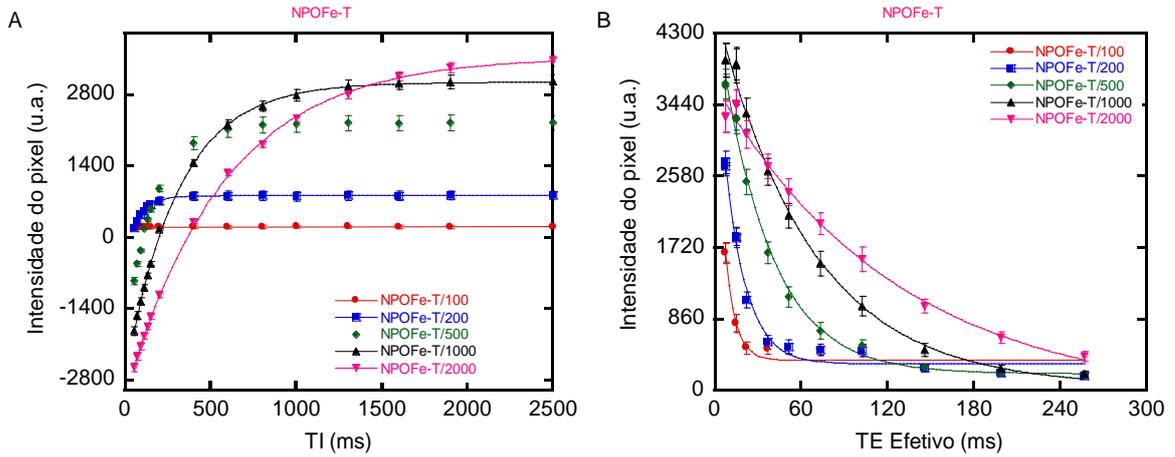


Figura 5.24. Intensidade do pixel em função de TI efetivo (A) e TE (B) para soluções aquosas com diferentes concentrações de NPOFe-T.

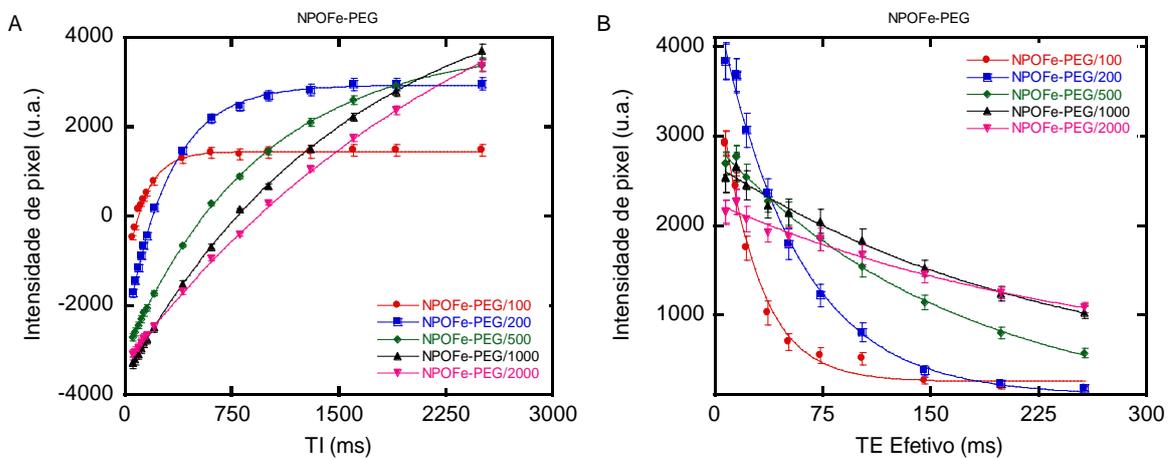


Figura 5.25. Intensidade do pixel em função de TI efetivo (A) e TE (B) para soluções aquosas com diferentes concentrações de NPOFe-PEG.

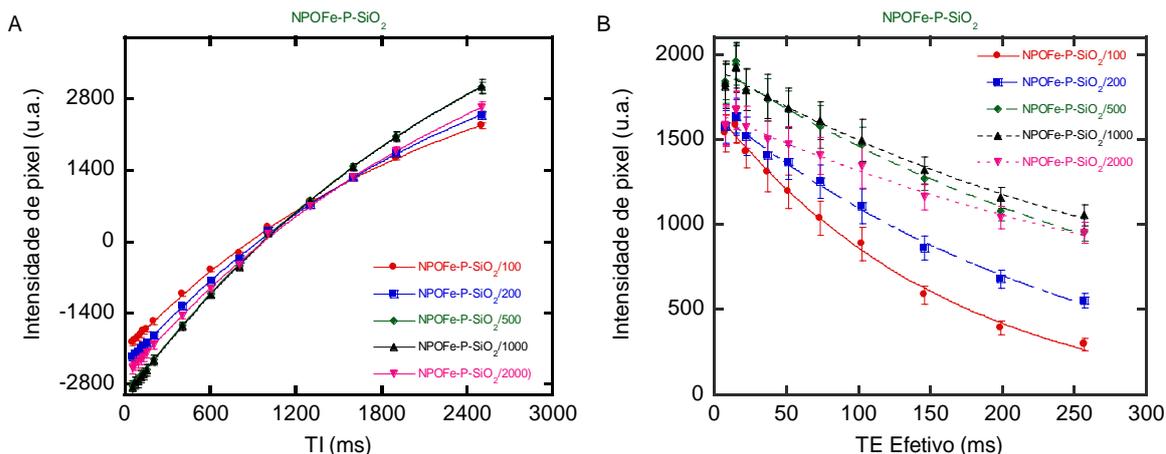


Figura 5.26. Intensidade do pixel em função de TI efetivo (A) e TE (B) para soluções aquosas com diferentes concentrações de NPOFe-P-SiO₂.

Os resultados dos ajustes são apresentados em função da concentração (Figura 5.27) na forma das taxas de relaxação correspondentes $R1=1/T1$ e $R2=1/T2$. A declividade das retas nos gráficos das Figuras 5.27 representa a relaxividade r_1 ou r_2 , as quais são resumidas na Tabela 5.7.

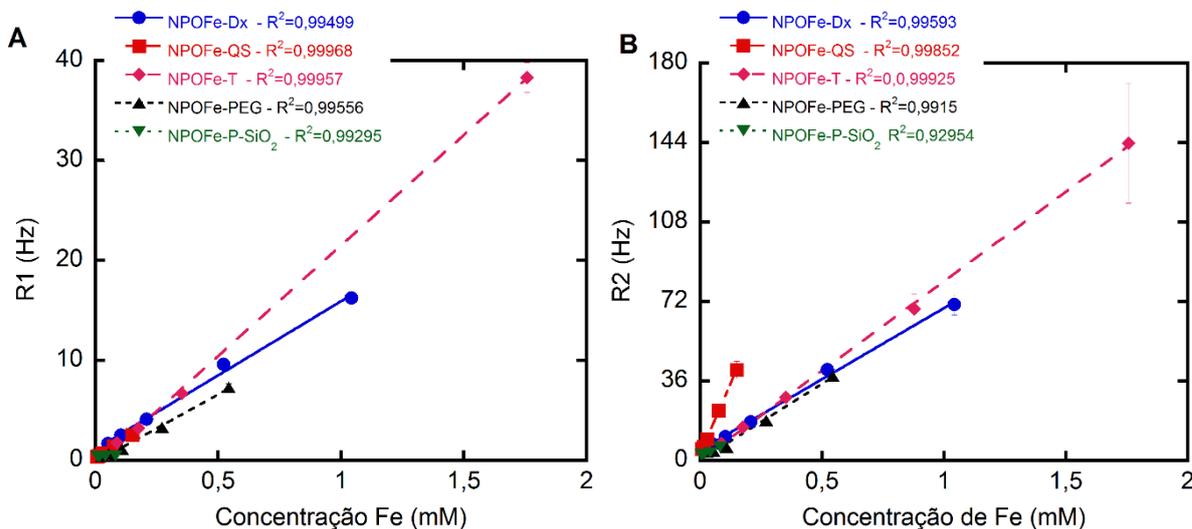


Figura 5.27. Taxas de relaxação R1 (A) e R2 (B) em função da concentração de ferro para as NPOFe-DX, NPOFe-QS, NPOFe-T, NPOFe-PEG e NPOFe-P-SiO₂.

Tabela 5.7. Valores de relaxividade das soluções aquosas das NPOFe em 20, 60 MHz e 61,22 MHz.

Amostras	20 MHz - 0,47 T			60 MHz - 1,47 T			61,22 MHz - 1,5 T- MRI Clínico		
	r ₁	r ₂	r ₂ /r ₁	r ₁	r ₂	r ₂ /r ₁	r ₁	r ₂	r ₂ /r ₁
NPOFe-C	31,4	194,2	6,29	12,9	271,4	20,9	47,8	148,1	3,13
NPOFe-P	42,5	82	1,93	21,1	91,42	4,32	-	-	-
NPOFe-DX	33,4	63,6	1,9	16,3	68,4	4,18	11,4	60,2	5,3
NPOFe-QS	48	242,1	5,04	17,51	254,6	14,5	19,8	343,3	17,3
NPOFe-T	38,08	77,7	2,04	18,39	76,6	4,18	19,94	80,4	4,03
NPOFe-PEG	27,2	60,2	2,21	12,6	64,3	5,09	12,10	67,1	5,54
NPOFe-P-SiO ₂	6,33	69,8	11,0	2,07	70,5	34,1	1,16	65,3	56,3

As NPOFe sem revestimentos apresentaram valores maiores de relaxividades, o que podem ser relacionados a aproximação de moléculas de água ao núcleo magnético, acelerando o tempo de relaxação magnética dos prótons da água. Outro fator é a maior instabilidade coloidal dessas partículas, que se agregam mais facilmente e, conseqüentemente sua magnetização também aumenta, aumentando as taxas de relaxação.²²¹

As NPOFe com os diferentes revestimentos apresentaram valores de relaxividades em geral menores do que as NPs sem revestimentos. Porém, se observou nas NPOFe-QS um grande aumento nas relaxividades, possivelmente também devido a efeitos de agregação. As NPOFe-DX, NPOFe-T e NPOFe-PEG não apresentaram diferenças significativas nos valores de relaxividade e os valores de r₂ variaram de ~ 64-76 mM⁻¹.s⁻¹ e os valores de r₁ foram semelhantes (~ 12 a 18 mM⁻¹.s⁻¹), possivelmente devido características físico-química similares (tamanho do núcleo magnético, diâmetro hidrodinâmico). As NPOFe-P-SiO₂ apresentaram valores de relaxividade r₂ similares às demais NPs com revestimento, porém valores de relaxividade r₁ diferentes (2,1 mM⁻¹.s⁻¹). Isso ocorre provavelmente devido ao revestimento de sílica ser mais denso, o que leva um menor acesso dos prótons das moléculas de água ao núcleo magnético.²²² Os resultados das relaxividades analisados por dois métodos diferentes, com campos magnéticos similares (relaxômetro de 1,47 T e MRI clínico de 1,5 T), apresentaram valores próximos.

A eficiência de um agente de contraste para MRI é avaliada de acordo com o valor das relaxividades r_1 e r_2 . Já a razão entre a relaxividade transversal e longitudinal (r_2/r_1) é um parâmetro de definição que indica se o material pode ser utilizado como um agente de contraste positivo ou negativo. Os agentes de contraste denominados positivos possuem relaxividade r_2/r_1 com valores baixos (~ 1). Os agentes de contraste denominados negativos, tem $r_2/r_1 > 1$. A relação entre as relaxividades r_2/r_1 encontradas para as NPOFe com os diferentes revestimentos, medidos em frequências diferentes, são descritas na Tabela 5.7. Como esperado, os valores de relaxividade r_2 para todas as NPs foram predominantemente maiores do que r_1 , característico de agentes de contraste tipo T2 ou negativo. A razão das relaxividades r_2/r_1 obtidas para as NPOFe-DX, NPOFe-T e NPOFe-PEG foram menores que 10, dentro do intervalo típico de agentes de contraste de óxido de ferro ultra-pequenos (USPIONS), com exceção das NPOFe-QS e NPOFe-P-SiO₂ devido, respectivamente, a sua instabilidade e ao pouco sinal magnético apresentado.

No geral, os valores de relaxividades das NPs sintetizadas nesse trabalho são próximas aos encontrados para agentes de contraste de óxido de ferro comercialmente disponíveis.^{24,204,223}

5.6. Propriedades fotofísicas das nanopartículas magnetofluorescentes

As NPOFe-C-SiO₂ foram acopladas às moléculas 2'OH-BTA-Si, um derivado do hidroxibenzotiazol que fluoresce com mecanismo por ESIPT. Inicialmente, utilizou-se essa estratégia de síntese para testarmos a possibilidade de acoplamento do 2'OH-BTA-Si às NPs, já que ambas moléculas fluorescentes possuem estruturas químicas similares (Figura 4.1). Portanto, foi estudado o comportamento fotofísico da molécula 2'OH-BTA-Si, na presença de NPOFe não revestidas (NPOFe-C) quando em solução, e posteriormente seu comportamento quando ligada às NPs revestidas com sílica (NPOFe-C-SiO₂).

A molécula 2'OH-BTA-Si possui terminação trietóxissilano que reage diretamente com os grupos silanóis da sílica, formando ligações covalentes (Figura 5.28)

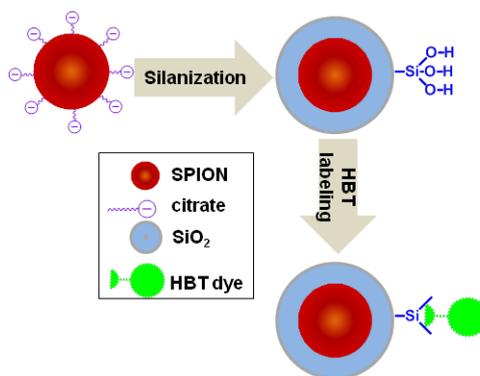


Figura 5.28. Esquema representativo das etapas do processo de síntese das NPOFe-P-SiO₂-BTA-Si (adaptado da ref. 130).

A fim de investigar como as NPOFe afetam o comportamento fotofísico do 2'OH-BTA-Si, foram realizadas medidas de absorção e emissão do corante na presença de dois solventes: clorofórmio e etanol, que favorecem a emissão de ceto e enol, respectivamente. Em cada medida, foram adicionadas sucessivas alíquotas de NPOFe-C, em diferentes concentrações de Fe. Os respectivos espectros estão apresentados na Figura 5.29 e Figura 5.30.

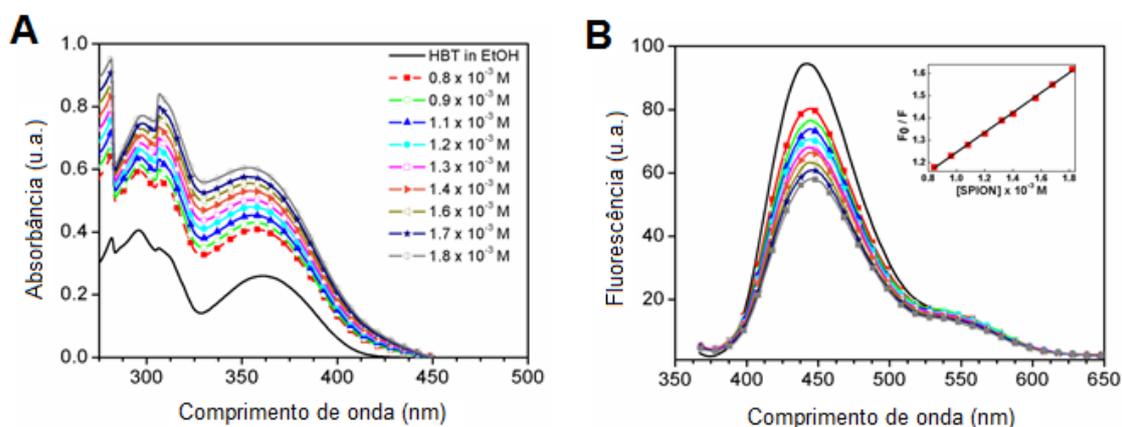


Figura 5.29. Espectro de absorção (A) e emissão (B) do 2'OH-BTA-Si a 1×10^{-4} M em etanol após adições sucessivas de NPOFe-C nas concentrações de 0 a 1,8 mM. Inseto do gráfico: gráfico de Stern-Volmer F_0/F versus concentração de Fe ($R^2 = 0,9987$) monitorado no máximo de emissão enol ($\lambda = 440$ nm).

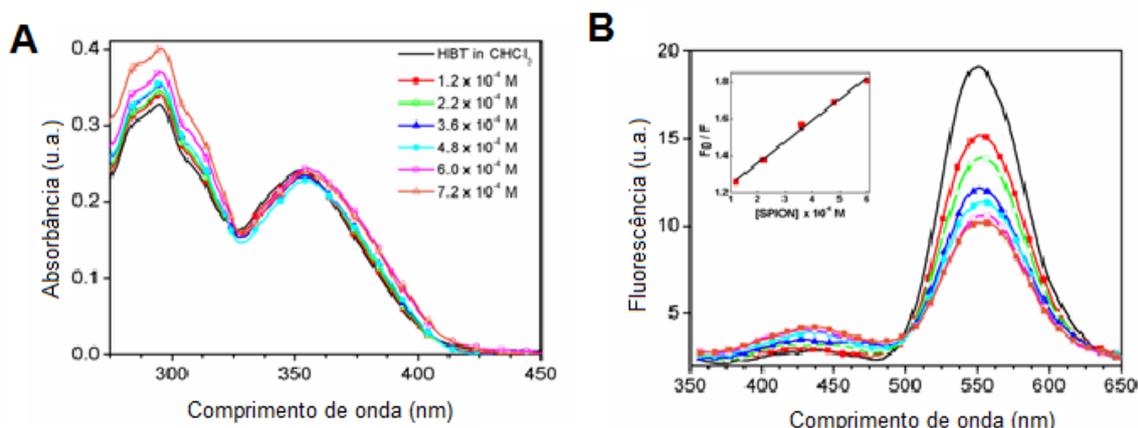


Figura 5.30. Espectro de absorção (A) e emissão (B) do 2'OH-BTA-Si a 1×10^{-4} M em clorofórmio após adições sucessiva de NPOFe-C nas concentrações de 0- $7,2 \times 10^{-4}$ M. Inserção do gráfico: gráfico de Stern-Volmer F_0/F versus concentração de Fe ($R^2 = 0,9943$) monitorada no máximo emissão de ceto ($\lambda=550$ nm).

Os espectros de absorção do 2'OH-BTA-Si apresentaram comportamentos diferentes nos dois solventes. Em etanol, houve um aumento gradual na absorbância na medida que foram adicionadas as alíquotas da NPOFe-C, mas para o clorofórmio a absorbância permaneceu basicamente inalterada. Isto é indicativo de que o etanol promove uma interação eletrônica mais forte entre as moléculas do corante e as NPs, do que o próprio clorofórmio. Observou-se também que a forma e a posição das bandas de absorção dos espectros não mostraram mudanças significativas na presença das NPs.

Os espectros de emissão de do 2'OH-BTA-Si em etanol e clorofórmio apresentaram duas bandas distintas: uma em 440 nm relacionada à emissão enol e outra em 550 nm relacionada ao tautômero ceto. A intensidade relativa de cada banda variou com o solvente, sendo no solvente clorofórmio a banda ESIPT em 550 nm foi mais intensa, com deslocamento de Stokes de 197 nm, enquanto que em solvente etanol a banda foi menos intensa com deslocamento de Stokes de 80 nm. O aumento da concentração de NPOFe-C na solução de 2'OH-BTA-Si, levou a uma progressiva diminuição da fluorescência enol e ceto, ocorrendo *quenching* (anulação de fluorescência). As constantes de Stern-Volmer para analisar os dados de *quenching* do 2'OH-BTA-Si na presença das NPOFe-C, de acordo com a equação Equação 5.2:

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] \quad (5.2)$$

na qual F_0 e F são as intensidades de fluorescência do corante na ausência e na *quencher* (NPs), respectivamente, K_{SV} é a constante de *Stern-Volmer* e $[Q]$ são as concentrações do *quencher*. Os gráficos de Stern-Volmer (inserção no gráfico das Figura 5.29 e 5.30) obtidas para os dois solventes são linearmente dependentes da concentração de NPs, com um coeficiente de correlação quase igual à unidade. Esses resultados, de acordo também com os dados dos espectros de absorção, indicam que o *quenching* de fluorescência do 2'OH-BTA-Si ocorre praticamente por desativação colisional. As constantes de *quenching* encontradas foram: $446,5 \text{ M}^{-1}$ e $1160,4 \text{ M}^{-1}$ em etanol e clorofórmio, respectivamente. Contudo, a emissão ceto é mais afetada pela presença das NPOFe do que seu tautômero enol. Para confirmação de que o mecanismo ocorre por desativação colisional, foi realizada a mesma medida de emissão de fluorescência anteriormente em etanol, porém a $40 \text{ }^\circ\text{C}$, já que o *quenching* estático e dinâmico podem ser distinguidos por suas dependências com a temperatura (Figura 5.31).

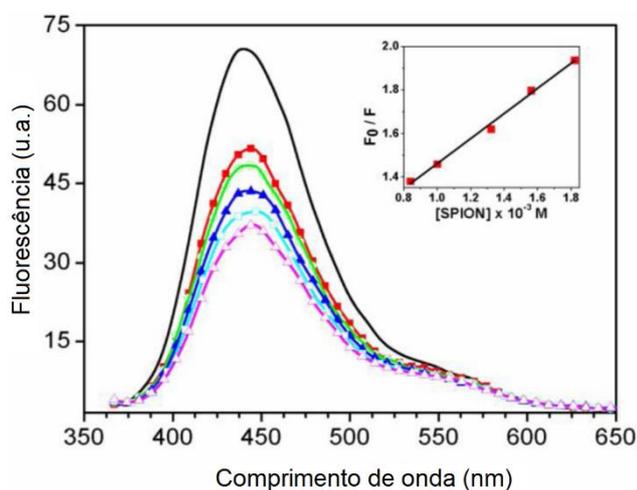


Figura 5.31. Espectro emissão de fluorescência do 2'OH-BTA-Si a $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ em etanol após adições sucessiva de NPOFe-C nas concentrações de 0-1,8 mM, medidos a $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Inserção do gráfico: gráfico de *Stern-Volmer* F_0/F versus concentração de Fe ($R^2 = 0,9938$) monitorado no máximo de emissão enol ($\lambda=440 \text{ nm}$).

O gráfico F_0/F versus a concentração da NPs resultou numa linearidade com inclinação da reta igual a 568 M^{-1} . O aquecimento da solução levou ao aumento da constante *quenching*, conforme esperado para o mecanismo de *quenching* dinâmico.

Embora a presença das NPOFe provoque *quenching* tanto para os tautômeros enol e ceto, a construção de uma NPs com uma estrutura do tipo *core-shell* pode conservar o processo ESIPT, isolando a núcleo magnético do próprio corante, formando o sistema NPOFe-C-Si-2'OH-BTA. A Figura 5.32 apresenta o espectro de emissão de fluorescência no estado sólido.

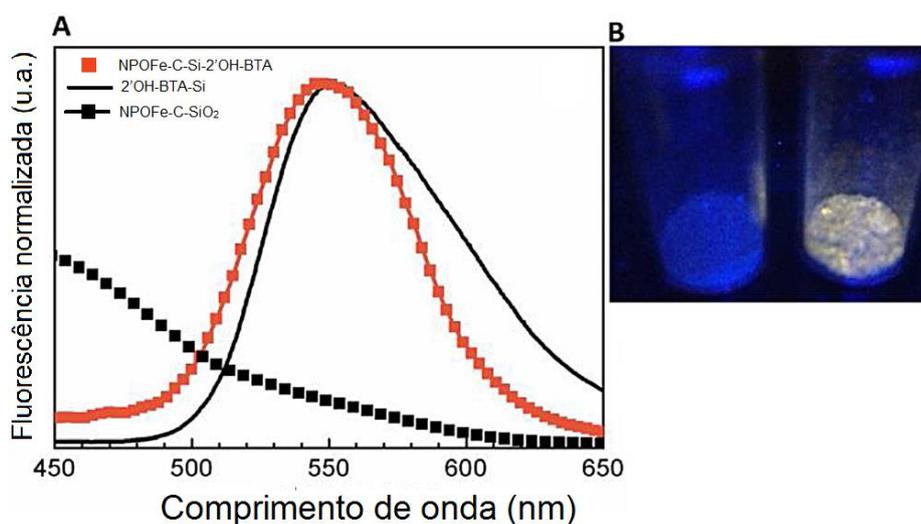


Figura 5.32. Espectro de fluorescência de estado sólido do 2'OH-BTA-Si, NPOFe-C-SiO₂ e NPOFe-C-Si-2'OH-BTA ($\lambda_{\text{exc}}=353 \text{ nm}$) (A). Imagem das NPOFe-C-SiO₂ e NPOFe-C-Si-2'OH-BTA exposto à luz ultravioleta (B).

O corante acoplado às NPs apresentou apenas uma banda de emissão de fluorescência em 550 nm, atribuída à mesma emissão do tautômero ceto observado para o 2'OH-BTA-Si sólido. A propriedade óptica do corante é quase inalterada após a formação da NPs *core-shell*, também observado pela imagem de fluorescência da Figura 5.32B, onde aparece a NPs sólida emitindo na cor amarela. O revestimento de sílica atuou como uma camada protetora contra o *quenching* de fluorescência, evitando interações colisionais entre o corante e os NPOFe. Mais detalhes podem ser vistos no artigo no anexo 1. As propriedades fotofísicas de moléculas que fluorescem por ESIPT

tem sido pouco estudado em ambientes magnéticos, e a partir desses resultados obteve-se um artigo, na qual aqui foi apenas descrito a parte de propriedades fotofísicas.¹³⁰

Já o acoplamento da molécula 6-OH-BTA-1 às NPOFe foi realizado apenas nos sistemas NPOFe-T e NPOFe-C-SiO₂. A molécula 6-OH-BTA-1 não fluoresce por mecanismos ESIPT. A Figura 5.33 apresenta os espectros de emissão das NPOFe-T e NPOFe-C-SiO₂ acopladas às moléculas 6-OH-BTA-1 e 6-OH-BTA-Si, respectivamente.

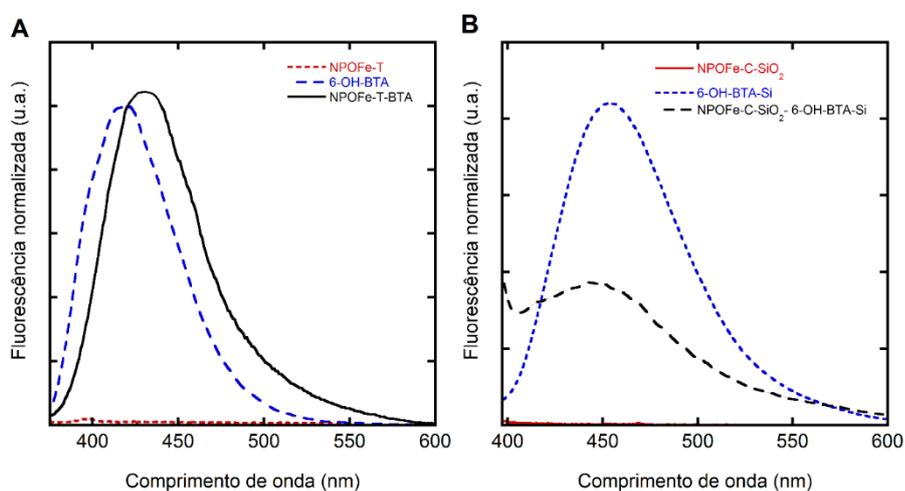


Figura 5.33. Espectros de fluorescência das moléculas 6-OH-BTA-1, NPOFe-T e NPOFe-T-BTA em solução aquosa (A). Espectros de fluorescência no estado sólido das moléculas puras de 6-OH-BTA-1, da NPOFe-C-SiO₂ e NPOFe-C-SiO₂-BTA-1. (B)

Observa-se que o corante acoplado às NPs apresentou banda de emissão de fluorescência em 430 nm para as NPOFe-T-BTA, com um pequeno deslocamento comprimentos de onda maior (deslocamento batocrômico), na região do vermelho devido a polaridade do solvente. Para as NPOFe-C-SiO₂-BTA-1 apresentou banda de emissão em 448 nm. Ambas NPs apresentaram valores próximos ao de emissão do corante puro. Esses dados confirmam o acoplamento do corante 6-OH-BTA às duas NPs.

5.7. Estudo da interação do 6-OH-BTA-1 com os peptídeos beta-amiloide

A Figura 5.34 mostra os espectros de absorção e de emissão de fluorescência para o 6-OH-BTA-1 em solventes de diferentes polaridades.

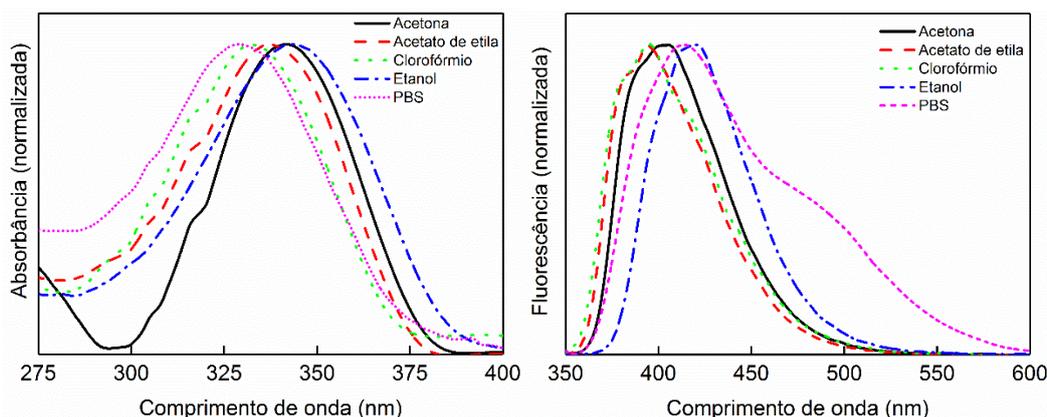


Figura 5.34. Espectros de absorção e de emissão de fluorescência do 6-OH-BTA-1 com $2,75 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em diferentes solventes.

A fluorescência intrínseca da molécula 6-OH-BTA-1 resulta de considerável conjugação- π estendida sobre toda a estrutura molecular. A presença de um grupo amino perturba a distribuição das cargas no estado excitado (LUMO) de forma que a transição (π , π^*) tem um caráter de transferência de carga.^{224,225,226}

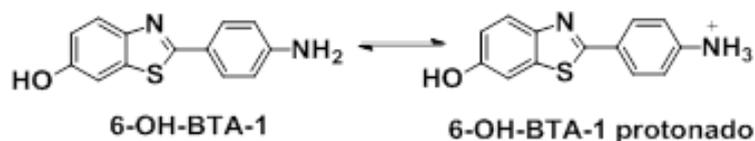


Figura 5.35. Estrutura do 6-OH-BTA-1 protonado.

Como observado em composto similares, o comprimento de onda máximo de absorção do 6-OH-BTA-1 é deslocado para o vermelho (deslocamento batocrômico) com o aumento da polaridade do solvente. Na presença do tampão PBS, ocorreu um deslocamento para o azul (deslocamento hipsocrômico), devido às fortes interações de hidrogênio intermoleculares com a água. Da mesma forma que os espectros de

absorção, o comprimento de onda do máximo de emissão sofre um deslocamento batocrômico, quando a constante dielétrica do solvente é maior, com exceção do tampão PBS (Tabela 5.9). No tampão PBS apresentou um ombro em 460 nm no espectro de emissão, provavelmente devido à formação de espécies monocatiônicas protonadas no grupo amino ($-\text{NH}_3^+$) (Figura 5.35).²²⁷

Tabela 5.8. Comprimentos de onda dos valores máximos de absorção e emissão de fluorescência do 6-OH-BTA-1 em diferentes solventes.

Solvente	EtOH	(CH ₃) ₂ CO	AcOEt	CHCl ₃	Tampão PBS
Constante dielétrica	24	21	6	4,8	80
λ_{ABS} (nm)	342	342	337	333	330
λ_{FL} (nm)	421	405	395	395	415 (460)

Os espectros de fluorescência em função da concentração de 6-OH-BTA-1 estão representados na Figura 5.36, juntamente com os gráficos de dependência da fluorescência com a concentração do 6-OH-BTA-1 na presença dos peptídeos amiloide na forma de monômero, oligômero e placa. Observou-se que a emissão de fluorescência do 6-OH-BTA-1 mantém uma relação linear com a concentração na faixa estudada (50-1000 nmol.L⁻¹). Na presença dos peptídeos amiloide, a titulação do 6-OH-BTA-1 também manteve uma relação linear, porém essa relação foi diferente dependendo da forma estrutural do peptídeo. A forma estrutural monomérica apresentou um comportamento semelhante ao 6-OH-BTA-1, mantendo a linearidade até a concentração de 1000 nmol.L⁻¹, enquanto que para as estruturas oligoméricas e placa a linearidade foi mantida até 400 nmol.L⁻¹. A titulação do 6-OH-BTA-1 na presença do peptídeo na forma de placa foi a que mostrou a pior relação de linearidade ($r = 0.97788$), indicando que houve uma interação maior em relação às outras formas.

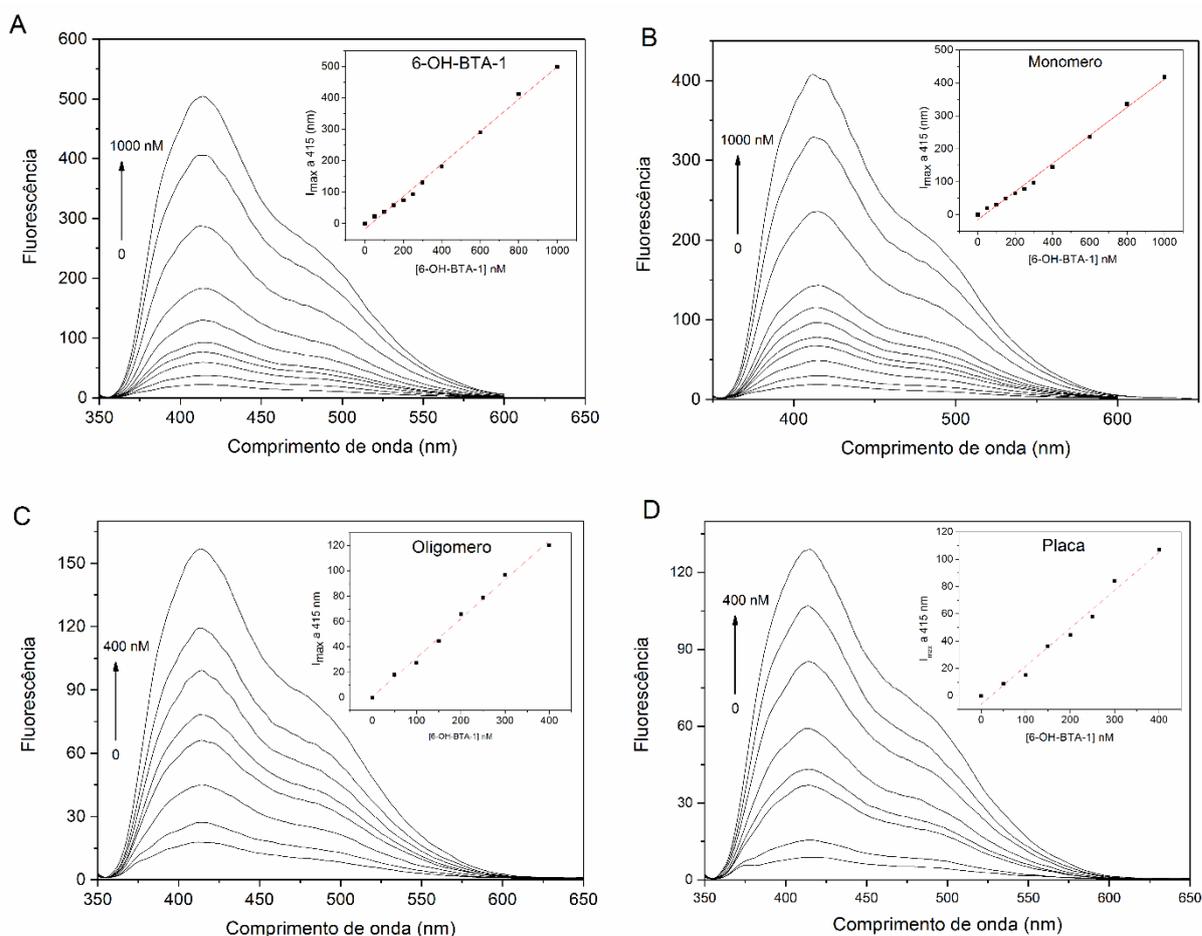


Figura 5.36. Espectros de emissão de fluorescência do 6-OH-BTA-1(A) em tampão PBS (50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 600, 800 e 1000 nmol.L^{-1}) e o efeito da titulação na presença dos peptídeos amiloides (10 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em PBS) na forma de monômero (B), oligômero (C) e placa (D) (50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 nmol.L^{-1} de 6-OH-BTA-1). $\lambda_{\text{exc}}=330 \text{ nm}$. Inserção do gráfico: gráficos da intensidade máxima em função da concentração de 6-OH-BTA-1 na presença dos peptídeos beta-amiloide.

Para compostos que revelam uma mudança significativa na sua fluorescência (seja em intensidade ou na posição da banda de emissão) em função da interação com peptídeos beta-amiloide, a constante de afinidade entre a molécula fluorescente e o peptídeo pode ser medida diretamente. De acordo com a literatura, foram determinadas as constantes de dissociação para a ThT (utilizadas para detectar seletivamente peptídeos amiloides) e para vários de seus compostos neutros utilizando a intensidade de fluorescência intrínseca.^{228,229,230} As constantes de dissociação são derivadas experimentalmente de isotermas de ligação, que dependem de métodos para medir a quantidade de ligante ligado ao peptídeo. Como a ThT e os peptídeos beta-

amiloide formam complexos não-covalentes, é possível medir a constante de dissociação (K_d) através de um gráfico que relaciona a intensidade de fluorescência do complexo peptídeo-ligante em função da concentração do ligante (Figura 5.37C).

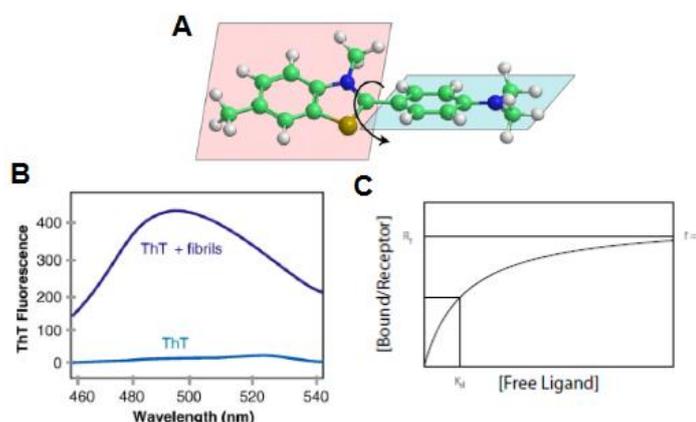


Figura 5.37. (A) Estrutura Thioflavina-T (ThT) e (B) seus espectros de fluorescência na ausência e na presença de fibrilas amiloides. (C) Isotherma de ligação usada para medir a constante de dissociação entre proteína-ligante (adaptado da ref. 231).

Observa-se nas medidas experimentais de intensidade de fluorescência *versus* concentração (Figura 5.37) que o 6-OH-BTA-1 não segue uma relação hiperbólica entre a saturação fracionada (f) *versus* a concentração do ligante. O desvio da forma hiperbólica da curva de ligação é evidência de fenômenos mais complicados, por exemplo vários sítios de ligação com diferentes afinidades. Além disso, o modelo hiperbólico usado no cálculo do K_d por medidas espectroscópicas somente se aplica se o ligante não apresenta fluorescência no meio de interação e passa a emitir depois de formar o complexo com o peptídeo, o que não é o caso do 6-OH-BTA-1. Portanto, utilizou-se as constantes supressão de fluorescência de *Stern-Volmer* para obter a K_d entre o 6-OH-BTA-1 e os peptídeos beta-amiloide.

A espectroscopia de fluorescência pode ser utilizada para determinação das constantes de associação (K_a) em sistemas supramoleculares quando apenas uma das espécies (ligante ou proteína) é fluorescentemente ativa.²³² A interação do 6-OH-BTA-1 com as diferentes formas do peptídeo amiloide foi avaliada pelo método de titulação por supressão de fluorescência. Não foi observada fluorescência proveniente

do peptídeo beta-amiloide nas três formas estruturais (dados não mostrados). Os dados de supressão de fluorescência foram tabelados de acordo com a equação de *Stern-Volmer* (Equação 5.2), já descrita anteriormente.

As Figuras 5.38, 5.39 e 5.40 apresentam a titulação dos peptídeos beta-amiloide em uma solução de 6-OH-BTA-1.

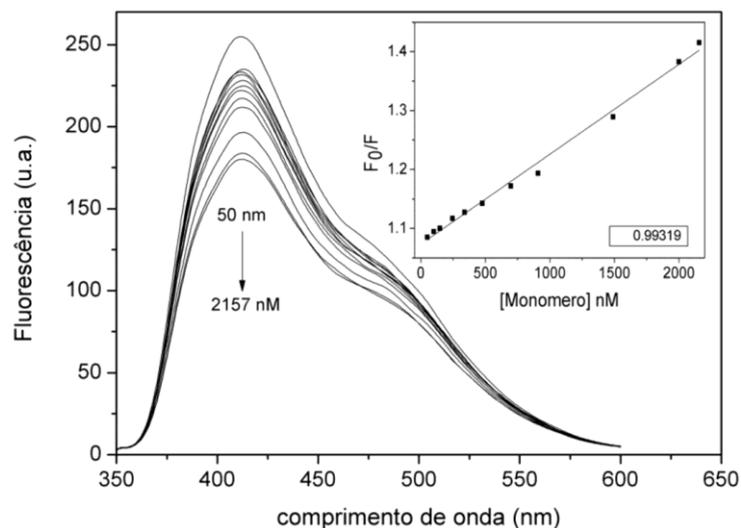


Figura 5.38. Dados de supressão de fluorescência do 6-OH-BTA-1 em tampão PBS (pH 7,0, 2,75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) quando titulado com os peptídeos beta-amiloide na forma de monômero em um volume final de 3 mL. ($\lambda_{\text{exc}}=330\text{ nm}$). Inserção do gráfico: gráfico da concentração do monômero em função de F_0/F .

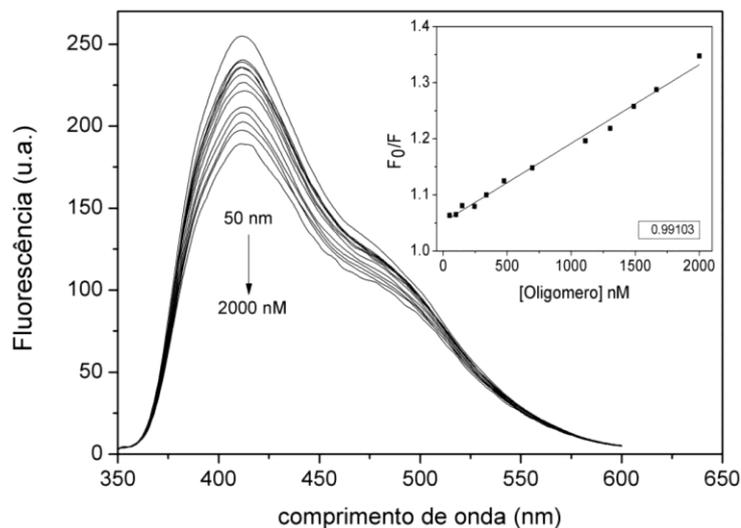


Figura 5.39. Dados de supressão de fluorescência do 6-OH-BTA-1 em tampão PBS (pH 7,0, 2,75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) quando titulado com os peptídeos beta-amiloide na forma de oligômero em um volume final

de 3 mL. ($\lambda_{exc}= 330$ nm). Inserção do gráfico: gráfico da concentração do oligômero em função de F_0/F .

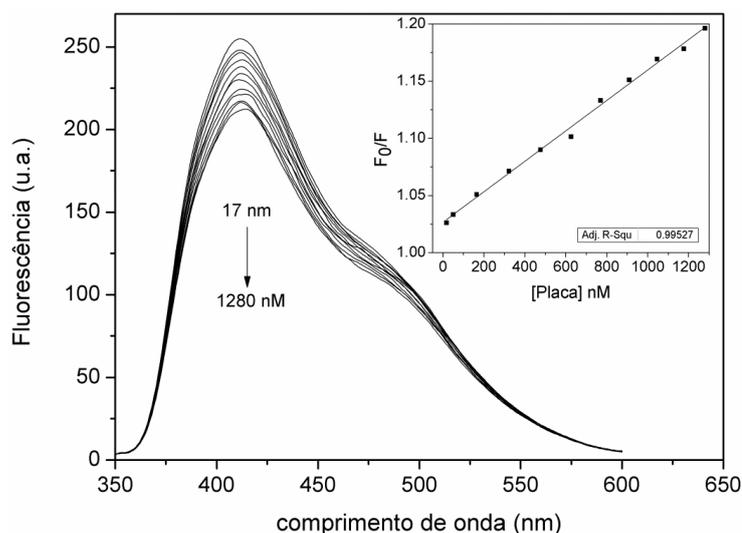


Figura 5.40. Dados de supressão de fluorescência do 6-OH-BTA-1 em tampão PBS (pH 7,0, 2,75 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) quando titulado com as proteínas amiloides na forma de placa em um volume final de 3 mL. ($\lambda_{exc}= 330$ nm). Inserção do gráfico: gráfico da concentração da placa em função de F_0/F .

Observou-se uma diminuição da intensidade de fluorescência do 6-OH-BTA-1, independente da forma do peptídeo presente. As constantes de *Stern-Volmer* (K_{SV}), estimadas a partir da inclinação das curvas de regressão linear obtida a partir da Equação 5.2, mostraram uma dependência linear com a concentração dos peptídeos com coeficientes de correlação próximos à unidade. Os valores encontrados foram de $1,53 \times 10^4 \text{ mM}^{-1}$, $1,40 \times 10^4 \text{ mM}^{-1}$ e $1,33 \times 10^4 \text{ mM}^{-1}$ para os peptídeos na forma de monômeros, oligômeros e placas, respectivamente. Assumindo um mecanismo de supressão de fluorescência do tipo estático (formação de um complexo no estado fundamental entre o peptídeo e as moléculas de 6-OH-BTA-1), pode-se dizer que os valores de K_{SV} encontrados representam as K_a do complexo formado.²³³ Além disso, pode-se dizer que o peptídeo na forma monomérica apresenta maior facilidade de acesso às moléculas de 6-OH-BTA-1, uma vez que apresentou o maior valor para a constante K_{SV} .²³⁴

5.8. Ensaio de toxicidade

5.8.1. Ensaio biológico *in vitro*

O teste MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium]) consiste em um teste colorimétrico usado para avaliar a viabilidade mitocondrial. As desidrogenases mitocondriais, presentes apenas em células metabolicamente viáveis, atuam clivando o anel de tetrazólio, transformando-se de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, chamado de formazan, que são cristais insolúveis em soluções aquosas. A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória da célula, portanto a função da mitocôndria. Os principais tipos de células utilizadas em ensaios de viabilidade celular no estudo de nanotoxicidade são, normalmente, linhagens celulares endoteliais, fibroblastos e macrófagos (Tabela 3.3). Nesse trabalho utilizamos linhagem de células VERO com o objetivo de testar a atividade citotóxica das NPs.

Os gráficos dos ensaios MTT para as células VERO expostas por 24h a todas as NPOFe, com e sem revestimento, estão apresentados das Figuras 5.41 a 5.47, respectivamente.

Os resultados de MTT para os dois tipos de NPOFe sem revestimentos revelaram diferenças significativas (Figuras 5.41 e 5.42). As NPOFe-P apresentaram aumento da viabilidade mitocondrial para todas as concentrações em relação ao controle. Observou-se um aumento da viabilidade para as concentrações menores. Isso pode ocorrer devido a mecanismos de defesa, na qual as células podem estar sofrendo um insulto e proliferam-se na forma de tentar compensar a atividade mitocondrial. Já para as NPOFe-C, houve um decréscimo significativo da viabilidade celular para as concentrações de 2 e 4 mmol.L⁻¹, apresentando valores abaixo de 80% em relação ao controle. Esse fato pode ser devido que em concentrações maiores as NPOFe-C precipitaram no fundo dos poços de tratamento, dificultando a análise. Já foi visto no capítulo 5.1.1 que essas NPs são instáveis em meio aquoso e tendem a aglomerarem-se.

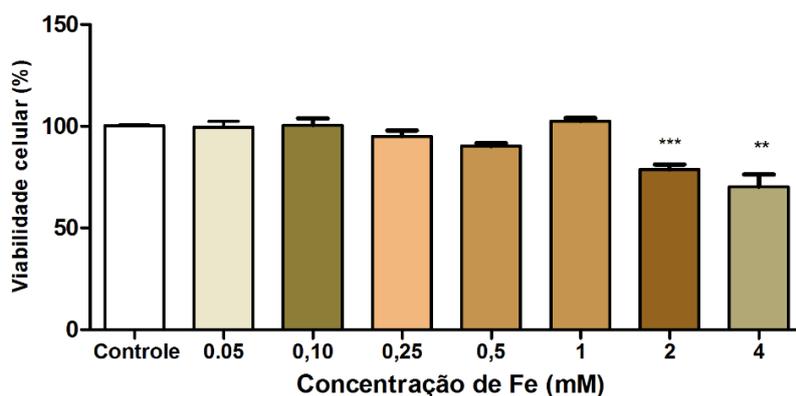


Figura 5.41. Ensaio de MTT após exposição as NPOFe-C, por 24 h, nas concentrações de 0,05-4 mmol.L⁻¹ (**p<0,05; ***p<0,01 vs controle).

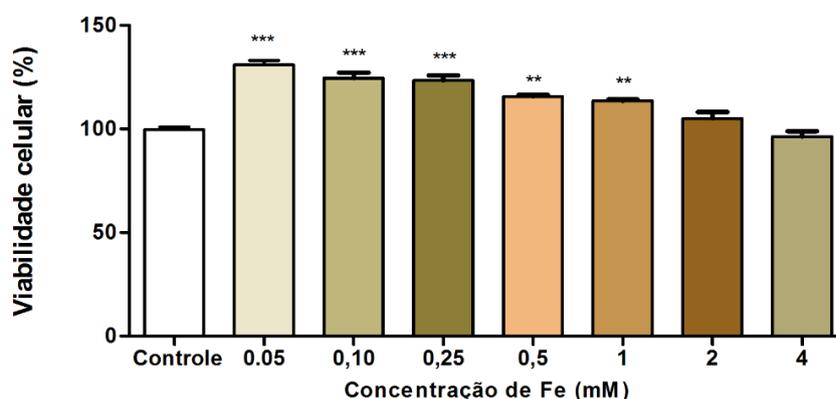


Figura 5.42. Ensaio de MTT após exposição as NPOFe-P, por 24 h, nas concentrações de 0,05-4 mmol.L⁻¹ (**p<0,05; ***p<0,01 vs controle).

As NPOFe com revestimentos também demonstraram apresentar perfis citotóxicos distintos, dependendo da dose. Para as NPOFe-DX e NPOFe-QS na dose de 4 mmol.L⁻¹ e NPOFe-P-SiO₂ nas doses 2 e 4 mmol.L⁻¹ mostraram uma diminuição significativa da atividade mitocondrial (78,8% e 79,6%; 79,0% e 67,5%, respectivamente), com valores abaixo de 80% em relação ao controle. As NPOFe-QS, em doses menores que 4 mmol.L⁻¹, mostraram um aumento significativo em relação ao controle, o que também pode ser insulto, aumentando a atividade mitocondrial. As NPOFe-T e NPOFe-PEG apresentaram viabilidade mitocondrial para todas as concentrações, em relação ao controle.

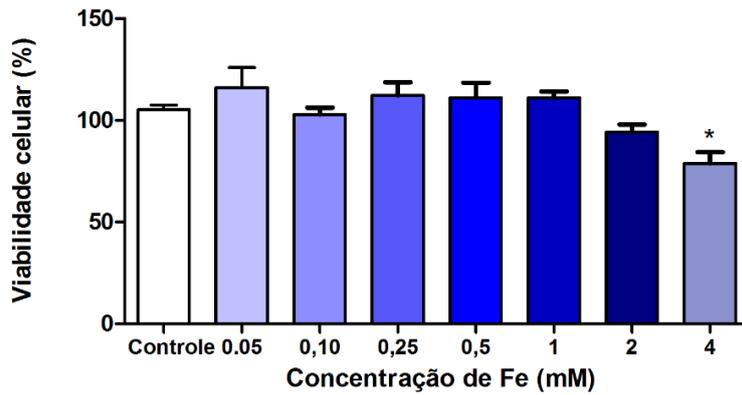


Figura 5.43. Ensaio de MTT após exposição as NPOFe-DX, por 24 h, nas concentrações de 0,05-4 mmol.L⁻¹ (*p<0,5 vs controle).

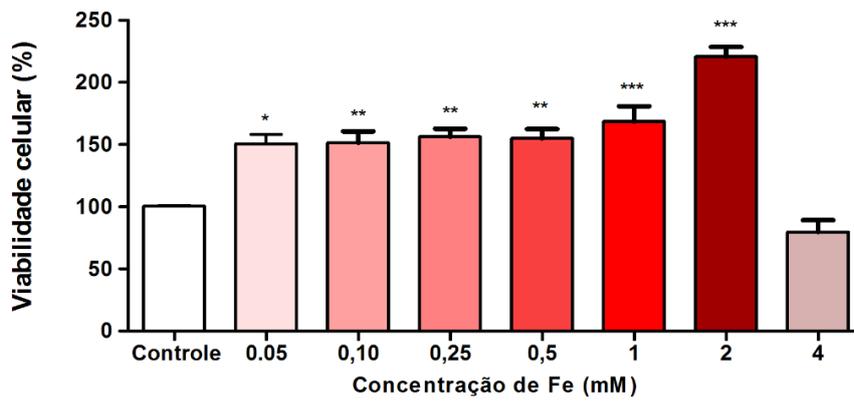


Figura 5.44. Ensaio de MTT após exposição as NPOFe-QS, por 24 h, nas concentrações de 0,05-4 mmol.L⁻¹ (*p<0,5; **p<0,05; ***p < 0.01 vs controle).

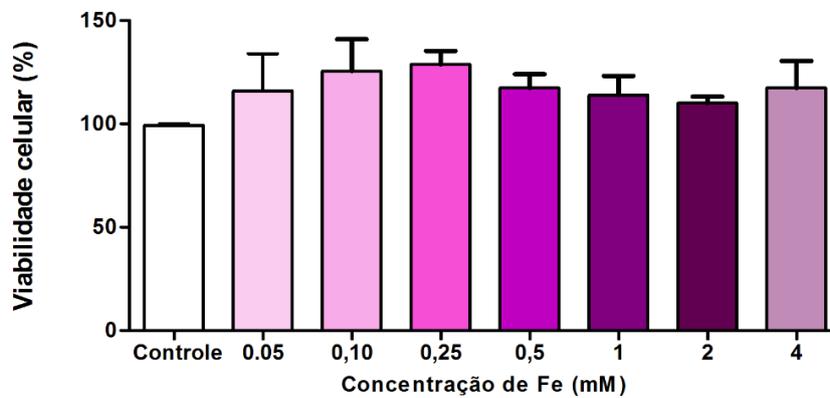


Figura 5.45. Ensaio de MTT após exposição as NPOFe-T, por 24 h, nas concentrações de 0,05-4 mmol.L⁻¹.

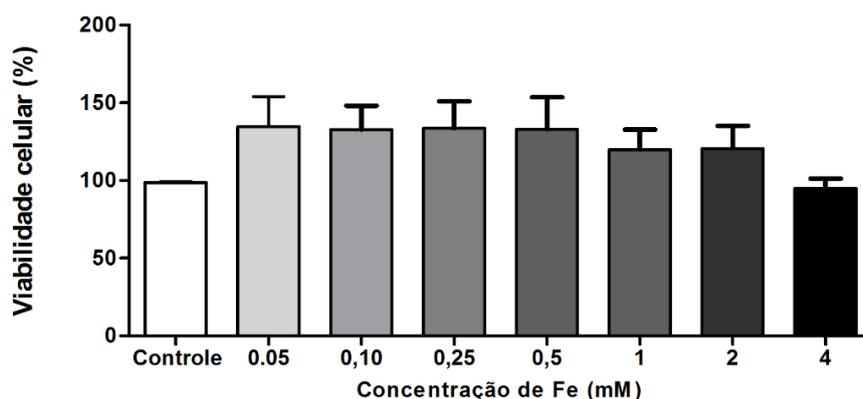


Figura 5.46. Ensaio de MTT após exposição as NPOFe-PEG, por 24 h, nas concentrações de 0,05-4 mmol.L⁻¹.

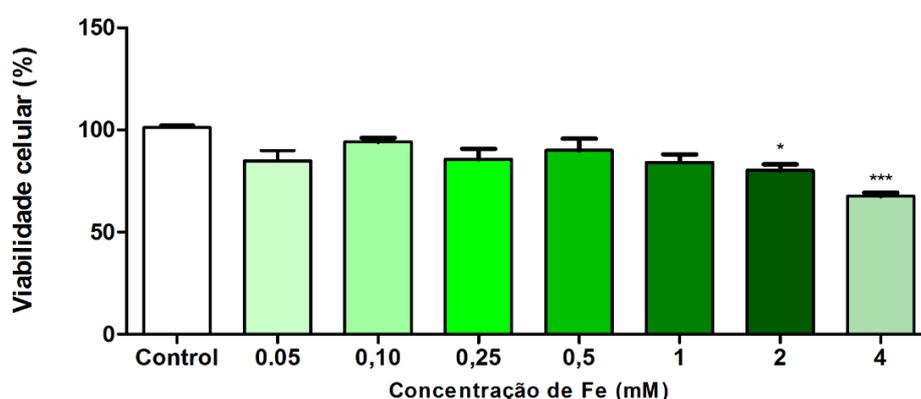


Figura 5.47. Ensaio de MTT após exposição as NPOFe-P-SiO₂, por 24 h, nas concentrações de 0,05-4 mmol.L⁻¹ (*p<0,5 e ***p< 0,01 vs controle).

Para as partículas NPOFe-C, NPOFe-DX, NPOFe-T e NPOFe-PEG as quais não tiveram diferença significativa no ensaio de MTT em doses abaixo de 2 mmol.L⁻¹, foram realizadas o ensaio de contagem celular para averiguar a taxa de morte celular (Figura 5.48). As NPOFe-C foram expostas às células apenas até a dose de 500 μmol.L⁻¹, devido a amostra precipitar no fundo do poço de tratamento. As demais doses foram até 1 μmol.L⁻¹. Para todas as NPs, não houveram significância entre as células tratadas em relação ao controle, apresentando viabilidade celular.

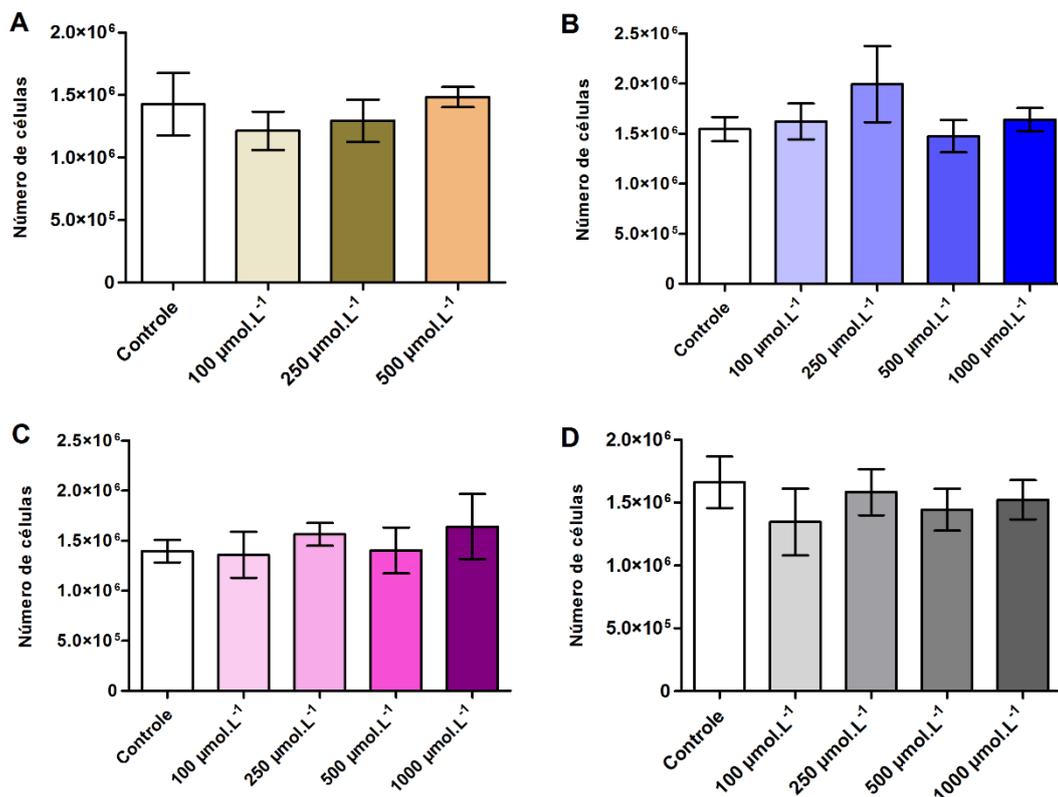


Figura 5.48. Contagem celular após exposição com as NPs (A) NPOFe-C, (B) NOFe-DX, (C) NPOFe-T e (D) NPOFe-PEG em células VERO tratadas com diferentes concentrações durante 24 h.

A toxicidade das NPOFe pode ser atribuída à liberação de íons de ferro no espaço intracelular e à degradação *in situ*. Os resultados sugerem que o revestimento presente nas NPOFe tem potencial de reduzir os efeitos citotóxicos. Essa diminuição pode ser atribuída à liberação controlada (mais lenta) de íons ferroso (Fe^{+2}). O pressuposto é de que as NPs internalizadas liberem os íons ferroso após a degradação enzimática das NPs no ambiente ácido do lisossomo. Os íons ferrosos podem reagir com o peróxido de hidrogênio gerado nas mitocôndrias e induzir a geração de espécies de oxigênio reativas, como radicais hidroxílicos através da reação *Fenton*.^{158,173,195} Espécies oxidativas causam ainda mais inflamação na célula, interferência na mitocôndria e liberação de citocromo C (proteína associada a membrana interna da mitocôndria) devido ao potencial de membrana alterada, que desencadeia então a apoptose.¹⁷³ Diversos estudos já comprovaram a geração de estresse oxidativo em células expostas à NPOFe.^{164,235,236,237}

Na literatura, Hussain e colaboradores¹⁷³ observaram toxicidade de NPOFe sem revestimento em exposição por 24 h em células BRL 3A (células de fígado de

rato) a partir de concentração de 4 mol.L^{-1} de Fe. Shukla e colaboradores¹⁶⁴ observaram níveis tóxicos de NPOFe sem revestimento para diferentes células HeLa e A549 (câncer) e Hek293 (rim humano) em doses de $0,07 \text{ mmol.L}^{-1}$ e as NPOFe com quitosana demonstraram aumentar a viabilidade celular. Naqvi e colaboradores²³⁷ contestam que a viabilidade celular de NPOFe em células J774 (macrófagos) é aumentada para doses acima de $3,6 \text{ mmol.L}^{-1}$. O mesmo é observado em estudos para as NPOFe com revestimentos (Tabela 3.3). Silva e colaboradores²³⁸ utilizaram o também ensaio de MTT com a linhagem celular VERO, mas também MDCK (mamária) e NIH-3T3 (fibroblastos), com exposição por 24 h, para averiguar a toxicidade de NPOFe com PEG de pesos moleculares diferentes. Os autores observaram comportamentos diferenciados nas respostas tóxicas das NPs de cada linhagem, sendo as células VERO mais sensíveis para doses maiores que $1,8 \text{ mmol.L}^{-1}$ e as demais linhagem sensíveis a partir de $3,6 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Contudo, diferentes resultados vinculados a toxicidade de NPs são observados na literatura, o que reflete no tipo de produção das NPs, tamanho médio, química de superfície e linhagem celular utilizada e, portanto, deve ser levado em consideração que cada sistema estudado revela um comportamento biológico diferenciado. Apesar disso, os dados dos ensaios *in vitro* realizados corroboram com ensaios de biocompatibilidade relatados na literatura para essas concentrações de NPs e, para a maioria dos estudos com NPOFe com revestimento, os autores salientam a importância da estabilidade coloidal das mesmas (Tabela 3.3).^{173,239,240}

5.8.2. Ensaio toxicológico *in vivo*

Ensaio de toxicidade embrionária do peixe zebra investigou, inicialmente, a taxa de sobrevivência, taxa de eclosão e possíveis anormalidades morfológicas durante os 5 dias de exposição às NPOFe em diferentes doses ($0,125 \text{ mmol.L}^{-1}$, $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$, $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $8,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ de ferro), em relação ao controle (Figura 5.49), tratado com água do sistema. Trabalhos anteriores, realizados em colaboração, revelaram que as NPOFe sem revestimento mostraram ser mais tóxicas nas larvas em concentrações de $0,09 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $0,9 \text{ mmol.L}^{-1}$.¹⁹⁸ As NPOFe mostraram instabilidade na presença da água do sistema, precipitando no fundo dos poços de tratamento.

Portanto, nesse trabalho apenas as NPOFe com os diferentes revestimentos foram utilizadas para essas análises.



Figura 5.49. Imagem de uma larva controle com 5 dpf utilizada para os ensaios de morfologia e teratogênese (escala: 50 μm).

Na Figura 5.50 são apresentados dados de sobrevivência das larvas durante a exposição às NPs. A taxa de sobrevivência avaliada através da curva de Kaplan-Meier só mostrou alteração significativa, em relação ao controle ($p < 0,05$) para as exposições com as NPOFe-QS nas concentrações de 2 mmol.L^{-1} e 8 mmol.L^{-1} , que induziram morte de todos os embriões (teste *Log-rank mantel cox* $p < 0,0001$).

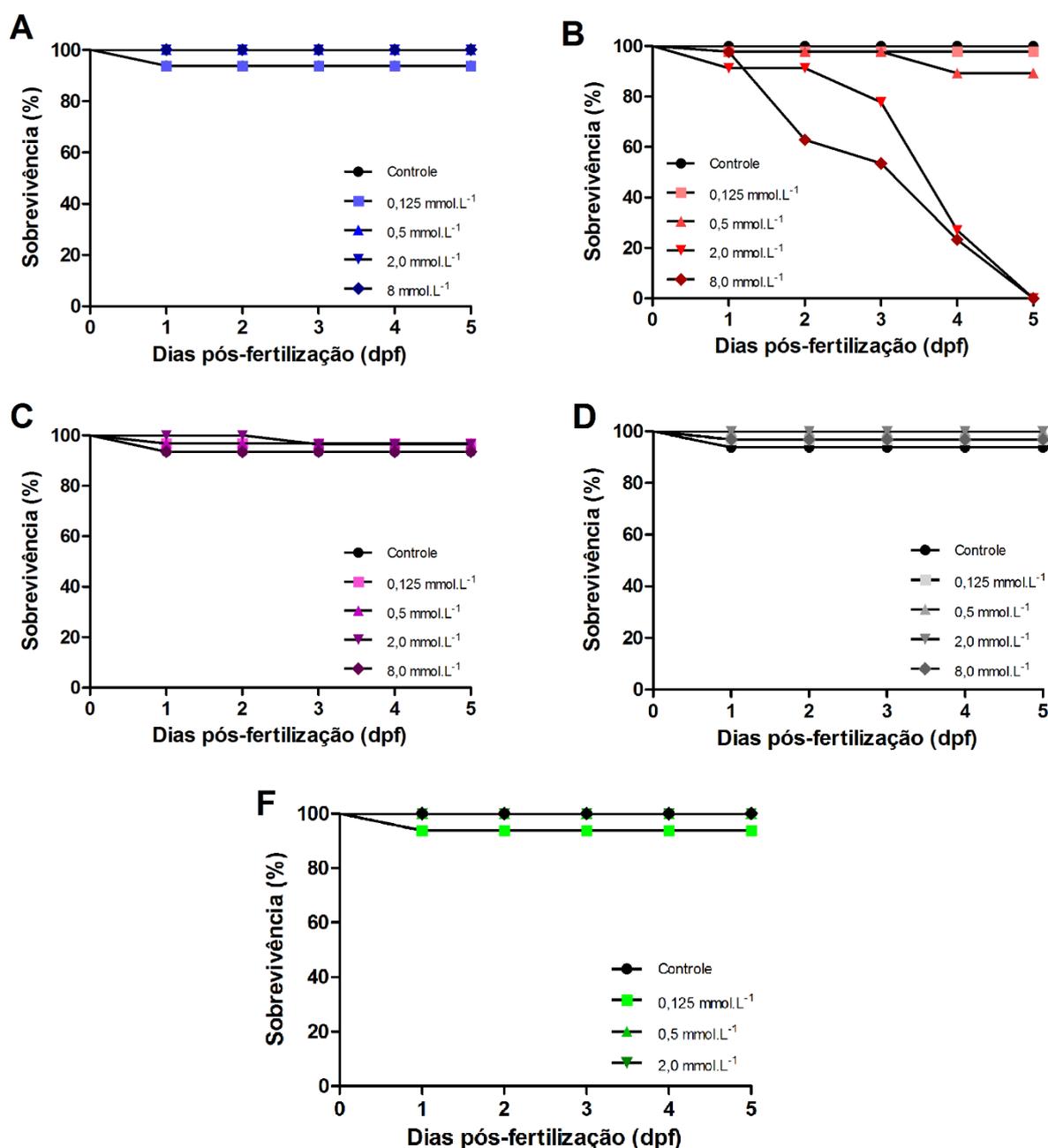


Figura 5.50. Curvas de sobrevivência por Kaplan-Meier das larvas durante 5 dias de exposição às NPOFe com os diferentes revestimentos. NPOFe-DX (A), NPOFe-QS (B), NPOFe-T (C), NPOFe-PEG (D) e NPOFe-P-SiO₂ (E).

Notou-se que as NPOFe-QS aglomeraram e precipitaram no fundo do poço de tratamento (Figura 5.51), o que pode estar associado a mortalidade induzida por essas NPs, como também observado para as NPOFe sem revestimento em trabalhos anteriores.¹⁹⁸ Aparentemente as condições de exposição temperatura (28 ± 2) °C e pH das soluções (7,0-7,5) não foram favoráveis para manter as NPOFe-QS em suspensão e

estáveis durante o tratamento. Para as demais NPs, não apresentaram alterações significativas e as NPs mantiveram-se em suspensão solúveis dentro do poço de tratamento.



Figura 5.51. Imagens das larvas com 24 hpf em tratamento com as NPOFe-QS. (A) Grupo controle, (B) dose de 2 mmol.L^{-1} e (C) dose de 8 mmol.L^{-1} .

Na Figura 5.52 estão apresentados os dados relativos às taxas de eclosão das larvas durante a exposição às NPOFe com diferentes revestimentos. Todos os animais eclodiram entre 48-72 horas pós fertilização (hpf) de desenvolvimento, conforme esperado. A taxa de eclosão também não foi alterada de maneira significativa em nenhum dos grupos quando comparada com os grupos controle. Para o revestimento de quitosana os animais eclodiram num período após o próprio controle, comportamento diferente em relação às outras NPOFe (Figura 5.52B). Porém, observou-se uma ligeira prematuridade em animais tratados com os revestimentos de dextrana, polissiloxano, PEG e sílica.

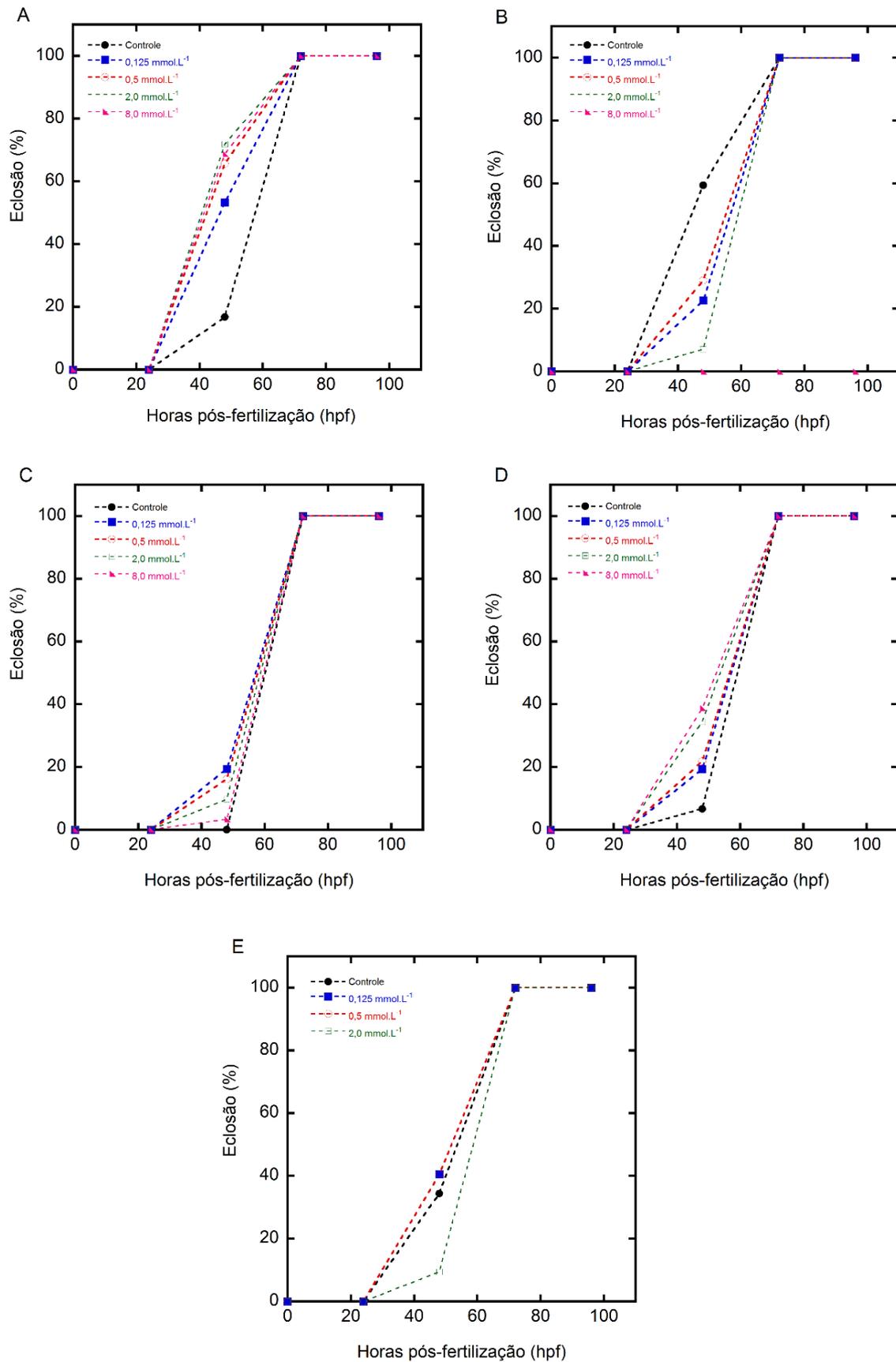


Figura 5.52. Taxa de eclosão larvas em exposição às NPOFe com os diferentes revestimentos. NPOFe-DX (A), NPOFe-QS (B), NPOFe-T (C), NPOFe-PEG (D) e NPOFe-P-SiO₂ (E).

Em relação à teratogênese, a Figura 5.53 apresenta exemplos de anormalidades morfológicas observadas entre as larvas no 5 dpf. Foram observadas alterações em todos as doses das diferentes NPs, como edema, diminuição da bexiga natatória, cauda torta, malformação do vitelo. Porém, não houve diferença significativa entre os animais expostos às NPs, em relação ao tamanho corporal e anomalias anatómicas. O percentual de animais com essas alterações foi similar entre os grupos tratados e controle, conforme esperado para a espécie (Tabela 5.9).

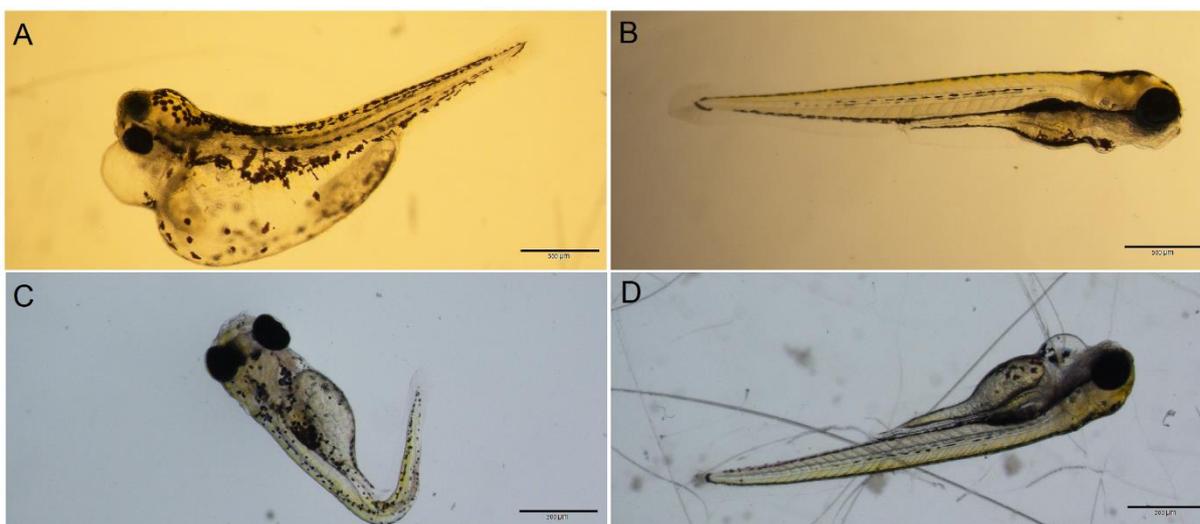


Figura 5.53. Exemplo de anormalidades morfológicas observadas entre indivíduos de todos os grupos no 5 dpf. (A) Edema nas larvas expostas às NPOFe-DX na dose de 0,5 mmol.L⁻¹, (B) diminuição da bexiga natatória nas larvas expostas às NPOFe-T na dose de 0,125 mmol.L⁻¹, (C) edema e cauda torta nas larvas expostas às NPOFe-PEG na dose de 0,5 mmol.L⁻¹ e (D) edema e malformação do vitelo nas larvas expostas às NPOFe-PEG na dose de 8,0 mmol.L⁻¹ (escala: 500 µm).

Tabela 5.9. Anormalidades morfológicas entre indivíduos de todos os grupos.

Doses (mmol.L ⁻¹)	Anormalidades (%)				
	NPOFe-DX	NPOFe-QS	NPOFe-T	NPOFe-PEG	NPOFe-P-SiO ₂
Controle	6,67	3,13	0	6,67	9,38
0,125	6,67	0	3,23	0	0
0,5	9,38	6,9	0	0	0
2,0	3,13	*	0	3,13	0
8,0	3,13	*	0	0	-

*100% de morte.

O ensaio de locomoção e exploração de um novo ambiente investigou possíveis indícios de toxicidade das NPOFe através de variações nos padrões de comportamento das larvas. As larvas foram expostas às NPOFe com revestimento durante os cinco dias de tratamento nas diferentes doses (0,125 mmol.L⁻¹, 0,5 mmol.L⁻¹, 2,0 mmol.L⁻¹ e 8,0 mmol.L⁻¹ de ferro). A distância percorrida, a velocidade média, o número de rotações corporais superiores a 90° (ângulo de giro), a percentagem do estado em movimento ou não (tempo em movimento), e a percentagem do tempo gasto na área central/externa (periferia) foram os principais parâmetros examinados.

Os resultados são apresentados nas Figuras 5.54 a 5.58. Nos grupos NPOFe-DX, NPOFe-T e NPOFe-PEG não foram detectadas diferenças significativas nos parâmetros de locomoção e exploração. Para a NPOFe-QS, houve diminuição significativa ($p=0,0021$) em relação ao controle na distância percorrida para a concentração de 0,125 mmol.L⁻¹ (Figura 5.55). Já para a NPOFe-P-SiO₂, houve diferença estatisticamente significativa na distância percorrida e no ângulo de giro nas concentrações de 2,0 mmol.L⁻¹, na qual ocorreu a diminuição da distância percorrida ($p=0,0040$) e o aumento do ângulo de giro ($p=0,0193$), em relação ao controle (Figura 5.58).

A análise de atividade exploratória dos animais de 5 dpf revela aspectos gerais da capacidade de locomoção e exploração dos animais e inclui a quantificação da distância percorrida, velocidade média e períodos móveis e imóveis. Esses parâmetros, além de representarem indicadores da capacidade de natação dos animais, refletem também os aspectos gerais de sua fisiologia. As alterações observadas nesses parâmetros, embora não seja possível atribuir a qual sistema exato se deve (por exemplo, sistema muscular natatório, controle nervoso, orientação corporal ou capacidade cognitiva), esse teste serve como caracterização inicial e pode ser seguido por outras análises bioquímicas mais detalhadas. Neste estudo observou-se que a maior parte das nanopartículas testadas não afetaram significativamente esses parâmetros ou tiveram influências pontuais, como observado na distância percorrida para a NPOFe-QS na dose de 0,125 mmol.L⁻¹, e para a distância percorrida e ângulo de giro para a NPOFe-P-SiO₂ na dose de 2 mmol.L⁻¹.

Outro conjunto de parâmetros analisados nesse teste diz respeito a resposta de ansiedade típica de animais e humanos, quando colocados em um ambiente novo e a tendência, nessas condições, de explorar preferencialmente a periferia do mesmo. Essa resposta, chamada tigmotaxia, pode ser indicativo de alterações a nível neural,

embora novamente seja necessário maior aprofundamento para indicar os mecanismos de efeitos que alterem os padrões de exploração dos animais tratados em relação aos controles. Não houveram alterações referentes a esses parâmetros nas larvas expostas à todas NPs.^{241,242} Trabalhos anteriores já mostraram que as NPOFe revestidas com dextranas apresentaram alterações comportamentais (aumento no ângulo de giro e diminuição no número de entradas para o centro do poço), em concentrações de NPs de 0,018 mmol.L⁻¹, o que indicou toxicidade neural em ensaios de neurotoxicidade realizados. Os autores relataram que as NPs nessa concentração prejudicaram a atividade locomotora das larvas pela absorção das NPs (dependente o tamanho), sendo mais fácil de serem absorvidas pelo *corium* e pelas próprias larvas.¹⁹⁸

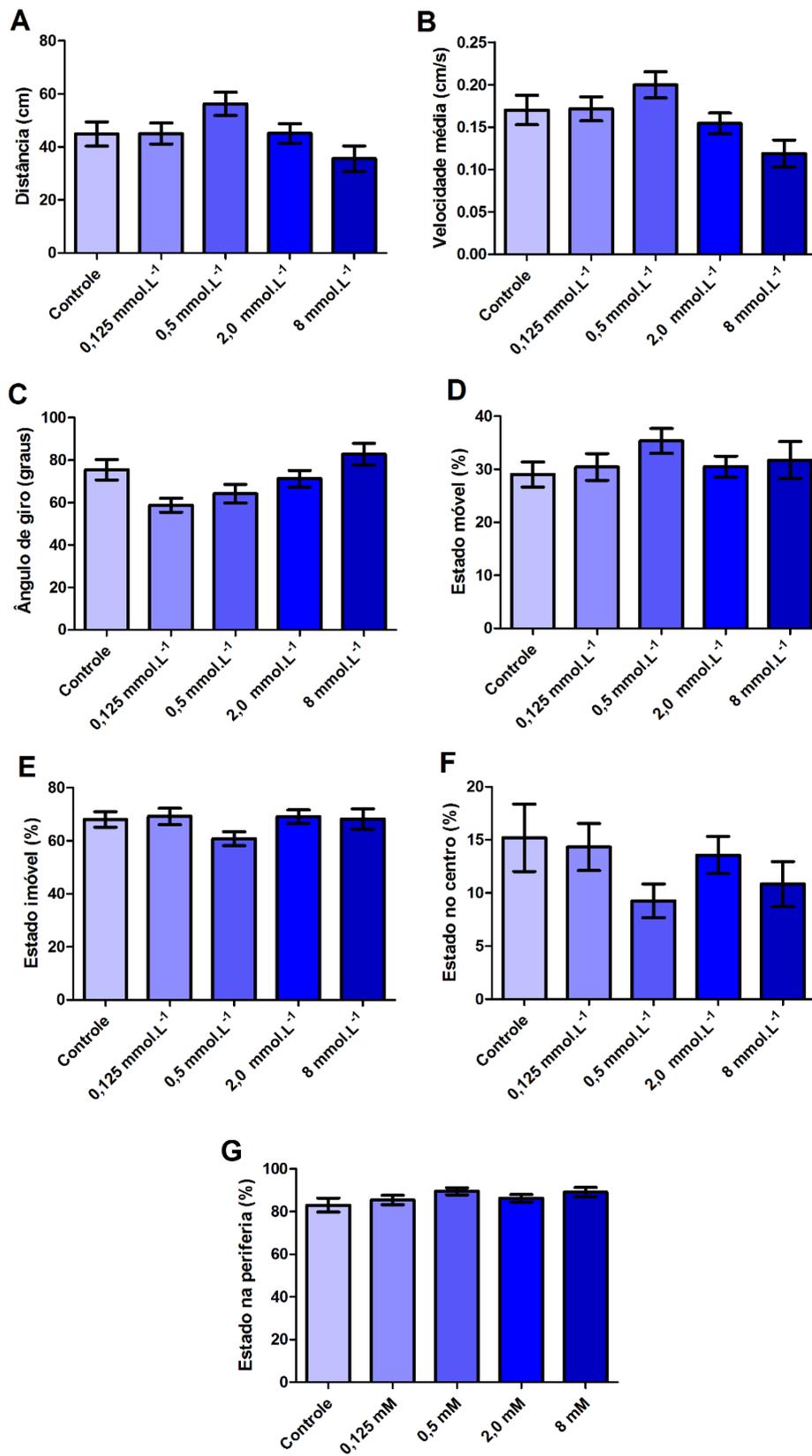


Figura 5.54. Efeitos comportamentais da exposição às NPOFe-DX em diferentes concentrações medidos no 5 dpf. Parâmetros comportamentais: (A) distância percorrida; (B) velocidade média; (C) ângulo de giro; (D) estado móvel; (E) estado imóvel; (F) estado no centro e (G) estado na periferia.

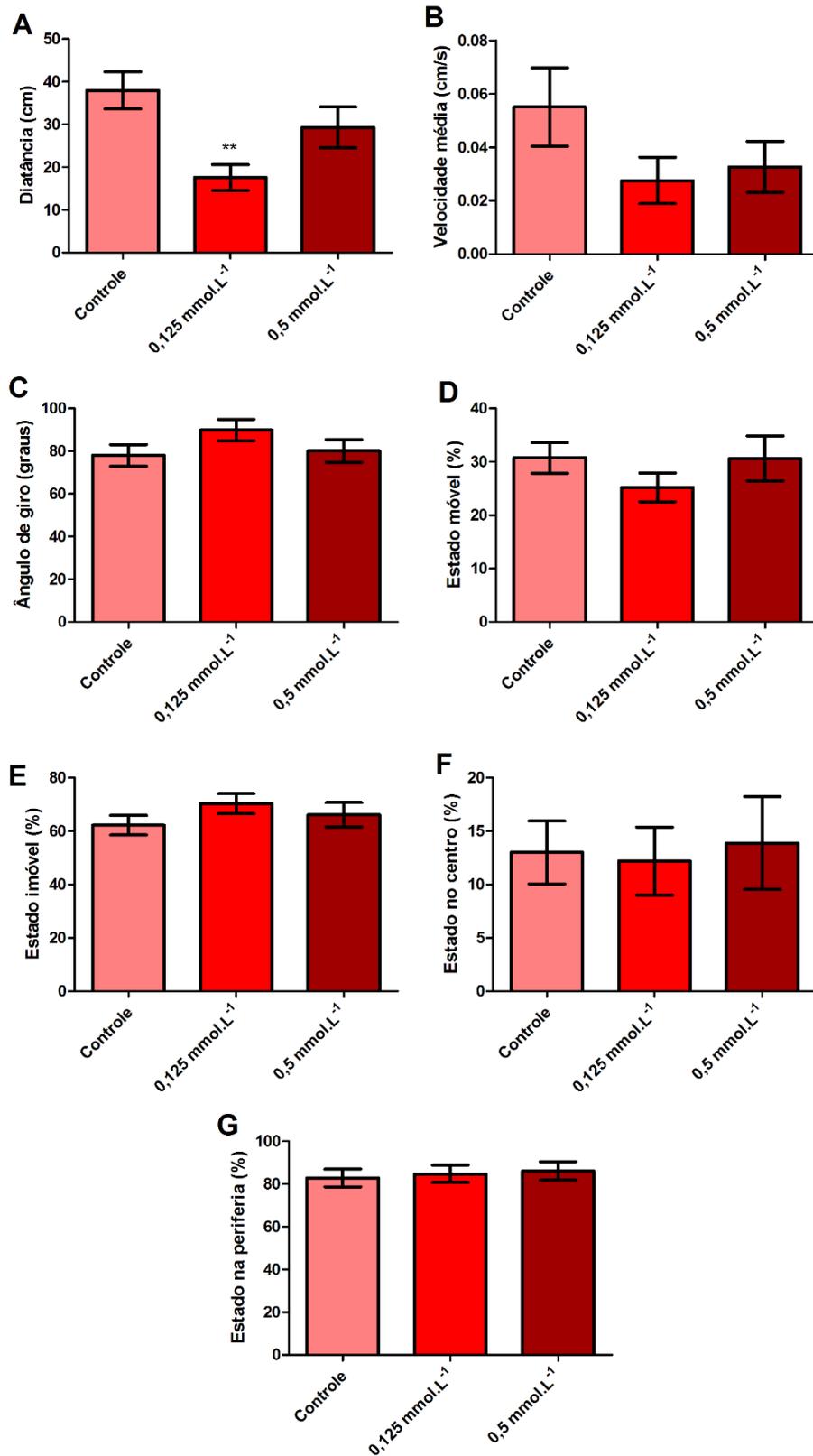


Figura 5.55. Efeitos comportamentais da exposição às NPOFe-QS em diferentes concentrações medidos no 5 dpf. Parâmetros comportamentais: (A) distância percorrida; (B) velocidade média; (C) ângulo de giro; (D) estado móvel; (E) estado imóvel; (F) estado no centro e (G) estado na periferia. **p < 0.05 em relação ao grupo controle utilizando ANOVA seguido por Turkey post-hoc.

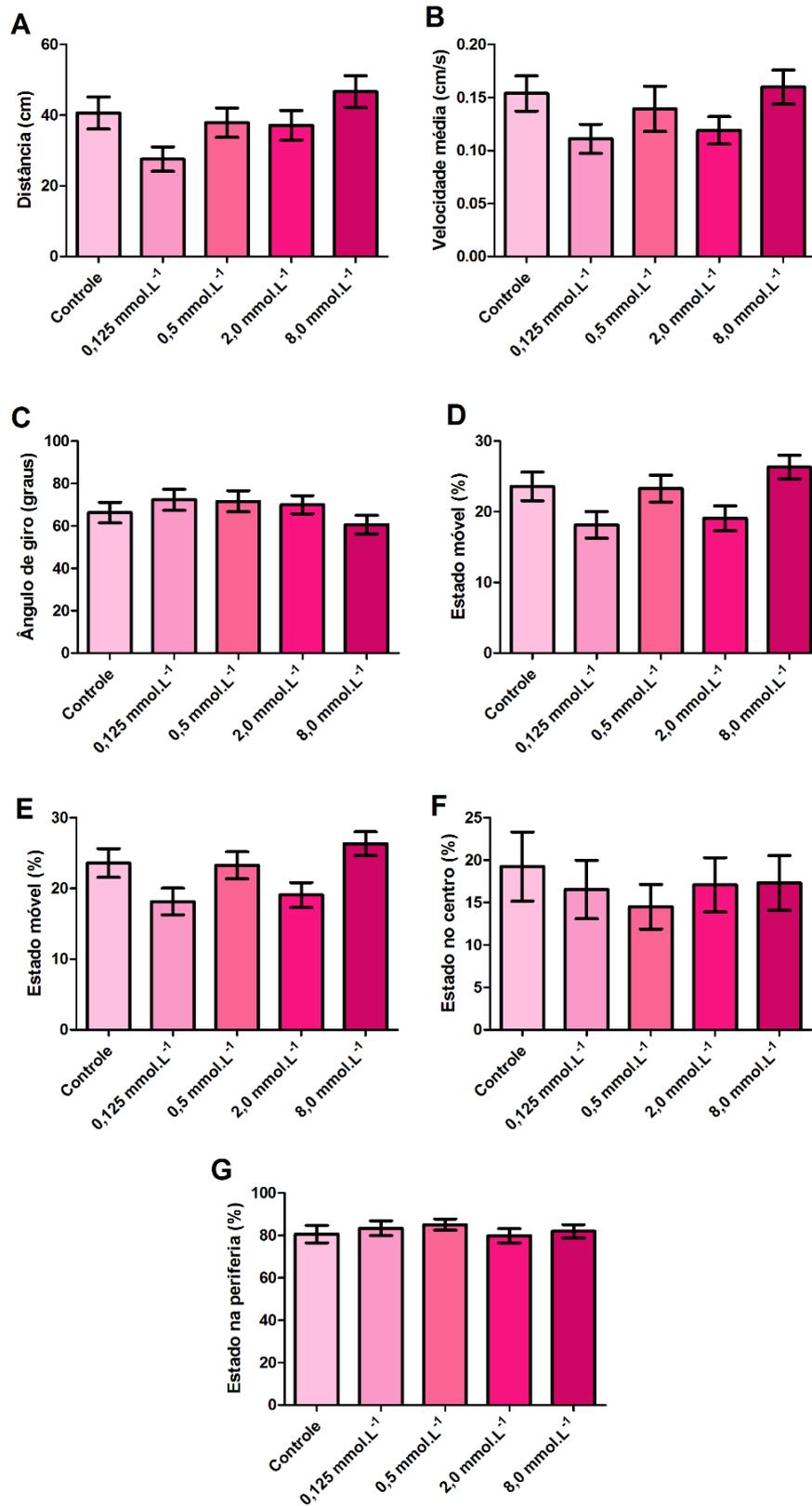


Figura 5.56. Efeitos comportamentais da exposição às NPOFe-T em diferentes concentrações medidos no 5 dpf. Parâmetros comportamentais: (A) distância percorrida; (B) velocidade média; (C) ângulo de giro; (D) estado móvel; (E) estado imóvel; (F) estado no centro e (G) estado na periferia.

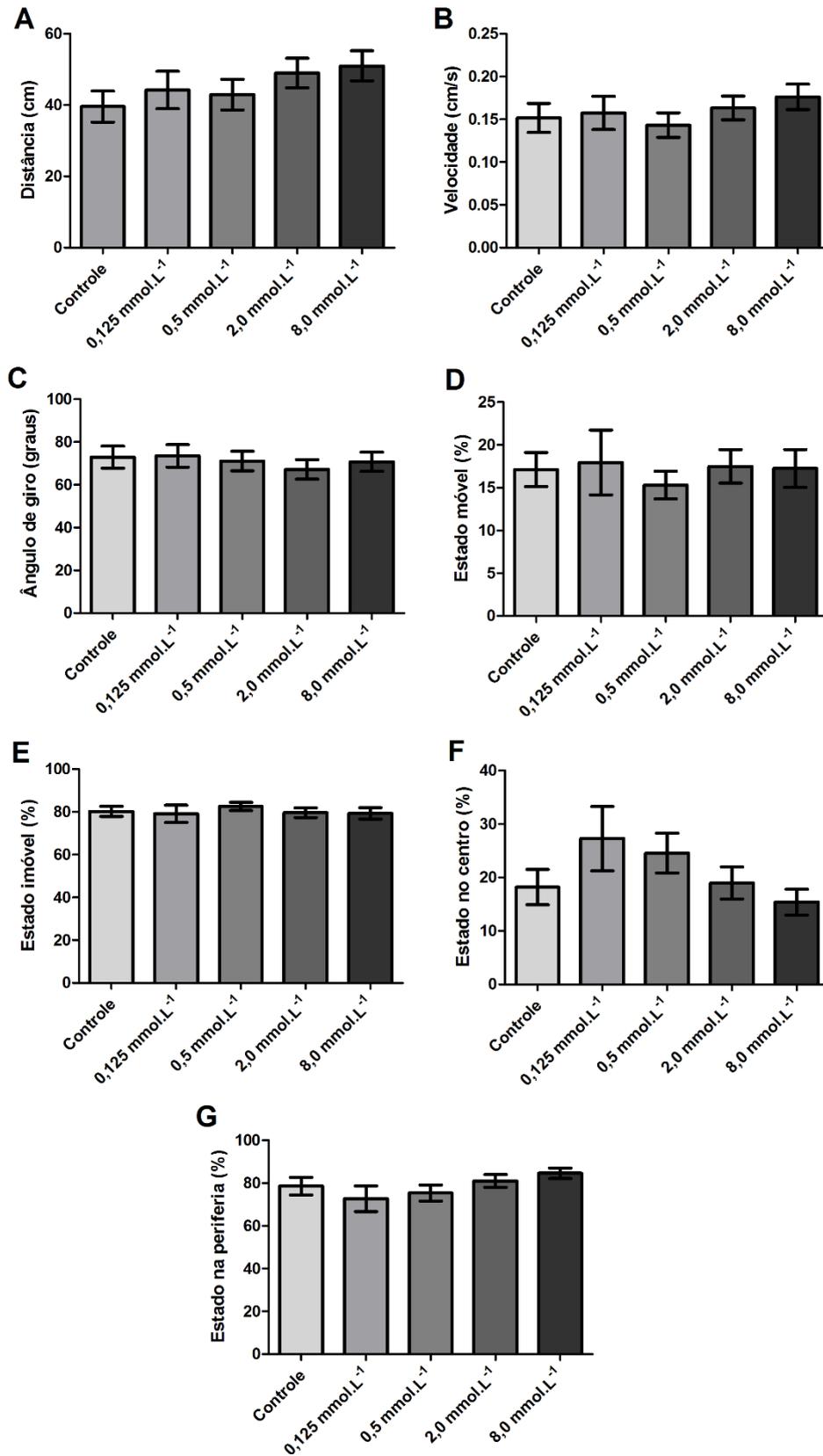


Figura 5.57. Efeitos comportamentais da exposição às NPOFe-PEG em diferentes concentrações medidos no 5 dpf. Parâmetros comportamentais: (A) distância percorrida; (B) velocidade média; (C) ângulo de giro; (D) estado móvel; (E) estado imóvel; (F) estado no centro e (G) estado na periferia.

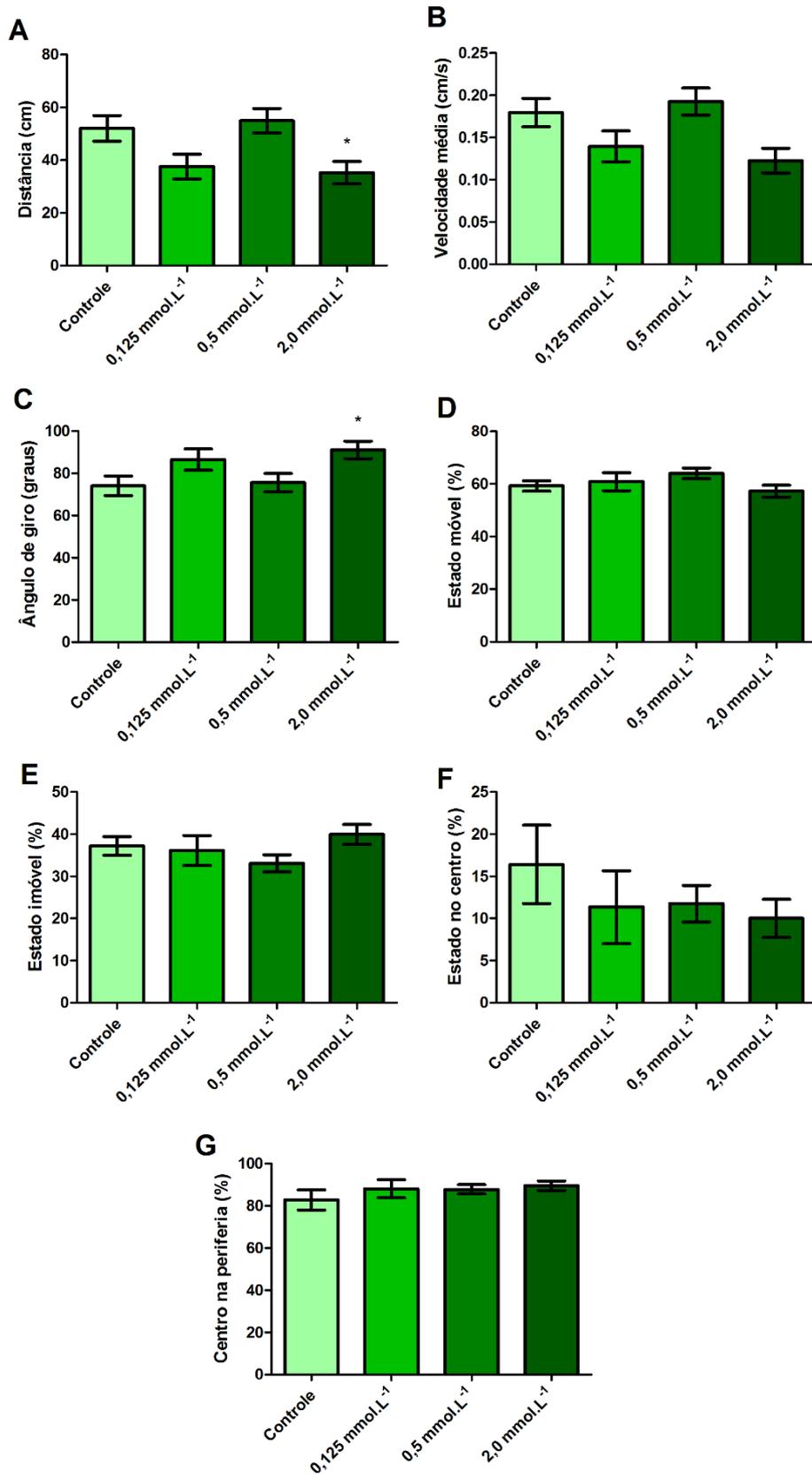


Figura 5.58. Efeitos comportamentais da exposição às NPOFe-P-SiO₂ em diferentes concentrações medidos no 5 dpf. Parâmetros comportamentais: (A) distância percorrida; (B) velocidade média; (C) ângulo de giro; (D) estado móvel; (E) estado imóvel; (F) estado no centro e (G) estado na periferia. *p < 0.05 em relação ao grupo controle utilizando ANOVA seguido por Turkey post-hoc.

Nos ensaios de comportamento aversivo foi avaliada a capacidade cognitiva de escape a um estímulo aversivo visual, descrito na Figura 5.59. As larvas também foram expostas às NPs durante os cinco dias de tratamento nas diferentes doses (0,125 mmol.L⁻¹, 0,5 mmol.L⁻¹, 2,0 mmol.L⁻¹ e 8,0 mmol.L⁻¹ de ferro) e apenas as NPs com os diferentes revestimentos foram utilizadas para essa análise.

Nos grupos tratados com NPOFe-DX e NPOFe-T não foram detectadas diferenças significativas nos parâmetros de escape ($p < 0,05$) (Figuras 5.59 A e C). Observaram-se alterações no desempenho de escape nos animais tratados com as NPOFe-QS, NPOFe-PEG e NPOFe-P-SiO₂. Para as NPOFe-QS, houve diminuição significativa, no desempenho de escape ($p = 0,0001$) para todas as doses, em relação ao controle (Figura 5.59B). Para as NPOFe-PEG houve alteração significativa nas doses de 0,125 mmol.L⁻¹ e 0,5 mmol.L⁻¹ ($p = 0,0001$) e 2,0 mmol.L⁻¹ ($p = 0,05$), aumentando em relação ao controle. Por fim, nas NPOFe-P-SiO₂ houve diferença significativa nas doses 0,125 mmol.L⁻¹ ($p = 0,05$) e 0,5 mmol.L⁻¹ ($p = 0,0001$), também um aumento no desempenho de escape em relação ao controle.

O ensaio aversivo utilizado neste estudo em animais 5 dpf complementa e estende os resultados de atividade exploratória, avaliando funções cognitivas superiores, incluindo a capacidade de escape de um estímulo aversivo. Respostas motivadas pelo medo são extremamente conservadas evolutivamente e o teste usado foi desenvolvido e validado pelo grupo de Creton e colaboradores.²⁰⁶ Nesse teste, os animais foram expostos a um estímulo aversivo (esferas vermelhas que se movem) em uma metade/hemisfério do ambiente no qual estão. Animais cognitivamente saudáveis tendem a escapar do estímulo aversivo se deslocando para o hemisfério oposto àquele no qual está o estímulo. Para as NPs, observaram-se apenas alterações nas amostras NPOFe-QS, NPOFe-PEG e NPOFe-P-SiO₂.

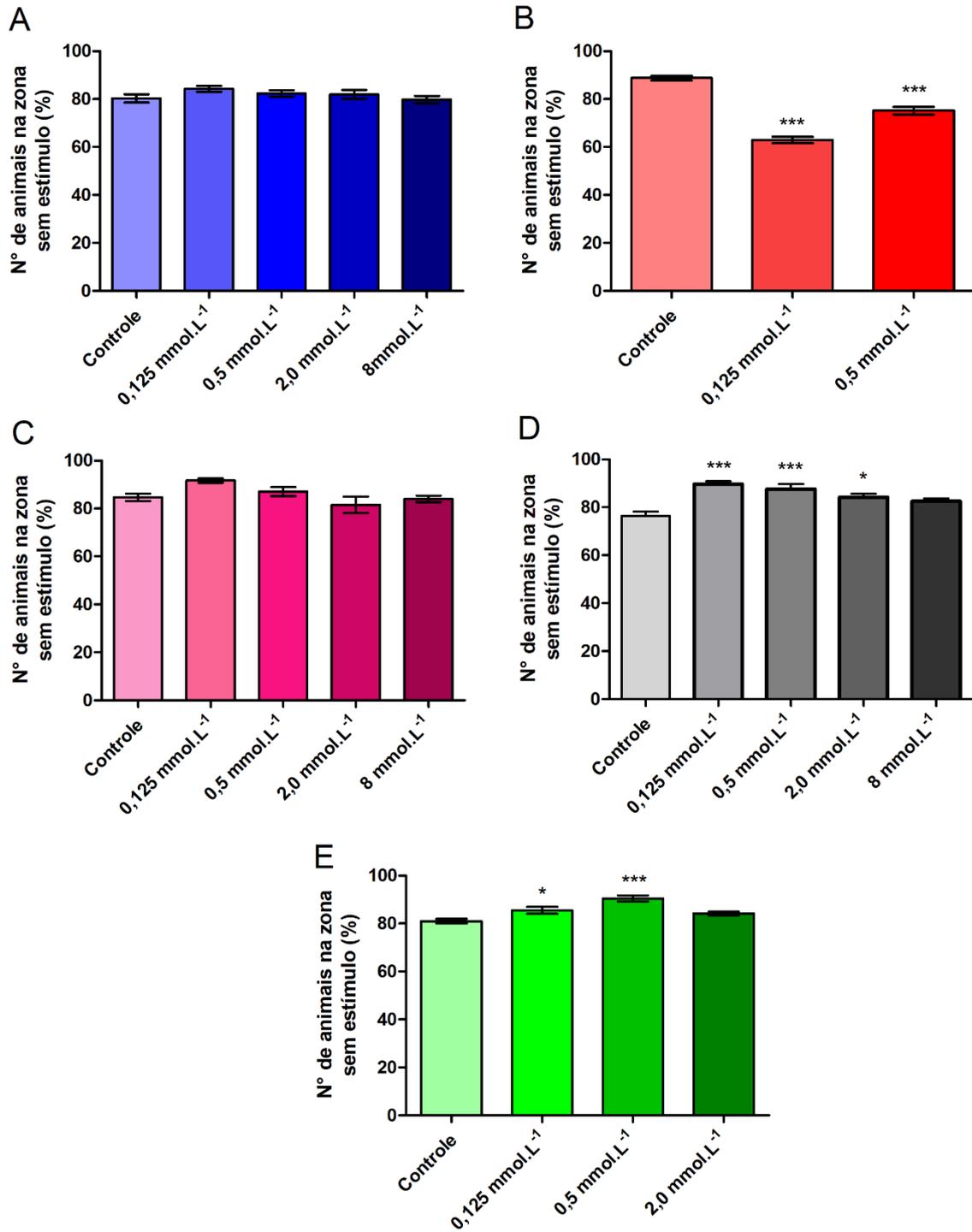


Figura 5.59. O comportamento aversivo medido através do escape efetivo de estímulos (para a área não-estimulada) em larvas expostas às NPOFe-DX (A), NPOFe-QS (B), NPOFe-T (C), NPOFe-PEG (D) e NPOFe-P-SiO₂ (E) com 5dpf.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

As sínteses das NPOFe sem revestimento mostraram ser satisfatórias para a obtenção da magnetita/maguemita em escala nanométrica. Os resultados de morfologia e distribuição de tamanho médio por TEM e XDR das NPOFe sem revestimento, sintetizadas por co-precipitação (NPOFe-C) e poliol (NPOFe-P), apresentaram valores em torno de 10 nm, com estrutura predominantemente esférica. A distribuição de tamanho medido por DLS, em meio aquoso, mostrou um comportamento diferente, sendo as NPOFe-C muito mais instáveis em meio aquoso do que as NPOFe-P. Dentre os dois métodos de síntese utilizado para a preparação das NPs, a rota poliol demonstrou ser mais eficaz para a obtenção das NPOFe.

A distribuição de tamanho médio das NPOFe com diferentes revestimentos variou entre 13 a 30 nm e o padrão de difração para todas as nanopartículas mostrou picos que representam os planos cristalinos da estrutura de *espinélio* da magnetita. Foi possível confirmar por FTIR a presença dos grupos funcionais relacionados às ligações dos diferentes revestimentos em cada tipo de NPs. Para as NPOFe com revestimento, houve uma melhoria da estabilidade coloidal e carga superficial dependente da terminação química dos revestimentos. Os valores de PI foram diferentes para cada NPs e os deslocamentos dos pontos isoelétricos, em relação às NPOFe sem revestimento, refletem a modificação da superfície.

As curvas de magnetização das NPOFe não apresentaram magnetização residual e nem histerese, indicando comportamento superparamagnético. As medidas de tempos de relaxação T1 e T2 apresentaram efeitos de contraste negativo das NPs pelo decréscimo da intensidade de sinal de ressonância magnética com o aumento da concentração das NPs (escurecimento do sinal nas imagens dos *phantoms*). Os valores de relaxividade r_2 para as NPOFe sem revestimento e de quitosana foram maiores, devido ao efeito de agregação. Para todas as outras NPs, os valores de r_2 variaram de 76-64 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Os valores de r_1 foram semelhantes para todas as NPs, variando de 12,6 a 18 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, exceto para as NPOFe-P-SiO₂, que foi de $r_1 = 2,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. A taxa r_2/r_1 variou entre 4-17, valores de acordo com agentes de contraste do tipo T2 comercialmente disponíveis.

Em relação às propriedades fotofísicas, as NPOFe sem revestimento promoveram *quenching* da fluorescência da molécula 2'OH-BTA-1, resultante de colisões durante o estado excitado. A montagem de uma NPs *core-shell* proporcionou, por outro lado, a manutenção da emissão de fluorescência do composto ativo. Essa foi a primeira demonstração da preparação de uma NPOFe magnetofluorescente via mecanismo de ES IPT, resultando num elevado deslocamento de Stokes (~ 200 nm). Já os resultados das medidas de supressão de fluorescência mostraram diminuição da intensidade de fluorescência pelas consecutivas adições do peptídeo ao 6-OH-BTA-1 e as constantes de *Stern-Volmer* calculadas obtendo valores de $1,53 \times 10^4 \text{ mM}^{-1}$, $1,40 \times 10^4 \text{ mM}^{-1}$ e $1,33 \times 10^4 \text{ mM}^{-1}$, coeficientes próximos à unidade. Esse resultado mostrou dependência linear com a concentração de peptídeo, sugerindo que foi do tipo estático, formando complexo no estado fundamental entre o peptídeo e as moléculas fluorescentes. O peptídeo na forma monomérica revelou maior facilidade de acesso às moléculas de 6-OH-BTA-1, já que apresentou maior valor da constante *Stern-Volmer*.

Os resultados dos ensaios *in vitro* para as NPOFe com os diferentes revestimentos demonstraram valores aceitáveis de viabilidade celular após a exposição na concentração de ferro com valores até 2 mmol.L^{-1} , por 24 h. As NPOFe-PEG e NPOFe-T demonstraram maior biocompatibilidade e as NPOFe-P-SiO₂ tiveram maior citotoxicidade. Os resultados dos ensaios *in vivo* não mostraram alterações significativas de sobrevivência e de eclosão, exceto para as doses maiores das nanopartículas com quitosana (2 e 8 mmol.L^{-1}). Os percentuais de animais com alterações anatômicas foram bastante similares entre os grupos tratados e controle. Nos ensaios de locomoção e exploração, apenas as nanopartículas de quitosana e de sílica mostraram alterações significativas. As NPOFe com os diferentes revestimentos, não demonstraram efeitos tóxicos elevados nas concentrações testadas.

Portanto, tendo em vista que as diferentes NPs sintetizadas apresentaram características de agentes de contraste negativo do tipo T2, as mesmas possuem potencial para serem usadas, futuramente, em ensaios clínicos de imageamento biomédicos. Destacam-se as NPOFe-DX, NPOFe-T e NPOFe-PEG, nas quais os diferentes revestimentos utilizados favoreceram a estabilização em meio aquoso, não afetando as propriedades de contraste. Os ensaios biológicos também comprovaram a biocompatibilidade dessas NPs nas condições realizadas.

Como perspectivas futuras desse projeto, tem-se a ideia de continuar a síntese e a caracterização das nanopartículas acopladas às moléculas 6-OH-BTA-1, formando uma sonda fluorescente capaz de atuar como um agente de contraste em neuroimagem por MRI. Em relação aos marcadores magnetofluorescentes, apesar de não terem sido acoplados em todas as NPs, tem-se a ideia de utilizá-los para marcação de alvos biológicos específicos, como marcador da doença de Alzheimer. A ideia central seria a realização de mais teste *in vitro* com células neurais e a injeção da beta-amiloide nas larvas de peixe zebra (protocolo já estabelecido pelo grupo) e sua exposição às diferentes sondas fluorescentes. Contudo, poderá ser realizado ensaios biológicos em relação aos efeitos embriotóxicológicos, comportamentais da administração das sondas fluorescentes em exposição às larvas de peixe zebra e relacioná-los com os resultados comportamentais já vistos na literatura em portadores da doença de Alzheimer. Posteriormente, investigar a localização das sondas fluorescentes no encéfalo e sua biodistribuição através de técnicas de microscopia confocal e transmissão e a técnica de PIXE, com finalidade de criar um modelo *in vivo* simples que mimetize a condição básica da doença de Alzheimer.

7. ANEXOS

7.1. Produção científica

7.1.1. Artigos

- Oliveira, G. M. T.; Kist, L. W.; Pereira, T. C. B.; Bortolotto, J. W.; Paquete, F. L.; Oliveira, E. M. N.; Leite, C. E.; Bonan, C. D.; Basso, N. R. S.; Papaléo, R. M.; Bogo, M. R. Transient modulation of acetylcholinesterase activity caused by exposure to dextran-coated iron oxide nanoparticles in brain of adult zebrafish. *Comp Biochem Phys C*, v. 162, p. 77-84, 2014. (DOI: 10.1016/j.cbpc.2014.03.010).

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 162 (2014) 77–84



Contents lists available at ScienceDirect

Comparative Biochemistry and Physiology, Part C

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cbpc



Transient modulation of acetylcholinesterase activity caused by exposure to dextran-coated iron oxide nanoparticles in brain of adult zebrafish

Giovanna Medeiros Tavares de Oliveira^a, Luiza Wilges Kist^{a,b}, Talita Carneiro Brandão Pereira^a, Josiane Woutheres Bortolotto^c, Francisco Lima Paquete^d, Elisa Magno Nunes de Oliveira^d, Carlos Eduardo Leite^e, Carla Denise Bonan^{b,c}, Nara Regina de Souza Basso^d, Ricardo Meurer Papaleo^d, Maurício Reis Bogo^{a,b,e,*}

^a Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil
^b Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-IM), Porto Alegre, RS, Brazil
^c Laboratório de Neuroquímica e Psicofarmacologia, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil
^d Laboratório de Síntese de Materiais Nanoestruturados, Faculdade de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil
^e Instituto de Toxicologia e Farmacologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history
 Received 21 August 2013
 Received in revised form 14 March 2014
 Accepted 27 March 2014
 Available online 2 April 2014

Keywords:
 SPIONs
 ClO-NH₂
 AChE
 Neurotoxicity
 Apoptosis
 Zebrafish

ABSTRACT

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) are of great interest in nanomedicine due to their capability to act simultaneously as a contrast agent and as a targeted drug delivery system. At present, one of the biggest concerns about the use of SPIONs remains around its toxicity and, for this reason, it is important to establish the safe upper limit for each use. In the present study, SPION coated with cross-linked aminated dextran (ClO-NH₂) were synthesized and their toxicity to zebrafish brain was investigated. We have evaluated the effect of different ClO-NH₂ doses (20, 50, 100, 140 and 200 mg/kg) as a function of time after exposure (one, 16, 24 and 48 h) on AChE activity and ache expression in zebrafish brain. The animals exposed to 200 mg/kg and tested 24 h after administration of the nanoparticles have shown decreased AChE activity, reduction in the exploratory performance, significantly higher level of ferric iron in the brains and induction of *casp8*, *casp9* and *jun* genes. Taken together, these findings suggest acute brain toxicity by the inhibition of acetylcholinesterase and induction of apoptosis. © 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Magnetic nanoparticles (MNPs) have attracted great interest in recent years due to their unique physical and chemical properties and their potential applications in various biomedical fields (Lu et al., 2007). They consist of small domains (usually smaller than 100 nm), containing magnetic atoms such as iron, cobalt or nickel that can be easily manipulated using an external magnetic field (Wang et al., 2001). Among magnetic nanoparticles, the superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) are of particular interest on account of the strong magnetic response when the particles are exposed to an external magnetic field and, the lack of residual magnetization when the field is removed. In addition, these particles present biocompatibility, injectability, and may have a high rate of accumulation in the target

tissue if adequate ligands are attached to their surfaces (Ito et al., 2005). SPIONs have found a great number of biomedical applications; for instance, as contrast agents in magnetic resonance imaging, in magnetic separation of cells and proteins, in drug and gene delivery, in anticancer treatments by hyperthermia and tissue engineering (Singh et al., 2010).

Surface characteristics such as size and shape affect the toxicological profile of the nanoparticles (NPs) and their overall in vivo behavior (Chouly et al., 1996). For this reason, it is important to establish the safe upper limit for each use. Diverse aspects of the in vitro toxicity including, cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress generation and some general aspects of the in vivo toxicity of SPIONs, were investigated (for review, see Mahmoudi et al., 2012). For instance, rats that had been intravenously injected with γ -Fe₂O₃ NPs (08 mg/kg) presented toxicity in liver, kidneys and lungs (Hanini et al., 2011). Acute oral exposure to Fe₂O₃-30 NPs caused more than 50% inhibition of total Na⁺-K⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺-ATPase activities in brains of female rats and activation of the hepatotoxicity marker enzymes, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in serum and liver (Kumari et al., 2013). In accordance, due to Fe₂O₃-30 NPs 28 days repeated oral dose,

* Corresponding author at: Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681-12C, Sala 134, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 51 3353 4726; fax: +55 51 3 320 3568.
 E-mail address: mbogo@pu.rs.br (M.R. Bogo).

- Oliveira, E. M. N.; Coelho, F. L.; Zanini, M. L.; Papaléo, R. M.; Campo, L. F. Iron Oxide Nanoparticles Labeled with an Excited State Intramolecular Proton Transfer Dye. *Chem Phys Chem*, v. 17, p. 1-6, 2016. (DOI: 10.1002/cphc.201600472).

Iron Oxide Nanoparticles Labeled with an Excited-State Intramolecular Proton Transfer Dye

Elisa M. N. de Oliveira,^[b] Felipe L. Coelho,^[a] Mara L. Zanini,^[b] Ricardo M. Papaléo,^[b] and Leandra F. Campo^{*[a]}

Excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT) is a particularly well known reaction that has been very little studied in magnetic environments. In this work, we report on the photo-physical behavior of a known ESIPT dye of the benzothiazole class, when in solution with uncoated superparamagnetic iron oxide nanoparticles, and when grafted to silica-coated iron oxide nanoparticles. Uncoated iron oxide nanoparticles promoted the fluorescence quenching of the ESIPT dye, resulting from collisions during the lifetime of the excited state. The assembly of iron oxide nanoparticles with a shell of silica provided recovery of the ESIPT emission, due to the isolation promoted by the silica shell. The silica network gives protection against the fluorescence quenching of the dye, allowing the nanoparticles to act as a bimodal (optical and magnetic) imaging contrast agent with a large Stokes shift.

Magnetite (Fe₃O₄), maghemite (γ-Fe₂O₃) and hematite (α-Fe₂O₃) are the common forms of iron oxides able to produce superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs). Several compounds based on SPIONs have not only size-dependent magnetic properties, but also good biocompatibility and stability in physiological environments, playing an important role in a large number of biomedical applications, including magnetic-field-controlled targeted delivery and contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI).^[1] To improve the efficiency and versatility of SPIONs used in biomedical imaging, hybrid magnetic nanoparticles, incorporating multiple functionalities, have been developed. There is great interest in developing compounds that have both fluorescent and magnetic properties.^[2] However, an important limitation of this combination is that iron oxide nanoparticles have the ability to quench fluorescent dyes by mechanisms that have not been yet clearly elucidated.^[3] A convenient approach to avoid the fluorescence quenching is the construction of core-shell nanostructures based on a magnetic core and a silica shell (SPION@silica).^[4]

The advantage of these core-shell structures is that a single nanoparticle is able to contain many dye molecules, providing better image contrast.^[5]

Different dyes have been used in the construction of core-shell systems, such as near-infrared dyes (NIR),^[6] fluorescein isothiocyanate,^[5b,7] rhodamines,^[2d,4] carbon quantum dots (C-Dots),^[2f] and fluorescent polymers.^[2c,8] However, to the best of our knowledge, the use of dyes that fluoresce in the visible region by excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT) has not been reported so far.

As shown in Scheme 1 A, the proton transfer mechanism starts with the absorption of radiation from an enol tautomer (E) which undergoes ESIPT to form a keto tautomer (K*), giving rise to an emission with a large Stokes shift. Both enol and keto tautomers can fluoresce, depending on the environment with which the dye is surrounded, but the emission of E*→E is always accompanied by a small Stokes shift and the K*→K emission occurs with a large Stokes shift.^[9]

The ESIPT process has been widely investigated in recent decades, because of its importance in chemistry,^[9] biology and biochemistry,^[10] both in solution and when spatially confined.^[11] Fluorescent dyes that undergo ESIPT reactions have been used as membrane probes,^[12] optical sensors,^[13] photoactive materials,^[14] and as fluorescent chemical sensors for Fe³⁺ ions.^[15] In this work, we describe for the first time the behavior of an ESIPT dye in a nanostructured superparamagnetic environment provided by SPIONs.

Specifically, we fabricated a new SPION nanoprobe containing 2-[5'-N-(3-triethoxysilyl)propylurea-2'-hydroxyphenyl] benzothiazole (HBT dye) that was covalently linked to a silica shell by direct surface modification, forming the composite nanoparticle SPION@SiO₂-HBT (Scheme 1B). The HBT dye can react directly with silanol groups of silica to form covalent bonds with the network.^[16] Figure 1 shows the main characteristics of the synthesized nanoparticles. In a first step, the bare iron oxide nanoparticles (NPs) are produced, typically with a mean diameter of 8 ± 2 nm, as extracted from TEM images (Figure 1A). The overall mean particle diameter of the batch was also obtained from the width of the (311) peak in the X-ray diffractogram (not shown) and gives a value of ~10.6 nm, consistent with TEM observations. The addition of silica resulted in rounded SPION@SiO₂ NPs with a thick shell of SiO₂ (Figure 1B). For the SPION@SiO₂ and SPION@SiO₂-HBT systems, the mean diameter was around 225 nm. Several iron oxide particles often appear in the core. Size distributions of the core-shell NPs obtained by dynamic light scattering at various pHs are shown in Figure 1C and Figure 1D. The size distribution is sim-

[a] F. L. Coelho, Dr. L. F. Campo
Applied Organic Photochemistry
Institute of Chemistry
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Av. Bento Gonçalves, 9500. Porto Alegre-RS, CEP 90650-001 (Brazil)
E-mail: leandra.campo@ufrgs.br

[b] E. M. N. de Oliveira, Dr. M. L. Zanini, Dr. R. M. Papaléo
Multidisciplinary Center of Nanoscience and Micro-nanotechnology
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Av. Ipiranga 6681. Porto Alegre-RS, CEP 90619-900 (Brazil)

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <http://dx.doi.org/10.1002/cphc.201600472>.

- Cesero, L.; Oliveira, E. M. N.; Burnett Junior, L. H.; Papaléo, R. M.; Mota, E. G. The addition of silica nanoparticles on the mechanical properties of dental stone. *J. Prosthetic Dent*, v. 118, p. 535-539, 2017. (DOI:10.1016/j.prosdent.2017.01.001).

RESEARCH AND EDUCATION

The addition of silica nanoparticles on the mechanical properties of dental stone

Leonardo De Cesero, DDS, MS, PhD,^a Elisa Magno Nunes de Oliveira, MS, PhD,^b
Luiz Henrique Burnett Junior, DDS, MS, PhD,^c Ricardo Meurer Papaléo, DDS, MS, PhD,^d and
Eduardo Gonçalves Mota, DDS, MS, PhD^e

Alternative die systems to traditional dental stone, including metal dies,^{1,2} synthetic gypsum,³⁻⁸ Type V stone,⁹⁻¹³ epoxy resin,¹⁴ cyanoacrylate, and gum arabic,¹⁵ have been studied and proposed to obtain more accurate and resistant casts. The main reason for the widespread use of gypsum-based materials is that they can be easily modified by physical and chemical methods.^{2,16}

Inorganic filler particles are used in dental materials to increase their strength.¹⁷ Particles such as quartz, colloidal silica, silica glass containing barium, strontium, and zirconia have been used in dental materials as different types of inorganic fillers. Different shapes and sizes of filler particles are used in commercial products and can affect the properties of the materials.¹⁸ An important and recent change in inorganic fillers has been the application of nanotechnology to the development of dental products, with the main goal of improving their mechanical properties.¹⁹

ABSTRACT

Statement of problem. The current application of nanotechnology in dentistry is limited to nanoparticles incorporated into adhesive systems and composite resins. Dental stone is a widely used material, and the incorporation of silica nanoparticles is still unexplored.

Purpose. The purpose of this in vitro study was to evaluate the mechanical properties of dental stone after the addition of silica nanoparticles in different concentrations.

Material and methods. A total of 180 specimens were prepared, 90 for each dental stone (Durone and Fuji Rock). For the control group (CG), no silica particles were added, while test group TGnI had silica nanoparticles added to 1 wt%, and test group TGnV had silica nanoparticles added to 5 wt%. The roughness, diametral tensile strength (DTS), and compressive strength were measured 24 hours after the start of spatulation.

Results. The mean roughness values for Durone were 0.55, 0.36, and 0.28 μm for CG, TGnI, and TGnV; for Fuji Rock, the mean roughness values were 0.47 for CG, 0.31 for TGnI, and 0.35 μm for TGnV. The mean DTS values for Durone were 6.0, 5.1, and 5.0 MPa for CG, TGnI, and TGnV, respectively, and for Fuji Rock, the mean DTS values were 6.4, 5.2, and 4.5 MPa for CG, TGnI, and TGnV, respectively. The mean compressive strength values for Durone were 35.4, 32.7, and 32.4 MPa for CG, TGnI, and TGnV, respectively, and for Fuji Rock, the mean compressive strength values were 42.9, 31.2, and 29.8 MPa for CG, TGnI, and TGnV respectively.

Conclusions. Surface roughness was statistically lower for the Durone and Fuji Rock stones ($P < .001$) when silica nanoparticles were added. The addition of silica nanoparticles did not significantly affect the DTS and compressive strength of Durone compared with CG ($P > .05$) but did affect the DTS of Fuji Rock when 5 wt% was added and the compressive strength in both concentrations ($P < .05$). (*J Prosthet Dent* 2017;■-■-■)

With the emergence of nanoscale technology, materials, including adhesives and composite resins, have been modified by these technological advancements. Such modified materials have improved their mechanical

Supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) 870025/2003-1 and CNPq 484550/2012-8.

^aPostgraduate student, Postgraduate in Dental Materials, Department of Restorative Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

^bPostgraduate student, Department of Physical, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

^cProfessor, Department of Restorative Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

^dCoordinator, Interdisciplinary Center of Nanoscience and Micro-Nanotechnology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

^eProfessor, Department of Restorative Dentistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil.

- Oliveira, G. M. T.; Oliveira, E. M. N.; Pereira, T. C. B.; Papaléo, R. M.; Bogo, M. R. Implications of exposure to dextran-coated and uncoated iron oxide nanoparticles to developmental toxicity in zebrafish. *J Nanopart Res*, v. 19, p. 389, 2017. (DOI: 10.1007/s11051-017-4074-5).

J Nanopart Res (2017) 19:389
<https://doi.org/10.1007/s11051-017-4074-5>



RESEARCH PAPER

Implications of exposure to dextran-coated and uncoated iron oxide nanoparticles to developmental toxicity in zebrafish

Giovanna Medeiros Tavares de Oliveira · Elisa Magno Nunes de Oliveira · Talita Carneiro Brandão Pereira · Ricardo Meurer Papaléo · Maurício Reis Bogo

Received: 8 May 2017 / Accepted: 16 November 2017
 © Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2017

Abstract Iron oxide nanoparticles (IONPs) have been widely investigated as a platform for a new class of multifunctional theranostic agents. They are considered biocompatible, and some formulations are already available in the market for clinical use. However, contradictory results regarding toxicity of IONPs raise a concern about the potential harm of these nanoparticles. Changes in the nanoparticle (NP) physicochemical properties or exposure media can significantly alter their behavior and, as a consequence, their toxic effects. Here, behavior and two-step RT-qPCR were employed to access the potential toxicological effects of dextran-coated IONPs (CLIO-NH₂) and uncoated IONPs (UCIO) in zebrafish larvae. Animals were exposed for 7 days to NP solutions ranging from 0.1–100 µg/mL directly mixed to the system water. UCIO showed high decantation and instability in solution, altering zebrafish mortality but showing no alterations in

behavior and molecular expression analysis. CLIO-NH₂ exposure did not cause significant mortality or changes in hatching rate of zebrafish larvae; however, behavior and expression profiles of the group exposed to lower concentration (1 µg/mL) presented a tendency to decrease the locomotor activity and apoptotic pathway activation.

Keywords Iron oxide nanoparticles · IONPs · Zebrafish · Apoptosis · Behavior · Nanotoxicology

Introduction

Materials at the nanoscale possess distinctive physicochemical properties compared to their bulk counterparts, which make them valuable for biomedical use. Magnetic nanoparticles (MNPs) which include

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11051-017-4074-5>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

G. M. T. de Oliveira · M. R. Bogo
 Graduate Program in Medicine and Health Sciences, School of Medicine, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

G. M. T. de Oliveira (✉) · T. C. B. Pereira · M. R. Bogo
 Laboratory of Genomics and Molecular Biology, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil
 e-mail: giovannamto88@gmail.com

E. M. N. de Oliveira · R. M. Papaléo
 Faculty of Physics, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

T. C. B. Pereira · M. R. Bogo
 Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biosciences, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

R. M. Papaléo · M. R. Bogo
 Interdisciplinary Center of Nanoscience and Micro-NanoTechnology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

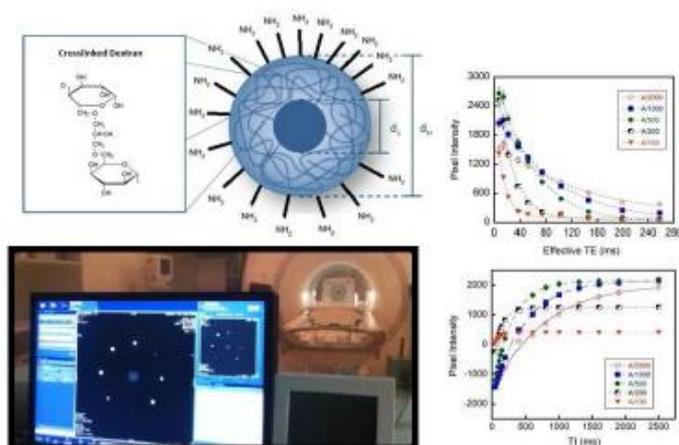
- Oliveira, E. M. N.; Rocha, M. S.; Froner, A. P. P.; Basso, N. R. S.; Zanini, M. L.; Papaléo, R. M. Synthesis and nuclear magnetic relaxation properties of composite iron oxide nanoparticles. Submetido a Química Nova, 2018.

química nova

SYNTHESIS AND NUCLEAR MAGNETIC RELAXATION PROPERTIES OF COMPOSITE IRON OXIDE NANOPARTICLES

Journal:	<i>Química Nova</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Oliveira, Elisa; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Física Rocha, Maximiliano; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Física Froner, Ana ; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Física Basso, Nara ; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Química Zanini, Mara; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Química Papaléo, Ricardo; Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Física
Keyword:	nanoparticles, biomedical imaging, contrast agents
Please, specify if the submission is for a Regular Issue or Special Issue:	Regular Issue

Graphical Abstract



We describe a nanoparticle system with magnetic core coated with dextran polymer. The coating was also crosslinked, grafted with amino groups and bioconjugated with a fluorophore, allowing simultaneous magnetic resonance and optical imaging contrast action.

SYNTHESIS AND NUCLEAR MAGNETIC RELAXATION PROPERTIES OF COMPOSITE IRON OXIDE NANOPARTICLES

Elisa M. N. de Oliveira^{a,a}, Maximiliano S. da Rocha^a, Ana Paula P. Froner^c, Nara R. S. Basso^b,
Mara L. Zanini^b, and Ricardo M. Papaléo^c

^aInterdisciplinary Center of Nanoscience and Micro-NanoTechnology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, 90619-900 Porto Alegre - RS, Brazil

^bFaculty of Chemistry, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, 90619-900 Porto Alegre - RS, Brazil

^cFaculty of Physics, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, 90619-900 Porto Alegre - RS, Brazil

*e-mail: elisa.oliveira@acad.pucrs.br

-----marque uma alternativa, não apague o texto em azul-----

Manuscrito com material suplementar

Manuscrito sem material suplementar

7.1.2. Resumos de congressos/conferências

Oliveira, E. M. N.; Oliveira, G. M. T.; Pereira, T. C. B.; Papaleo, R. M.; Bogo, Maurício Reis. In vivo toxicity of dextran-coated and uncoated iron oxide nanoparticles. In: **XVI Brazil MRS Meeting**, 2017.

Oliveira, E. M. N.; Rocha, M. S.; Zanini, M. L.; Papaleo, R. M. Nuclear magnetic relaxivity of iron oxide nanoparticles with different coating. In: **XVI Brazil MRS Meeting, 2017**, Gramado, 2017.

Valente, C. A.; Oliveira, E. M. N.; Selli, G. I.; Malmonge, J. A.; Basso, N. R. S.; Papaleo, R. M. Synthesis and characterization of polypyrrole nanofibers with iron oxide nanoparticles. In: **XVI Brazil MRS Meeting**, 2017, Gramado, 2017.

Selli, G. I.; Oliveira, E. M. N.; Camargo, M. C.; Campo, L. F.; Papaleo, R. M. Synthesis of silica-coated iron oxide nanoparticles of different shell thicknesses. In: **XVI Brazil MRS Meeting**, 2017, Gramado, 2017.

Rocha, M. S.; Schmude, A. V.; Oliveira, E. M. N.; Valle, M. P.; Barquin, L. F.; Viegas, S. N. O.; Geshev, J.; Grande, P. L.; Papaleo, R. M. Radiation effects on functionalized magnetic nanoparticles. In: **XVI Brazil MRS Meeting**, 2017.

Oliveira, E. M. N.; Coelho, F. L.; Zanini, M. L.; Campo, L. F.; Papaléo, R. M. Synthesis and Characterization of Magneto-fluorescent Nanoparticles with Excited State Intramolecular Proton Transfer. In: *Nanotech 2016 - Conference and Expo*, 2016, Washington. Nanotech 2016 - Conference and Expo, 2016. v. 2016. p. 131-134.

Oliveira, E. M. N.; Rocha, M. S.; Caimi, P. A.; Zanini, M. L.; Basso, N. R. S.; Papaléo, R. M. Nanopartículas de óxido de ferro para uso como agentes de contraste em imagens por ressonância magnética. In: **13 ° Congresso Brasileiro de Polímeros**, 2015, Natal. Anais 13º Congresso Brasileiro de Polímeros, 2015.

Oliveira, G. M. T.; Kist, L. W.; Pereira, T. C. B.; Oliveira, E. M. N.; Leite, C. E.; Papaléo, R. M.; Bogo, Maurício Reis. Coating influence on locomotor behavior of zebrafish larvae treated with SPIONs. In: *Nanotech 2016 - Conference and Expo*, 2016, Washington. TechConnect World Innovation Conference and Expo, 2016. p. 96-96.

Oliveira, E. M. N.; Caimi, P. A.; Rocha, M. S.; Coelho, F. L.; Zanini, M. L.; Papaléo, R. M. Iron oxide@SiO₂ nanoparticles tagged with an ESIPT fluorescent compound. In: Anais **XIV Brazilian MRS Meeting**, 2015, Rio de Janeiro. Anais XIV Brazilian MRS Meeting, 2015.

Rocha, M. S.; Oliveira, E. M. N.; Caimi, P. A.; Zanini, M. L.; Basso, N. R. S.; Papaléo, R. M. Relaxivity of dextran-coated iron oxide nanoparticles in magnetic resonance medical equipments of 1.5 and 3.0 T. In: **XIV Brazilian MRS Meeting**, 2015, Rio de Janeiro. Anais XIV Brazilian MRS Meeting, 2015.

Kist, L. W.; Oliveira, G. M. T.; Pereira, T. C. B.; De Oliveira, Elisa Magno Nunes; Papaléo, R. M.; Bogo, Maurício Reis. Toxicology of dextran-coated SPIONs in zebrafish larvae. In: **9th European Zebrafish Meeting**, 2015, Oslo. Livro de resumos - 9th European Zebrafish Meeting, 2015.

Oliveira, G. M. T.; Kist, L. W.; Pereira, T. C. B.; Bortolotto, J. W.; Oliveira, E. M. N.; Leite, C. E.; Basso, N. R. S.; Papaléo, R. M.; Bogo, Maurício Reis. Transient modulation of acetylcholinesterase by dextran-coated iron oxide nanoparticles in zebrafish brain. In: **9th FENS Forum of Neuroscience**, 2014, Milão. E-book of 9th FENS Forum of Neuroscienc, 2014.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- [1] HORNYAK, G.L. Dutta, J.; Tibbals. **Introduction to nanoscience**. 1ª ed. Boca Raton: CRC, 2008, 815p.
- [2] KOCH, C. C. **Nanostructured materials: processing, properties and potencial applications**. 1ª ed. New York: Noyes, 2002, 612 p.
- [3] WAGNER, V.; DULLAART, A.; BOCK, A. K.; ZWECK, A. The emerging nanomedicine landscape. **Nature Biotec**, v. 24, n ° 10, p. 1211-1217, 2006.
- [4] KOO, O. M.; Rubinstein, R.; Onyuksel, H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. **Nanomed Nanotec Med**, v. 1, p. 193-212, 2005.
- [5] CORNELL, M. R. SCHWERTMANN, U. **The oxides-structure, properties, reaction, occurrences and uses**. 2ª ed. Freising, Wiley-VCH, 2003, 664p.
- [6] SCHWERTMANN, U.; CORNELL, R. M. **Iron oxides in the laboratory: preparation and characterization**. 2ª ed. Wiley-VCH, 200. 210p.
- [7] TEJA A. S.; KOH, P. Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. **ProgCrys Growth Charact Mat.**, v. 55, p. 22-45, 2009.
- [8] LU, A.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. **Angew Chem-Ger Edit**, v. 46, p. 1222-1244, 2007.
- [9] QIAO, R.; YANG, C.; GAO, M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications. **J Mat Chem**, v. 19, p. 6274-6293, 2009.
- [10] GUBIN, S. P. **Magnetic nanoparticles**. Ed. 1st. Wiley-VCH, 2009. 483p.
- [11] BURSTEIN, E. COHEN, M. L. MILLS, D. L. STILES, P. J. **Nanomagnetism - ultrathin films, multilayer and nanostructures**. 1ª ed. Amsterdam: Elsevier. 2006. 337p.
- [12] LODHIA, J.; MANDARANO, G.; FERRIS, N. J.; EU, P.; COWELL, S. F. Development and use of iron oxide nanoparticles (Part 1): Synthesis of iron oxide nanoparticles for MRI. **Biomed Imaging Interv J**, v. 6, n ° 2, p. 12, 2010.
- [13] BARROS, A. L. B.; TSOURKAS, A.; SABOURY, B.; CARDOSO, V. N.; ALAVI, A. Emerging role of radiolabeled nanoparticles as an effective diagnostic technique. **EJNMMI Res**, v. 2, p. 2-39, 2012.
- [14] SHARIFIA, S.; SEYEDNEJADB, H.; LAURENT, S.; ATYABIE, F.; SAEIE, A. A.; MAHMOUDI M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vivo molecular and cellular imaging. **Cont Med Mol Imag**, v. 10, p. 329–355, 2015.
- [15] MAHMOUDI, M.; SANT, S.; WANG, B.; LAURENT, S.; SEN, T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 63, p. 24-46, 2011.
- [16] JOSEPHSON, L.; KIRCHER, M. F.; MAHMOOD, U.; TANG, Y.; WEISSLEDER, R. Near-Infrared Fluorescent Nanoparticles as Combined MR/Optical Imaging Probes. **Bioconj Chem**, v. 13, 554-560, 2002.
- [17] CAI, W.; CHEN, X. Nanoplatforms for Targeted Molecular Imaging in Living Subjects. **Small**, v. 3, n° 11, p. 1840- 1854, 2007.
- [18] SANTRA, S.; KAITTANIS, C.; GRIMM, J.; PEREZ, J. M. Drug/Dye-Loaded, Multifunctional Iron Oxide Nanoparticles for Combined Targeted Cancer Therapy and Dual Optical/Magnetic Resonance

Imaging. **Small**, v. 5, n° 16, p. 1852-1868, 2009.

[19] YOO, M. K.; PARK, I. K.; LIM, H. T.; LEE, S. J.; JIANG, H. L.; KIM, Y. K.; CHOI, Y. J.; CHO, M. H.; CHO, C. S. Folate-PEG-superparamagnetic iron oxide nanoparticles for lung cancer imaging. **Acta Biomaterialia**, v.8, p.3005-3013, 2012.

[20] ROSEN, J. E.; CHAN, L.; SHIEH, D. B.; GU, F. X. Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics. *Nanomed*: **Nanotech Biol Med**, v. 8, p. 275-290, 2012.

[21] BAUTISTA, M. C.; MIGUEL, O. B.; MORALES, M. O.; SERNA, C. J.; VERDAGUER, S. V. Surface characterization of dextran-coated iron oxide. **J Magn Mag Mat**, v. 293, p. 20-27, 2005.

[22] JARZYNA, P. A.; GIANELLA, A.; SKAJAA, T.; KNUDSEN, G.; DEDDENS, L. H.; CORMODE, D. P.; FAYAD, Z. A.; et al. M. Multifunctional imaging Nanoprobes. **Nanomed Nanobiotech**, v. 2, p. 138-150, 2010.

[23] PINHEIRO, P. C.; SILVA, A. L. D.; TAVARES, D. S.; CALATAYUD, M. P.; GOYA, G. F.; TRINDADE, T. Fluorescent Magnetic Bioprobes by Surface Modification of Magnetite Nanoparticles. **Materials**, v. 6, p. 3213-3225, 2013.

[24] LAURENT, S.; FORGE, D.; PORT, M.; ROCH, A.; ROBIC, C.; ELST, L. V.; MULLER, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. **ACS**, v. 108, p. 2064-2110, 2008.

[25] LEE, N. YOO, D.; LING, D.; CHO, M. H.; HYEON, T.; CHEON, J. Iron Oxide Based Nanoparticles for Multimodal Imaging and Magneto-responsive Therapy. **Chem Rev**, v. 115, p. 10637-10689, 2015.

[26] WEISSLEDER, R.; STARK, D. D.; ENGELSTAD, B. L.; BACON, B. R.; et al. Superparamagnetic iron oxide: Pharmacokinetics and toxicity. *Amer. J Roentgen*, v. 152, p. 167-173, 1989.

[27] KUNZMANN, A.; ANDERSSON, B.; THURNHERR, T.; KRUG, H.; SCHEYNIUS, A.; FADEEL, B. Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1810, p. 361-373, 2011.

[28] MEDAROVA, Z.; PHAM, W.; FARRAR, C.; PETKOVA, V.; MOORE, A. In vivo imaging of siRNA delivery and silencing in tumors. **Nature**, v. 13, n°3, p. 372-377, 2007.

[29] Moore, A.; Medarova, Z.; Potthast, A.; Dai, G. In Vivo Targeting of Underglycosylated MUC-1 Tumor Antigen Using a Multimodal Imaging Probe. **Cancer Res**, v. 64, p. 1821-1827, 2004.

[30] POOLE, C. P. OWENS, F. J. **Introducción a La Nanotecnología**. Barcelona: Reverté. 2007. 407p.

[31] CULLITY, B. D. GRAHAM, C. D. **Introduction to magnetic materials**. 2ª ed. Hoboken: Wiley. 2009. 544p.

[32] EISBERG, R. RESNICK, R. **Física Quântica: átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 1979. 928p.

[33] OLIVEIRA, E. M. N. **Desenvolvimento de sondas nanoestruturadas de óxido de ferro para imageamento biomédico não invasivo**. Porto Alegre, 2014. 123p. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais. Faculdade de Engenharia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

[34] FREY, N. A.; PENG, S.; CHENG, K.; SUN, S. Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage. **Royal Chem Soc**, v. 38, p. 2532-2542, 2009.

[35] CHANDRA, S.; BARICK, K. C.; BAHADUR, D. Oxide and hybrid nanostructures for therapeutic applications. **Ad Drug Deliv Rev**, v. 63, p. 1267-1281, 2011.

[36] SCHLADT, T.; SCHNEIDER, K.; SCHILD, H.; TREMEL, W. Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment. **Dalton T**, v. 40, p. 6315-6343, 2011.

-
- [37] FIGUEROLA, A.; CORATO, R. D.; MANNA, L.; PELLEGRINO, T. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. **Pharmacol Res**, v. 62, p. 126-143, 2010.
- [38] CARRILLO, A.; SERRANO, E.; LUQUE, R.; MARTINEZ, J. G. Microwave-assisted catalysis by iron oxide nanoparticles on MCM-41: Effect of the support morphology. **Appl Catal A-Gen**, v. 453, p. 383-390, 2013.
- [39] MOODLEY, P.; SCHEIJEN, F. J. E.; NIEMANTSVERDIET, J. W.; THÜNE, P. C. Iron oxide nanoparticles on flat oxidic surfaces-Introducing a new model catalyst for Fischer-Tropsch catalysis. **Catal Today**, v. 154, 142-148, 2010.
- [40] SREEDHAR, B. K.; KUMAR, R. N.; SHARMA, P.; RUHELA, S.; PHILIP, J.; SUNDARRAJ, S. I.; CHAKRABORTY, N.; et al. Development of active magnetic bearings and ferrofluid seals toward oil free sodium pumps. **Nuc Eng Design**, v. 265, p. 1166-1174, 2013.
- [41] CIGLANSKA, M.; JANCOVICOVÁ, V.; HAVLINOVA, B.; MACHATOVÁ, Z.; BREZOVA, V. The influence of pollutants on accelerated ageing of parchment with iron gall inks. **J Cult Herit**, v. 15, n ° 4, p. 373-381, 2014.
- [42] LEE, S. Y.; AHN, C. Y.; LEE, J.; CHANG, J. H. Amino acid side chain-like surface modification on magnetic nanoparticles for highly efficient separation of mixed proteins. **Talanta**, v. 93, p. 160– 165, 2012.
- [43] MOLDAY, R. S. **Magnetic iron-dextran microspheres**. Int. Cl.3 A61K 43/00; G01N 27/00; G01N 33/54; D06M 16/00. US. Cl. 424/1.1; 436/526; 436/529; 436/530; 435/264; 210/632; 252/62.53; 252/62.55; 424/9. Apr. 5, 1982. United States Patent, Massachusetts, p. 1-6.
- [44] PANKHURST, Q. A.; CONNOLY, J.; JONES, S. K.; DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **J Phys D**, v. 36, p. R167-R181, 2003.
- [45] SADHASIVAM, S.; SAVITHA, S.; WU, C. J.; LIN, F. H.; STOBINSKI, L. Carbon encapsulated iron oxide nanoparticles surface engineered with polyethylene glycol-folic acid to induce selective hyperthermia in folate over expressed cancer cells. **Inter J Pharmac**, v. 480, p. 8–14, 2015.
- [46] COROT, C.; ROBERT, P.; IDÉE, J. M.; PORT, M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. **Adv Drug Deliv Ver**, v. 58, p. 1471–1504. 2006.
- [47] HAHN, M. A.; Z, A. K.; SHARMA, P.; BROWN, S. C.; MOUDGIL, B. M. Nanoparticles as contrast agents for in-vivo bioimaging: current status and future perspectives. **Anal Bioanal Chem**, v. 399, p. 3–27, 2011.
- [48] <http://www.dexterimg.com/> Acessado em maio de 2015.
- [49] <https://www.oceannanotech.com/> Acessado em maio de 2015.
- [50] <http://www.euris.org/> Acessado em maio de 2015.
- [51] <https://www.advancemag.com/> Acessado em maio de 2015.
- [52] SINGH, R.; LILLARD JR, J. W.; Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Exper Mol Pathol**, v. 86, n ° 3, p. 215-223, 2009.
- [53] GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomat**, v. 26, p. 3995-4021, 2005.
- [54] KHALAFALLA, S. E.; REIMERS, G. W. Preparation of dilution-stable aqueous magnetic fluids. **IEEE Transac Mag**, v. 16, n ° 2, 1980.
- [55] SCHNEPP, Z.; WIMBUSH, S. C.; ANTONIETTI, M.; GIORDANO, C. Synthesis of Highly Magnetic Iron Carbide Nanoparticles via a Biopolymer Route. **Chem Mat**, v. 22, 5340-5344, 2010.
- [56] GARCIA, M. T. C.; LEITE, R. B. R.; GARCIA, R. B. R.; KAWACHI, E. Y. The competing effect of ammonia in the synthesis of iron oxide/silica nanoparticles in microemulsion/sol-gel system. **Colloid**

Surface A, v. 422, p. 136–142, 2013.

[57] AN, H.; AHN, H. J. A change in morphology from anatase-TiO₂ nanoparticles to anatase-TiO₂ nanoflakes via electrospray. **Mat Letters**, v. 81, p. 41-44, 2012.

[58] WANG, S.; TANG, J.; ZHAO, H.; WANA, J.; CHEN, K. Synthesis of magnetite–silica core–shell nanoparticles via direct silicon oxidation. **J Colloid Interf Sci**, v. 432, p. 43-46, 2014.

[59] QASEM, R. A. M.; GEDANKEN, A. Sonochemical synthesis of stable hydrosol of Fe₃O₄ nanoparticles. **J Colloid Interf Sci**, v. 284, 489-494, 2005.

[60] HONG, R. Y.; FENG, B.; CHEN, L. L.; LIU, G. H.; LI, H. Z.; et al. Synthesis, characterization and MRI application of dextran-coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. **Biochem Eng J**, v. 42, p. 290-300, 2008.

[61] MAITY, D.; AGRAWAL, D. C. Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. **J Magn Magn Mat**, v. 308, p. 46–55, 2006.

[62] BRIDOT, J.; STANICKI, D.; LAURENT, S.; BOUTRY, S.; GOSSUIN, Y.; LECLÈRE, P.; et al. New carboxysilane-coated iron oxide nanoparticles for nonspecific cell labelling. **Contrast Media Mol I**, v. 8, p. 466–474, 2013.

[63] ALIVISATOS, A. P.; GU, W.; LARABELL, C. Quantum dots as cellular probes. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 7, p. 55–76, 2005.

[64] MASSART, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE Transac. Magn*, v. 17, n ° 2, 1981.

[65] MOHAMMAD-BEIGI, H.; YAGHMAE, S.; ROOSTAAZAD, R.; BARDANIA, H.; ARPANAEI, A. Effect of pH, citrate treatment and silane-coupling agent concentration on the magnetic, structural and surface properties of functionalized silica-coated iron oxide nanocomposite particles. **Phys E**, v. 44, p. 618-627, 2011.

[66] GRIBANOV, N. M.; BIBIK, E. E.; BUZUNOV, O. V.; NAUMOV, V. N. Physicochemical regularities of obtaining highly dispersed magnetite by the method of chemical condensation. **J Magn Magn Mat**, v. 85, p. 7-10, 1990.

[67] WEI, C.; WEI, W.; MORRIS, M.; KONDO, E.; GORBUNOV, M.; TOMALIA, D. A. Nanomed. **Drug Deliv**, v. 91, p. 863–870, 2007.

[68] SUN, W. C.; GEE, K. R.; HAUGLAND, R. P. Synthesis of Novel Fluorinated Coumarins: Excellent UV-Light Excitable Fluorescent Dyes. **Bioorg Med Chem**, v. 8, p. 3107, 2008.

[69] HONG, R. Y.; LI, J. H.; QU, J. M.; CHEN, L. L.; LI, H. Z. Preparation and characterization of magnetite/dextran nanocomposite used as a precursor of magnetic fluid. **Chem Eng J**, v. 150, p. 572-580, 2009.

[70] MUTHIAH M, PARK I, CHO C. Surface modification of iron oxide nanoparticles by biocompatible polymers for tissue imaging and targeting. **Biotech Adv**, v. 31, n ° 8, p. 1124-1236.

[71] DIAS; A. M. G. C.; HUSSAIN, A. MARCOS, A. D.; ROQUE, A. C. A. Biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides. **Biotech Adv**, v. 29, p.142–155, 2011.

[72] OSS, C. J. V.; NORDE, W. VISSER, H. DLVO Theory. **Colloid Surface B**, v. 14, p. 1-2, 1999.

[73] CAMPÉLJ. S.; MAKOVEC, D.; DROFENIK, M. Preparation and Properties of Water-Based Magnetic Fluids. **J Phys-Condens Matter**, v. 20, p. 204101, 2008.

[74] YEE, C.; KATABY, G.; ULMAN, A.; PROZOROV, T.; WHITE, H.; KING, A.; et al. Self-Assembled Monolayers of Alkanesulfonic and -phosphonic Acids on Amorphous Iron Oxide Nanoparticles. **Langmuir**, v. 15, p. 7111-7115, 1999.

[75] TSIAPA, I.; EFTHIMIADOU, E. K.; FRAGOGEORGI, E.; LOUDOS, G.; VARVARIGOU, A. D.;

- BOUZIOTIS, P.; et. al. 99mTc-labeled aminosilane-coated iron oxide nanoparticles for molecular imaging of amb3-mediated tumor expression and feasibility for hyperthermia treatment. **J Colloid Interf Sci**, v. 433, p.163–175, 2013.
- [76] TOURINHO, F. A.; RAYMONDE, F.; MASSART, R. Aqueous ferrofluids based on manganese and cobalt ferrites. **J Mat Sci**, v. 25, p. 3249-3254, 1990.
- [77] HRADIL, J.; PISAREV, A.; BABIC, M.; HORÁK, D. Dextran-modified iron oxide nanoparticles. **China Part**, v. 5, p. 162–168, 2007.
- [78] YU, M.; HUANG, S.; YU, K. J.; CLYNE, A. M. Dextran and polymer polyethylene glycol (peg) coating reduce both 5 and 30 nm iron oxide nanoparticle cytotoxicity in 2d and 3d cell culture. **Int J Mol Sci**, v.13, p. 5554-5570, 2012.
- [79] BAUTISTA, M. C.; MIGUEL, O. B.; MORALES, M. O.; SERNA, C. J.; VERDAGUER, S. V. Surface characterization of dextran-coated iron oxide. **J Magn Mag Mat**, v. 293, p. 20-27, 2005.
- [80] AGRAWAL, P.; STRIJKERS, G. NICOLAY, K.; Chitosan-based systems for molecular imaging. **Adv Drug Deliver Rev**, v. 62, p. 42-58, 2010.
- [81] LARSEN, C. Dextran prodrugs - structure and stability in relation to therapeutic activity. **Adv Drug Del Rev**, v. 3, p. 103-154, 1989.
- [82] MEHVAR, R. Dextran for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. **J Control Release**, v. 69, p. 1-25, 2000.
- [83] SYUSABURO, H.; MASALATSU, H. **Magnetic iron oxide–dextran complex and process for its production**. US4101435A, July, 18, 1978. United States.
- [84] MOLDAY, R.; MACKENZIE, D. Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells. **J Immunol Methods**, v .52, p. 353-367, 1982.
- [85] XU, X. Q.; SHEN, H.; XU, J. R.; XU, J.; LI, J. X.; XIONG, X. M. Core-shell structure and magnetic properties of magnetite magnetic fluids stabilized with dextran. **Appl Surf Sci**, v. 252, p. 494-500, 2005.
- [86] DASHA, M.; CHIPELLINI, F.; OTTENBRITEB, R. M.; CHIPELLINI, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical. **Appl Prog Pol Sci**, v. 36, p. 981–1014, 2011.
- [87] BHATTACHARYA, D.; SAHU, S. K.; BANERJEE, I.; DAS, M.; MISHRA, D.; MAITI, T. K.; PRAMANIK, P. Synthesis, characterization, and in vitro biological evaluation of highly stable diversely functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **J Nanopart Res**, v. 13, p. 4173-4189, 2011.
- [88] UNSOY, G.; YALCIN, S.; KHODADUST, R.; GUNDUZ, G.; GUNDUZ, U. Synthesis optimization and characterization of chitosancoated iron oxide nanoparticles produced for biomedical applications. **J Nanopart Res**, v. 14, p. 1-13, 2012.
- [89] SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; RUDZINSKI, W. E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **J Control Release**, v. 70, p. 1–20, 2001.
- [90] HU, F., WEI, L., ZHOU, Z., RAN, Y., LI, Z., GAO, M. Preparation of biocompatible magnetite nanocrystals for in vivo magnetic resonance detection of cancer. **Adv Mater**, v. 18, p. 2553 -2556, 2006.
- [91] MASOUDI, A., HOSSEINI, H.R.M., SHOKRGOZAR, M.A., AHMADI, R., OGHABIAN. The effect of poly(ethylene glycol) coating on colloidal stability of superparamagnetic iron oxide nanoparticles as potential MRI contrast agent. **Int J Pharm**, v. 433, p. 129–141, 2012.
- [92] GARCÍA-JIMENO, S., ESTELRICH, F. Ferrofluid based on polyethylene glycol-coated iron oxide nanoparticles: characterization and properties. **Coll Surf A**, v. 420, 74–81, 2013.
- [93] BARRERA, C., HERRERA, A.P., RINALDI, C. Colloidal dispersions of monodisperse magnetite nanoparticles modified with poly (ethylene glycol). **J Coll Interface Sci**, v. 329, p. 107–113, 2009.
- [94] ABUCHOWSKI A.; VAN EST, T.; PALCZUK, N. C.; DAVIS, F. F. Alteration of immunological properties of bovine serum albumin by covalent attachment of polyethylene glycol. **J Biol Chem**, v. 252, p.

3578–358, 1977.

[95] LIU, D. WU, W.; LING, J.; WEN, S.; GU, N.; ZHANG, X. Effective PEGylation of Iron Oxide Nanoparticles for High Performance In Vivo Cancer Imaging. **Adv Funct Mater**, v. 21, p. 1498–1504, 2011.

[96] ZÜNDORF, I.; DINGERMANN, T. PEGylation - a well-proven strategy for the improvement of recombinant drugs. **Pharmazie**, v. 69, p. 323-326, 2014.

[97] AMSTAD, E.; GILLICH, T.; BILECKA, I.; TEXTOR, M.; REIMHULT, E. Ultrastable Iron Oxide Nanoparticle Colloidal Suspensions Using Dispersants with Catechol-Derived Anchor Groups. **Nano Lett**, v. 9, p. 4042, 2009.

[98] MAHMED, N.; HECZKO, O.; LANCOK, A.; HANNULA, S.P. The magnetic and oxidation behavior of bare and silica-coated iron oxide nanoparticles synthesized by reverse co-precipitation of ferrous ion (Fe^{2+}) in ambient atmosphere. **J Magn Mag Mat**, v. 353, p. 15–22, 2014.

[99] MOHAMMADI, S.; KHAYATIAN, G.; ATASHKAR, B.; ROSTAM, A. Synthesis and Application of Magnetic Nanoparticle Supported Ephedrine as a New Sorbent for Preconcentration of Trace Amounts of Pb and Cu in Water Samples. **J Braz Chem Soc**, v. 25, n. 11 p. 2039-2047, 2014.

[100] YOON, T. J.; YU, K. N.; KIM, E. KIM, J. S.; KIM, B. G.; YUN, S. H.; et al. Specific targeting, cell sorting and bioimaging with smart magnetic silica core–shell nanomaterials. **Small**, v. 2, p. 209–215, 2006.

[101] STANICK, I. D.; BOUTRY, S.; LAURENT, S.; WACHEUL, A. L.; NICOLAS, E.; CROMBEZ, D.; ELST, L. V.; DENIS, L. J.; LAFONTAINE, MULLER R. N. Carboxy-silane coated iron oxide nanoparticles: a convenient platform for cellular and small animal imaging. **J Mater Chem B**, v. 2, p. 387, 2014.

[102] STOBER, W.; FINK, A. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. **J Coll Interf Sci**, v. 26, p. 62-69, 1968.

[103] DENG, Y. H.; WANG, C. C.; HU, J. H.; YANG, W. L.; FU, S. K. Investigation of formation of silica-coated magnetite nanoparticles via sol–gel approach. **Colloid Surface A**, v. 262, p. 87–93, 2005.

[104] DIGIGOW, R. G.; DECHÉZELLES, J. F.; DIETSCH, H.; GEISSBÜHLER, I.; VANHECKE, D.; GEERS, C.; et al. Preparation and characterization of functional silica hybrid magnetic nanoparticles. **J Magn Magn Magn**, v. 362, p. 72–79, 2014.

[105] STOREY, P. **Introduction to Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy. In: Magnetic Resonance Imaging: Methods and Biologic Applications.** Totowa, 2006, p. 3-57.

[106] HUETTEL, S. A. SONG, A. W. McCARTHY. **Funcional Magnetic Resonance Imaging.** 2^a ed. Sunderland: Sinauer, 2009, 542p.

[107] YAN, G. P.; ROBINSON, L.; HOGG, P. Magnetic resonance imaging contrast agents: Overview and perspectives. **Radiography**, v. 13, p. e5-e19, 2007.

[108] JIN, R.; LIN, B; LI, D.; AI, H. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MR imaging and therapy: design considerations and clinical applications. **Cur Op Pharmac**, v. 18, p. 18-27, 2014.

[109] HAGE, M. C. F. N. S. IWASAKI, M. Imagem por ressonância magnética: princípios básicos. *Ciência Rural*, **Santa Maria**, v. 39, n. 4, p.1287-1295, 2009.

[110] ROBERTS, P. A. WILLIAMS, J. **Farr's Physics for Medical Imaging.** 2^a ed. Edinburgh: Saunders, 2008, 199p.

[111] HASHEMI, R. H.; BRADLEY, W. G. **MRI: The Basics.** 1^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. 307p.

[112] WEISSLEDER, R. ROSS, B. D. REHEMULLA, A. GAMBHIR, S. S. **Molecular imaging: principles and practice.** Connecticut: PMHM-USA, p. 1357, 2010.

[113] DEBROYE, E.; PARAC-VOGT, N. P. N. Towards polymeric lanthanide complexes as dual contrast agents for magnetic resonance and optical imaging. **Chem Soc Rev**, v. 43, p. 8178, 2014.

- [114] CARAVAN, P.; ELLISON, J. J.; McMURRY, T. J.; LAUFFER, R. B. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. **Chem Rev**, v. 99, n. 9, p. 2293–2352, 1999.
- [115] RUDIN, M. **Molecular Imaging: Principles and Application in Biomedical Research**. 2nd ed, 2005, p. 148-174.
- [116] JASANOFF, A. **Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging: An Overview**. In: **Cancer Imaging: Lung and Breast Carcinomas**. Ed. San Diego, 2008, v. 1, 63-77p.
- [117] NA, H. B.; SONG, I. C.; HYEON, T. Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents. **Adv Mater**, v. 21, p. 2133–2148, 2009.
- [118] VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**. 1st ed. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002.
- [119] SAUER, M.; HOFKENS, J.; ENDERLEIN, J. **Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging**. 1st ed. Wiley-VCH, 2011.
- [120] CAMPO, L. F. **Síntese de materiais fotossensíveis baseados em corantes fluorescentes como meio ativo para dispositivos ópticos**. Porto Alegre, 2003, 202p. Tese de Doutorado em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. 2003.
- [121] SLAVÍK, J. **Fluorescence Microscopy and Fluorescent Probes**. 1^a ed. Nova York: Springer Science & Business Media, 1996, 306p
- [122] GOSLING, J. P. A Decade of Development in Immunoassay Methodology. **Clin Chem**, v. 36, p. 1408, 1990.
- [123] GÜRSES, A.; AÇIKYILDIZ, M.; GÜNEŞ, K.; GÜRSES, M. S. **Dyes and Pigments: Their Structure and Properties**. 1st ed. Singer, 2016, 13-28p.
- [124] DEBBAGE, P.; JASCHKE, W. Molecular imaging with nanoparticles: giant roles for dwarf actors. **Histochem. Cell Bio**, v. 130, p. 845-875, 2008.
- [125] CHEKINA, N.; HORÁK, D.; JENDELLOV, P.; TRCHOV, M.; BENE, M. J.; HRUB, M.; et al. Fluorescent magnetic nanoparticles for biomedical applications. **J Mater Chem**, v. 21, p. 7630, 2011.
- [126] SUN, C.; LEE, J. S. H.; ZHANG, M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. **Adv Drug Del Rev**, v. 60, p. 1252–1265, 2008.
- [127] HOLLER, M. G.; CAMPO, L. F.; BRANDELLI, A.; STEFANI, V. Synthesis and spectroscopic characterization of 2-(2-hydroxyphenyl)benzazole isothiocyanates as new fluorescent probes for proteins. **J. Photochem. Photobio. A: Chem**, v. 149, p. 217–225, 2002.
- [128] DOMINGUES, N. S.; KRUG, C.; LIVOTTO, P. R.; STEFANI, V. Computational study of the excited states of 2,5-bis(benzoxazol-2-yl)-hydroquinone and its monomethoxy derivative. **J Chem Soc**, v. 2, p. 1861-1865, 1997.
- [129] MATHIS, C. A.; WANG, Y.; HOLT, D. P.; HUANG, G. F.; DEBNATH, M. L.; et al. Synthesis and evaluation of ¹¹C-labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents. **J Med Chem**, v. 46, p. 2740-2754, 2003.
- [130] OLIVEIRA, E. M. N.; COELHO, F. L.; ZANINI, M. L.; PAPALÉO, R. M.; CAMPO, L. C. Iron Oxide Nanoparticles Labeled with an Excited-State Intramolecular Proton Transfer Dye. **Chem Phys Chem**, v. 17, p. 1 – 6, 2016.
- [131] KRUEGER, A. T.; Imperiali, B. Fluorescent Amino Acids: Modular Building Blocks for the Assembly of New Tools for Chemical Biology. **Chem Bio Chem**, v. 14, p. 788 – 799, 2013.
- [132] HARKISS, A.; H.; SUTHERLAND, A. Recent advances in the synthesis and application of fluorescent α -amino acids. **Org Biomol Chem**, v. 14, p. 8911–8921, 2016.
- [133] AMSTERDAM, A.; LIN, S.; HOPKINS, N. The Aequorea victoria Green Fluorescent Protein Can

Be Used as a Reporter in Live Zebrafish Embryos. **Dev Biol**, v. 171, n ° 1, p. 123-129, 1995.

[134] RANA, A.; SIDDIQUI, N.; KHAN, S. S. Benzothiazoles: a new profile of biological activities. **Ind J Pharm Sci**, v. 69, n ° 1, p. 10-17 p, 2007.

[135] ALI, R.; SIDDIQUI, N. Biological Aspects of Emerging Benzothiazoles: A Short Review. **J Chem**, v. 5, p. 1-12, 2013.

[136] GUPTA, S.; AJMERA, N.; GAUTAM, N.; SHARMA, R.; GAUTAM, D. Novel synthesis and biological activity study of pyrimido [2,1-b] benzothiazoles. **Ind J Chem**, v. 48B, p. 48B:853-858, 2009.

[137] MAHARAN M, WILLIAM S, RAMZY F, SEMBEL A. Synthesis and in vitro Evaluation of new benzothiazole derivatives as schistosomicidal agents. **Molecules**, v. 12, p. 622-633, 2007.

[138] MATTSON, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. **Nature**, v. 430, p. 631-639, 2004.

[139] ZHOU, J.; FA, H.; YIN, W.; ZHANG, J.; HOU, C.; HUO, D.; et al. Synthesis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with a DDNP-carboxyl derivative for in vitro magnetic resonance imaging of Alzheimer's disease. **Mat Sci Eng C**, v. 37, p. 348-355, 2014.

[140] KADIR A.; NORDBERG A. Target-specific PET probes for Neurodegenerative Disorders related to Dementia. **J Nucl Med**, v. 51, n ° 9, p. 1418-1430, 2010.

[141] SAHA, G. B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**. 6th ed. Cleveland: Springer, 2010, 427p.

[142] AGDEPPA, E. D.; KEPE, V.; LIU, J.; FLORES-TORRES, S.; SATYAMURTHY, N.; et al. Binding characteristics of radiofluorinated 6-dialkylamino-2-naphthylethylidene derivatives as positron emission tomography imaging probes for beta-amyloid plaques in Alzheimer's disease. **J Neurosci**, v. 21, p. RC189, 2001.

[143] KLUNK, W.; WANG, Y.; HUANG, G.; DEBNATH, M.; HOLT, D.; MATHIS, C. Uncharged thioflavin-T derivatives bind to amyloid-beta protein with high affinity and readily enter the brain. **Life Sci**, v. 69, n ° 13, 1471-84, 2001.

[144] BACSKAI, B.; HICKEY, G.; SKOCH, J.; KAJDASZ, S.; WANG, Y.; HUANG, G.; MATHIS, C.; et al. Four-dimensional multiphoton imaging of brain entry, amyloid binding, and clearance of an amyloid-beta ligand in transgenic mice. **Proc Natl Acad Sci**, v. 100, n ° 21, p. 12462-7, 2003.

[145] YEN, S. K., PADMANABHAN, P.; SELVAN, S. T. Multifunctional Iron Oxide Nanoparticles for Diagnostics, Therapy and Macromolecule Delivery. **Theranostics**, v. 3, n ° 12, p. 986-1003, 2013.

[146] CHA, E. J.; JANG, E. S.; SUN, I. C.; LEE, I. J.; KO, J. H.; KIM, Y. I.; KWON, I. C.; KIM, K.; AHN, C. H. Development of MRI/NIRF 'activatable' multimodal imaging probe based on iron oxide nanoparticles. **J Control Rel**, v. 155, p. 152-158, 2011.

[147] MCCARTHY, J.; WEISSLEDER, R. Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy. **Adv Drugs Del Rev**, v. 60, p. 1241-1251, 2008.

[148] SEDLMEIER, A.; GORRIS, H. H. Surface modification and characterization of photon-upconverting nanoparticles for bioanalytical applications. **Chem Soc Rev**, v. 44, p. 1526, 2015.

[149] DUSINSKA, M.; TULINSKA, J.; YAMANI, N. E.; KURICOVA, M.; LISKOVA, A.; ROLLEROVA, E.; et al. Immunotoxicity, genotoxicity and epigenetic toxicity of nanomaterials: New strategies for toxicity testing? **Food Chem Toxicol**, v. 109, p. 797-811, 2017.

[150] RADAIC, A.; PUGLIESE, G. O.; CAMPESE, G. C.; PESSINE, F. B.T.; JESUSA, M. B. Como estudar interações entre nanopartículas e sistemas biológicos. **Quim Nova**, v. 39, n. 10, p. 1236-1244, 2016.

[151] FENT, K.; WEISBROD, C. J.; HELLERC, A. W.; PIELES, U. Assessment of uptake and toxicity of fluorescent silica nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. **Aquat Toxicol**, v. 100, p. 218-228, 2010.

-
- [152] KONG, B.; SEOG, J. H.; GRAHAM, L. M.; LEE, S. B. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 6, n°5, p. 929–941, 2011.
- [153] SAKULKHU, U.; MAHMOUDI, M.; MAURIZI, L.; SALAKLANG, J.; HOFMANN, H. Protein corona composition of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with various physico-chemical properties and coatings. **Sci Rep**, v. 4, p. 5020, 2014.
- [154] ROJAS, J. M.; ORTEGA, L. S.; ARIAS, V. M.; GUTIÉRREZ, L.; YAGÜE, J. P.; BARBER, D. F. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle uptake alters M2 macrophage phenotype, iron metabolism, migration and invasion. **Nanomedicine**, v. 12, n. 4, p. 1127–1138, 2016.
- [155] STEVENSON, R.; HUEBER, A. J.; HUTTON, A.; MCINNES, I. B.; GRAHAM, D. Nanoparticles and Inflammation. **Sci World J**, v. 11, p. 1300–1312, 2011.
- [156] KHANNA, P.; ONG, C.; BAY, B. H.; BAEG, G. H. Nanotoxicity: an interplay of oxidative stress, inflammation and cell death. **Nanomaterials**, v. 5, p. 1163–1180, 2015.
- [157] MANICKAM, V.; PERIYASAMY, M.; DHAKSHINAMOORTHY, V.; PANNEERSELVAM, L.; PERUMAL, E. Neurobehavioural toxicity of iron oxide nanoparticles in mice. **Neurotox Res**, v. 1, n. 2, p. 1–30, 2017.
- [158] SHARIFI, S.; BEHZADI, S.; LAURENT, S.; FORREST, M. L.; STROEVEE, P.; MAHMOUDI, M. Toxicity of nanomaterials. **Chem Soc Rev**, v. 41, p. 2323–2343, 2012.
- [159] WEISSLEDER, R.; CHENG, H. C.; BOGDANOVA, A.; BOGDANOV, A. Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging. **J Magn Reson Imaging**, v. 7, p. 258–263, 1997.
- [160] MULLER, K.; SKEPPER, J. N.; TANG, T. Y.; GRAVES, M. J.; PATTERSON, A. J.; COROT, C.; et al. Atorvastatin and uptake of ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Ferumoxtran-10) in human monocyte-macrophages: implications for magnetic resonance imaging. **Biomaterials**, v. 29, p. 2656–2662, 2008.
- [161] BERRY, C. C.; WELLS, S.; CHARLES, S.; AITCHISON, G.; CURTIS, A. S. G. Cell response to dextran-derivatised iron oxide nanoparticles post internalization. **Biomaterials**, v. 25, n. 23, p. 5405–5413, 2004.
- [162] BERRY, C. C.; WELLS, S.; CHARLES, S.; CURTIS, A. S. G. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. **Biomaterials**, v. 24, p. 4551–4557, 2003.
- [163] SOENEN, J.H.; HIMMELREICH, U.; NUYTEN, N.; CUY, M. Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labelling. **Biomaterials**, v. 32, p. 195–205, 2011.
- [164] SUKLA, S.; JADAUN, A.; ARORA, V.; KUMAR, J.; SINHA, R. K.; BIYANI, N.; JAIN, V. K. In vitro toxicity assessment of chitosan oligosaccharide coated iron oxide nanoparticles. **Toxicol Res-Uk**, v. 2, p. 27–39, 2015.
- [165] GUPTA, A. K.; BERRY, C.; GUPTA, M.; CURTIS, A. Receptor-mediated targeting of magnetic nanoparticles using insulin as a surface ligand to prevent endocytosis. **Nanobiosci**, v. 2, n. 4, p. 255–261, 2003.
- [166] GUPTA, A. K.; CURTIS, A. S. G. Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. **Biomaterials**, v. 25, n. 15, p. 3029–3040, 2004.
- [167] GUPTA, A. K.; NAREGALKAR, R. R.; VAIDYA, V. D.; GUPTA, M. Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. **Nanomedicine**, v. 2, n. 1, p. 23–39, 2007.
- [168] GUPTA, A. K.; WELLS, S. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies. **Nanobiosci**, v. 3, n. 1, p. 66–73, 2004.
- [169] LEE, K. J.; AN, J. H.; SHIN, J. S.; KIM, D. H.; KIM, C.; OZAKI, H.; KOH, Protective effect of

maghemite nanoparticles on ultraviolet-induced photo-damage in human skin fibroblasts. **J G Nanotechnology**, v. 18, 465201, 2007.

[170] KIM, J. S.; YOON, T. J.; YU, K. N.; MI, S. N.; WOO, M.; KIM, B. G.; LEE, K. H.; et. al. Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells. **J Vet Sci**, v. 7, n. 4, p. 321-326, 2006.

[171] CHENG, F. Y.; SU, C. H.; YANG, Y. S.; YEH, C. S.; TSAI, C. Y.; WU, C. L.; WU, M. T.; SHIEH, D. B. Characterization of aqueous dispersions of Fe₃O₄ nanoparticles and their biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, p. 729,738, 2005.

[172] SHI, X.; THOMAS, T. P.; MYC, L. A.; KOTLYAR, A.; BAKER, J. R. Synthesis, characterization, and intracellular uptake of carboxyl-terminated poly(amidoamine) dendrimer- stabilized iron oxide nanoparticles, **Phys. Chem. Chem. Phys**, v. 9, p. 5712, 2007.

[173] HUSSAIN, S. M.; HESS, K. L.; GEARHART, J. M.; GEISS, K. T.; SCHLAGER, J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. **J Toxicol in Vitro**, v. 19, p. 975-983, 2005.

[174] KARI, G.; RODECK, U.; DICKER, A. P. Zebrafish: An Emerging Model System for Human Disease and Drug Discovery. **Nature**, v. 82, n ° 1, p. 70-80, 2007.

[175] SPENCE, R., GERLACH, G., LAWRENCE, C., SMITH, C. The behavior and ecology of the zebrafish. **Danio rerio**, v. 83, p. 13-34, 2008.

[176] HILL, A. J.; TERAOKA, H., HEIDEMAN, W.; PETERSON, R. E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicol Sci**, v. 86, p. 6-19, 2005.

[177] PARNG, C.; SENG W. L.; SEMINO. C.; McGRATH, P. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. **Assay Drug Dev Technol**, v. 1, p. 41-48, 2002.

[178] LELE, Z. e KRONE, P. H. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. **Biotechnology Advances**, v. 14, n. 1, p. 57-72, 1996.

[179] PATIL, U. S.; ADIREDDY, S.; JAISWAL, A.; MANDAVA, S.; LEE, B. R.; CHRISEY, D. B. In vitro/in vivo toxicity evaluation and quantification of iron oxide nanoparticles. **Int J Mol Sci**, v. 16, p. 24417-24450, 2015.

[180] GANESHKUMAR, M.; SASTRY, T. P.; KUMAR, M. S.; DINESH, M. G.; KANNAPPAN, S.; SUGUNA, L. Sun light mediated synthesis of gold nanoparticles as carrier for 6-mercaptopurine: Preparation, characterization and toxicity studies in zebrafish embryo model. **Mater Res Bull**, v. 47, p. 2113-2119, 2012.

[181] CAMBIER, S.; ROGEBERG, M.; GEORGANTZOPOULOU, A.; SERCHI, A.; KARLSSON, C.; VERHAEGEN, S.; et al. Fate and effects of silver nanoparticles on early life-stage development of zebrafish (*Danio rerio*) in comparison to silver nitrate. **Sci Total Environ**, v. 610, p. 972–982, 2018.

[182] YOO, M. H.; RAH, Y. C.; CHOI, J.; PARK, S.; PARK, H. C.; OHA, K. H.; LEE, S. H.; KWON, S. Y. Embryotoxicity and hair cell toxicity of silver nanoparticles in zebrafish embryos. **Int J Pediatr Otorhi**, v. 83, p. 168–174, 2016.

[183] POWERS, C. M.; SLOTKIN, T. A.; SEIDLER, F. J.; BADIREDDY, A. R.; PADILLA, S. Silver nanoparticles alter zebrafish development and larval behavior: Distinct roles for particle size, coating and composition. **Neurotoxicol Teratol**, v. 33, p. 708–714, 2011.

[184] POWERS, C. M.; YEN, J.; LINNEY, E. A.; SEIDLER, F. J.; SLOTKIN, T. A. Silver exposure in developing zebrafish (*Danio rerio*): Persistent effects on larval behavior and survival. **Neurotoxicol Teratol**, v. 32, p. 391–397, 2010.

[185] ASHARANI, P. V.; LIANWU, Y.; GONG, X.; VALIYAVEETTIL, S. Comparison of the toxicity of silver, gold and platinum nanoparticles in developing zebrafish embryos. **Nanotoxicology**, v. 1, p. 1–12, 2010.

- [186] RAMACHANDRAN, R.; KRISHNARAJ, C.; SIVAKUMAR, A. S.; PRASANNAKUMAR, P.; KUMAR, V. K. A.; SHIMC, K. S.; SONG, C.; YUN, S. Anticancer activity of biologically synthesized silver and gold nanoparticles on mouse myoblast cancer cells and their toxicity against embryonic zebrafish. **Mat Sci Eng C**, v. 73, p. 674–683, 2017.
- [187] AHMADA, F.; LIUA, X.; ZHOU, Y.; YAOA, H. An in vivo evaluation of acute toxicity of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles in larval-embryo Zebrafish (Danio rerio). **Aquatic Toxicology**, v. 166, p. 21–28, 2015.
- [188] HU, Q.; GUO, F.; ZHAO, F.; FU, Z. Effects of titanium dioxide nanoparticles exposure on Parkinsonism in zebrafish larvae and PC12. **Chemosphere**, v. 173, p. 373-379, 2017.
- [189] SAMAE, S.; RABBANI, S.; JOVANOVIĆ, B.; TEHRANI, M. R. M.; HAGHPANAH, V. Efficacy of the hatching event in assessing the embryotoxicity of the nano-sized TiO₂ particles in zebrafish: A comparison between two different classes of hatching-derived variables. **Ecotox Environ Safe**, v. 116, p. 121–128, 2015.
- [190] DUMITRESCU, E.; KARUNARATNE, D. P.; PROCHASKA, M. K.; LIU, X.; WALLACE, K. N.; ANDRESCU, S. Developmental toxicity of glycine-coated silica nanoparticles in embryonic zebrafish. **Environ Pollut**, v. 229, p. 439-447, 2017.
- [191] CHEN, T. H.; LIN, C. C.; MENG, P. J. Zinc oxide nanoparticles alter hatching and larval locomotor activity in zebrafish (Danio rerio). **J Hazard Mater**, v. 277, p. 134–140, 2014.
- [192] KOVRIŽNYCH, J. A.; SOTNÍKOVÁ, R.; ZELJENKOVÁ, D.; ROLLEROVÁ, E.; SZABOVÁ, E.; WIMMEROVÁ, S. Acute toxicity of 31 different nanoparticles to zebrafish (Danio rerio) tested in adulthood and in early life stages – comparative study. **Interdiscip Toxicol**, v. 6, n ° 2, p. 67–73, 2013.
- [193] ZHU, X.; TIAN, S.; CAI, X. Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in zebrafish (danio rerio) early life stages. **PLOS**, v. 7, n. 9, p. e46286, 2012.
- [194] CARVALHO, A.; DOMINGUES, I.; GONÇALVES, M. C. Core-shell superparamagnetic nanoparticles with interesting properties as contrast agents for MRI. **Mater Chem Phys**, v. 168, p. 42-49, 2015.
- [195] TSENG, T. C.; HSIEHA, F. Y.; HSU, S. Increased cell survival of cells exposed to superparamagnetic iron oxide nanoparticles through biomaterial substrate-induced autophagy. **Biomater Sci**, v. 4, p. 670–677, 2016.
- [196] CHEMELLO, G.; PICCINETTI, C.; RANDAZZO, B.; CARNEVALI, O.; MARADONNA, F.; MAGRO, M.; BONAIUTO, M.; et. al. Oxytetracycline Delivery in Adult Female Zebrafish by Iron Oxide Nanoparticles. **Zebrafish**, v. 13, n° 6, p. 495-503, 2016.
- [197] OLIVEIRA, G. M. T.; KIST, L. W.; PEREIRA, T. C. B.; BORTOLOTTI, J. W.; PAQUETE, F. L.; OLIVEIRA, E. M. N.; LEITE, C. E.; BONAN, C. D.; BASSO, SOUZA, N. R. S.; PAPALÉO, R. M.; BOGO, M. R. Transient modulation of acetylcholinesterase activity caused by exposure to dextran-coated iron oxide nanoparticles in brain of adult zebrafish. **Comp Biochem Physiol Part C**, v. 162, p. 77–84, 2014.
- [198] OLIVEIRA, G. M. T.; OLIVEIRA, E. M. N.; PEREIRA, T. C. B.; PAPALÉO, R. M.; BOGO, M. R. Implications of exposure to dextran-coated and uncoated iron oxide nanoparticles to developmental toxicity in zebrafish. **J Nanopart Res**, v. 19, p. 389, 2017.
- [199] FORGE, D.; ROCH, A.; LAURENT, S.; TELLEZ, H.; GOSSUIN, Y.; RENAUX, R.; VANDER ELST, L.; MULLER, R. N. Optimization of the Synthesis of Superparamagnetic Contrast Agents by the Design of Experiments Method. **J. Phys. Chem**, v. 112, p. 112, 19178–19185, 2008.
- [200] CARUNTU, D.; REMOND, T.; CHOU, N. H.; JUN, M. J.; CARUNTU, G.; HE, J.; GOLOVERDA, G.; O'CONNOR, C.; KOLESNICHENKO, V. Reactivity of 3d Transition Metal Cations in Diethylene Glycol Solutions. Synthesis of Transition Metal Ferrites with the Structure of Discrete Nanoparticles Complexed with Long-Chain Carboxylate Anions. **Inorg Chem**, v. 41, p. 6137-6146, 2002.
- [201] WUNDERBALDINGER, P.; JOSEPHSON, L.; WEISSLEDER, R. Crosslinked iron oxides (CLIO):

a new platform for the development of target MR contrast agents. **Acad Radiol**, v. 9, p. S304-S306, 2002.

[202] PALMACCI, S.; JOSEPHSON, L. ARLINGTON. **Advanced Magnetics, Cambridge. Synthesis of polysaccharide covered superparamagnetic oxide colloids**. Int.Cl.5 G01N24/08; B01J 13/02; A61M 37/00; A61K 33/26. EUA 5,262,176. May 2nd, 1991. Nov 16th, 1993. United States Patent, Massachusetts, p. 1-16.

[203] MOHAMMADI-SAMANI, MIRI, R.; SALMANPOUR M.; KHALIGHIAN, N.; SOTOUDEH, S.; ERFANI, N. Preparation and assessment of chitosan-coated superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for controlled delivery of methotrexate. **Res Pharm**, v. 8, n ° 1, p. 25–33, 2013.

[204] PINHO, S. L. C.; PEREIRA, A. G.; VOISIN, P.; KASSEM, J.; BOUCHAUD, V.; ETIENNE, L.; PETERS, J. A.; et al. Fine Tuning of the Relaxometry of γ -Fe₂O₃@SiO₂ Nanoparticles by Tweaking the Silica Coating Thickness. **ACS Nano**, v. 4, n ° 9, p. 5339–5349, 2010.

[205] WESTERFIELD, Monte. **The zebrafish book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)**. Eugene: University of Oregon Press, 2000. Disponível em: zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html. Acessado em: janeiro de 2017.

[206] PELKOWSKI, S.D., KAPOOR, M., RICHENDRER, H.A., WANG, X., COLWILL, R.M., CRETON, R. A novel high-throughput imaging system for automated analyses of avoidance behavior in Zebrafish larvae. **Behav Brain Res**, v.223, p. 135-144, 2011.

[207] NERY, L.R., ELTZ, N.S., HACKMAN, C., FONSECA, R., ALTENHOFEN, S., GUERRA, H.N., FREITAS, V.M., BONAN, C.D., VIANNA, M.R. Brain intraventricular injection of amyloid- β in zebrafish embryo impairs cognition and increases tau phosphorylation, effects reversed by lithium. **PLoS One**, v. 9, p. e105862, 2014.

[208] CAMERON, D.J.; GALVIN C.; ALKAM, T.; SIDHU, H.; ELLISON, J.; LUNA, S.; ETHELL, D.W. Alzheimer's-related peptide Amyloid- β plays a conserved role in angiogenesis. **PLoS ONE**, v.7, e39598, 2012.

[209] PONTRELLO, C. G.; SUN, M-Y.; LIN, A.; FIACCO, T. A.; DEFEA, K. A.; ETHELL, I. M. Cofilin under control of β -arrestin-2 in NMDA-dependent dendritic spine plasticity, long-term depression (LTD), and learning. **Proc Nat. Acad Sci, USA**, v. 109, n ° 7, E442-E451, 2012.

[210] O'HARE, E.; WELDON, D.T.; MANTYH. P. W.; GHILARDI, JR.; FINKE, M. P.; KUSKOWSKI, M. A.; MAGGIOF, J. E.; SHEPHARDG, R. A.; CLEARY, J. Delayed behavioral effects following intrahippocampal injection of aggregated A beta (1–42). **Brain Res**, V. 815, p. 1-10, 1999.

[211] HENOUMONT, C.; LAURENT, S.; VANDER ELST, L. How to perform accurate and reliable measurements of longitudinal and transverse relaxation times of MRI contrast media in aqueous solutions. **Cont Med Mol Imaging**, v. 4, p. 312–321, 2009.

[212] BOUTRY, S.; FORGE, D. BURTEA, C.; MAHIEUA, I.; MURARIUA, O.; LAURENT, S.; VANDER ELST, L.; MULLER, R. N. How to quantify iron in an aqueous or biological matrix: a technical note. **Cont Med Mol Imaging**, v. 4, p. 299–304, 2009.

[213] OZKAYA, T.; TOPRAK, M. S.; BAYKAL, A.; KAVAS, K.; KOSEOGLUC, Y.; AKTAS, B. Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles at 100 °C and its magnetic characterization. **J Al Comp**, v. 472, p. 18–23, 2009.

[214] ANDREAS K.; GEORGIEVA, R.; LADWIG, M.; MUELLER, S.; NOTTER, M.; SITTINGER, M.; RINGE, J. Highly efficient magnetic stem cell labeling with citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking. **Biomaterials**, v. 33, p. 4515-4525, 2012.

[215] MOJIĆ, B.; GIANNAKOPOULOS, K. P.; CVEJIĆ, Ž.; SRDIĆ, V. V. Silica coated ferrite nanoparticles: influence of citrate functionalization procedure on final particle morphology. **Ceramics International**. v. 38, p. 6635-6641, 2012

[216] HAJDÚ, A.; ILLÉS, E.;TOMBÁ CZ, E.; BORBÁTH, I. Surface charging, polyanionic coating and

- colloid stability of magnetite nanoparticles. **Colloid Surface A**, v. 347, p. 104-108, 2007.
- [217] FAUCONNIER, N. BÉE, A.; ROGER, J.; PONS, J. N. Synthesis of aqueous magnetic liquids complexation of maghemite nanoparticles. **J Mol Liq**, v. 83, p. 233-242, 1999.
- [218] Malvern Instruments Zetasizer Nano Series User Manual. Malvern Instrumentns Ltd. Worcester-shire, 2004.
- [219] HUNTER, R.J. **Zeta Potential in Colloid Science**, Academic Press, New York, 1981.
- [220] RAVINDRA, R.; KROVVIDI, K. R.; KHAN, A. Solubility parameter of chitin and chitosan. **Carbohydr Polym**, v. 36, p. 121-127, 1998.
- [221] VUONG, Q. L.; GILLIS, P.; ROCH, A.; GOSSUIN, Y. Magnetic resonance relaxation induced by superparamagnetic particles used as contrast agents in magnetic resonance imaging: a theoretical review. **Wires Nanomed Nanobi**, v. 9, p. 1–22, 2017.
- [222] JOSHI, H. M. et. al. Effect of silica shell thickness of Fe₃O₄-SiO_x core-shell nanostructures on MRI contrast. **Contr Med Mol Imag**, v. 7, p. 460-468, 2012.
- [223] ROHRER, M.; BAUER, H.; MINTOROVITCH, J.; REQUARDT, M.; WEINMANN, M. J. Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. **Invest Radiol**, v. 40, n° 11, 2005.
- [224] MUNISHKINA, L. A.; FINK, A. L. Fluorescence as a method to reveal structures and membrane-interactions of amyloidogenic proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1768, n° 8, p. 1862-1885, 2007.
- [225] DOGRA, S. K. Spectral characteristics of 2-(3',5'-diaminophenyl)benzothiazole: effects of solvents and acid–base concentrations **J Photoch Photobio A**, v. 172, p. 185-195, 2005.
- [226] DEY, J. K.; DOGRA, S. K. Solvatochromism and prototropims in 2-(aminophenyl)benzothiazoles. **Bull Chem Soc**, v. 64, p. 3142-3152, 1991.
- [227] DEY, J. K.; DOGRA, S. K. Spectral Chabacterbistics Of Three Diffebent Isomebic 2-(Aminophe-nyl)Benzoxazoles Effect Of Solvents And Acid Concentbations. **Chem Phys**, v. 143, p. 97-107, 1990.
- [228] A. LOCKHART, L.; YE, D. B.; JUDD, A. T.; MERRITT, P. N.; LOWE, J. L.; MORGENSTERN, G.; HONG, A. D.; GEE, J. BROWN. Evidence for the presence of three distinct binding sites for the thioflavin T class of Alzheimer's disease PET imaging agents on β -amyloid peptide fibrils. **J Biol Chem**, v. 280, p. 7677-7684, 2005.
- [229] HAWE, A.; SUTTER, M.; JISKOOT, W. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characteri-zation. **Pharm Res**, v. 25, n° 7, p. 1487-1499, 2008.
- [230] REINKE. A. A., GESTWICKI, J. E. Insight into amyloid structure using chemical probes. **Chem Biol Drug Des**, v. 77, n° 6, p. 399-411, 2011.
- [231] BIANCALANA, M.; KOIDE, S. Molecular Mechanism of Thioflavin-T Binding to Amyloid Fibrils. **Biochim Biophys Acta**, v. 1804, p. 1405-1412, 2010.
- [232] P. THORDARSON. Determining association constants from titration experiments in supramolec-ular. **Chem Chem Soc Rev**, v. 40, p. 1305- 323, 2011.
- [233] LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3 ed, Springer, 2016, 954p.
- [234] PADAYACHEE, E. D.; WHITELEY, C. D. Spectrofluorimetric analysis of the interaction of amyloid peptides with neuronal nitric oxide synthase: Implications in Alzheimer's disease. **Bioch Biophys Acta**, v. 1810, p. 1136–1140, 2011.
- [235] DWIVEDIA, S.; SIDDIQUIA, M. A.; FARSHORIC, N. N.; AHAMEDD, M.; MUSARRATA, J.; AL-KHEDHAIRYA, A. A. Synthesis, characterization and toxicological evaluation of iron oxidenanoparticles in human lung alveolar epithelial cells. **Col Surf Biointerf**, v. 122, p. 209–215, 2014.
- [236] PARK, E. J.; UMH, H. N.; KIM, S. W.; CHO, M. H.; KIM, J. H.; KIM, Y. ERK pathway is activated

in bare-FeNPs-induced autophagy. **Arch Toxicol**, v. 88, p. 323-336, 2014.

[237] NAQVI, S.; SAMIM, M.; ABDIN, M. Z.; AHMED, F. J.; MAITRA, A.; PRASHANT, C. K.; DINDA, A. K. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. **J Nanomed**, v. 5, p. 983-989, 2010.

[238] SILVA, A. H.; LIMA, E.; MANSILLA, M. V.; ZYSLER, R. D.; TROIANI, H.; PISCIOTTI, M. L. M.; et al. Superparamagnetic iron-oxide nanoparticles mPEG350- and mPEG2000-coated: cell uptake and biocompatibility evaluation. **Nanomed Nanotech Bio Med**, v. 12, p. 909-919, 2016.

[239] MAHMOUDI, M.; SIMCHI, A.; MILANI, A. S.; STROEVE, P. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **J Colloid Interf Sci**, v. 336, p. 510-518, 2009.

[240] MAHMOUDI, M.; SIMCHI, A.; IMAN, M. Cytotoxicity of uncoated and polyvinyl alcohol coated superparamagnetic iron oxide nanoparticle. **J Phys Chem C**, v. 113, p. 9573-9580, 2009.

[241] SCHNÖRR, D. J.; STEENBERGENA, P. J.; RICHARDSON, M. K.; CHAMPAGNE, D. L. Measuring thigmotaxis in larval zebrafish. **Behav Brain Res**, v. 228, p. 367-374, 2012.

[242] COLWILL, R. M.; CRETON, R. Imaging escape and avoidance behavior in zebrafish larvae. **Rev Neurosci**, v. 22, n° 1, p. 63-73, 2011.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br