

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

GISELE INÊS SELLI

**NANOPARTÍCULAS MAGNETOFLUORESCENTES DE SPION@SiO₂ FUNCIONALIZADAS
COM SONDAS ES IPT**

Porto Alegre
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

ESCOLA POLITÉCNICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

NANOPARTÍCULAS MAGNETOFLUORESCENTES DE SPION@SiO₂ FUNCIONALIZADAS COM SONDAS ESIPT

GISELE INÊS SELLI

BACHAREL EM QUÍMICA INDUSTRIAL

ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO MEURER PAPALÉO

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. LEANDRA FRANCISCATO CAMPO

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

Porto Alegre

Fevereiro, 2019

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro”. (Albert Einstein).



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
 ESCOLA POLITÉCNICA
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

NANOPARTÍCULAS MAGNETOFLUORESCENTES de Fe₃O₄@SiO₂ FUNCIONALIZADAS COM SONDAS ESIPT

CANDIDATA: GISELE INÊS SELLI

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE 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

DRA. LEANDRA FRANCISCATO CAMPO - CO-ORIENTADORA

BANCA EXAMINADORA

DR. RICARDO REGO BORDALO CORREIA - INSTITUTO DE FÍSICA - UFRGS

DRA. NARA REGINA DE SOUZA BASSO - DO PGETEMA - 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

DEDICATÓRIA

À minha família, por acreditar e investir em mim. Mãe, seu cuidado e dedicação foram imprescindíveis em diversos momentos, me dando esperança para seguir em frente. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada. À minha irmã e meu irmão por estarem sempre presentes me mostrando o lado bom da vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida!

Aos meus pais pelo apoio nas minhas escolhas e a todo o suporte que me deram durante esses dois anos.

Aos meus irmãos, Gabriele e Grégori!

Ao Prof. Dr. Ricardo M. Papaléo pela oportunidade de participar desse grupo de pesquisa tão incrível, pela orientação e ensinamentos durante esses dois anos. Agradeço também a paciência e compreensão no desenvolvimento desse trabalho.

A Dra. Elisa M. N. de Oliveira que foi muito mais que uma amiga e colega de trabalho, foi quem me deu as coordenadas para seguir na pesquisa e por muitas vezes fez papel de mãe me motivando a nunca desistir. Me ensinou a realidade da pesquisa e me fez aprender em dois anos de mestrado coisas que não se aprende em nenhuma faculdade.

A Prof.^a Dra. Leandra F. Campo pela coorientação e ensinamentos durante o desenvolvimento do trabalho. E pela amizade e compreensão comigo.

A equipe do LABCEMM, especialmente à Moema, pelas análises com TEM, e instruções para análise das imagens.

As meninas do LNMO da UFRGS e a Prof.^a Dra. Sabrina Nicolodi, do Laboratório de Magnetismo da UFRGS, pelas medidas magnéticas.

As amigas do LOR e colegas da PUC, Cristhiane A. Valente, Milena Silveira, Raiane Gonçalves e Thuany Maraschin, pelo apoio, amizade sem igual e parceria nos mais diversos momentos envolvendo ou não a pós-graduação.

Aos colegas de projeto, Elisa e Maximiliano, aos ICs Emanuelle Ferreira, Gregory Castilhos, Mateus Ramos e Monique que tiveram um papel especial no desenvolvimento deste projeto.

A todos os colegas do grupo NANOPUC, por serem tão especiais, compreensivos, prestativos e companheiros, tanto em momentos estritamente profissionais quanto em momentos de distração. Obrigado pelo café, chimarrão, risadas e conselhos. Com toda certeza é um grupo de pesquisa incrível e arrisco dizer que o melhor da PUC. Ao Chris por ser um colega peculiar, a Dani pela parceria e conselhos de inglês, a Raquel e Leandro por serem excelentes colegas de sala. Ao Dario, Adriano e Leandro Luza pelas risadas e ensinamentos que vou levar durante a vida inteira.

As minhas amigas externas à PUC Adriane, Aline e Carolina, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e ouvindo minhas angústias.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao PGETEMA pela oportunidade de bolsa de mestrado.

Enfim um agradecimento a todos que de uma forma ou outra contribuíram para o desenvolvimento deste mestrado.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	6
SUMÁRIO	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivos Específicos	19
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1. Nanopartículas magnetofluorescentes	20
3.1.1. Nanopartículas de óxido de ferro revestidas com sílica	22
3.2. Fluorescência	26
3.2.1. Supressão de fluorescência.....	27
3.2.2. Transferência protônica intramolecular no estado eletrônico excitado.....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. Procedimentos experimentais	32
4.1.1. Descrição de equipamentos e reagentes utilizados	32
4.2. Síntese das nanopartículas núcleo-casca de óxido de ferro e sílica	33
4.2.1. Síntese das nanopartículas de óxido de ferro por poliol - SPION	33
4.2.2. Síntese da casca do sistema núcleo-casca	34
4.2.3. Ancoragem dos fluoróforos nas SPION@SiO ₂	35
4.3. Procedimentos de caracterização	35
4.3.1. Espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta	35
4.3.2. Difração de raio-X	36
4.3.3. Microscopia de transmissão eletrônica	36
4.3.4. Magnetômetro de amostra vibrante	36
4.3.5. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	36

4.3.6. Espectroscopia de absorção e fluorescência.....	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	38
5.1. Estrutura e morfologia das SPION.....	38
5.2. Avaliação do controle da espessura da casca de sílica via rota sol-gel.....	40
5.3. Caracterização morfológica e estrutural das SPION@SiO ₂	42
5.4. Propriedades magnéticas.....	45
5.5. Acoplamento dos fluoróforos	46
5.6. Propriedades fotofísicas das NPs magnetofluorescentes	49
5.6.1. Fluorescência no estado sólido.....	49
5.6.2. Fluorescência em solventes orgânicos	52
6. CONCLUSÕES	59
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	61
8. REFERÊNCIAS.....	62
9. ANEXOS	73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1 A) Formação esquemática de nanopartículas opto-magnéticas *core-shell*.
B) Imagens demonstrando a atração magnética das nanopartículas na presença de um ímã sob luz ambiente e ultravioleta (adaptado de [16]).
*QDs *Quantum Dots*, MNPs *magnetic nanoparticles*, Ligands ligantes, DTAB *Dodecyltrimethylammonium bromide*, PVP polivinilpirrolidona.21
- Figura 3.2 Sonda multimodal com várias aplicações (adaptado de [34])22
- Figura 3.3 Exemplo de reação de hidrólise do precursor TEOS (adaptado de [36]). 23
- Figura 3.4. Exemplo da reação de condensação de espécies hidrolisadas de TEOS (adaptado [36]).24
- Figura 3.5 Adsorção de sílica em SPION hidratadas (adaptado de [39]). **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3.6 Processo de síntese das SPION@SiO₂-HBT estabilizada com ânions citrato seguidos de etapas de silanização pelo método de Stöber e acoplamento do HBT através dos grupos silanóis (adaptado de [13])....26
- Figura 3.7. Diagrama simplificado de Jablonski (adaptado de [17]).27
- Figura 3.8. Ilustração representativa dos fenômenos de supressão de fluorescência estático e dinâmico (adaptado de [53]). * $f(t)$ função da constante de excitação, $\gamma = \tau_0^{-1}$ tempo inverso de decaimento na ausência do supressor, Q o supressor, [Q] concentração do supressor, F fluoróforo no estado fundamental, F* fluoróforo no estado excitado, k_q [Q] taxa de decaimento adicional.....28
- Figura 3.9. Mecanismo de ESIPT para 2'-hidroxifenilbenzazóis (X = O, S, NH) (adaptado de [57]).29
- Figura 3.10. Diferentes estruturas de heterocíclicos 2- (2' -hidroxifenil) benzazóis (adaptado de [19]).30
- Figura 3.11. Geometrias das formas enol e ceto para os confôrmeros dos 2- (2'-hidroxifenil) benzazóis (adaptado de [9]).31
- Figura 5.1 Características físicas das NPs de óxido de ferro como sintetizadas (a, b) Imagens de TEM, (c) distribuição de tamanho obtida das imagens de TEM,(d) Difrátograma obtido através da análise das SPION (e) distribuição de tamanho em escala logarítmica, obtida por DLS das SPION em solução aquosa.40

- Figura 5.2. (a, b) Imagens de TEM das NPs SPION@SiO₂-30, (d, e) SPION@SiO₂-60, (c, f) histograma das NPs e (g) distribuição de tamanho obtida por DLS SPION@SiO₂-30 e SPION@SiO₂-60.....43
- Figura 5.3. (a) Espectros de infravermelho de amostras de SPION e SPION@SiO₂-60, (b) ampliação do espectro de infravermelho na região de 1800-400 cm⁻¹44
- Figura 5.4 Potencial zeta em função do pH para as SPION e SPION@SiO₂ em dispersão aquosa.45
- Figura 5.5. Curvas de magnetização em função do campo magnético das SPION, SPION@SiO₂-30 e SPION@SiO₂-60.....46
- Figura 5.6 Esquema da reação de acoplamento das SPION@SiO₂ e fluoróforos benzazólicos.....47
- Figura 5.7. (a) Espectros de infravermelho das amostras SPION@SiO₂-30-HBT, SPION@SiO₂-60-HBT e espectro do fluoróforo HBT puro, (b) espectros de infravermelho das amostras SPION@SiO₂-30- HBO, SPION@SiO₂-60-HBO com acoplamento do HBO e do fluoróforo HBO puro.....48
- Figura 5.8. Potencial zeta em função do pH das SPION@SiO₂-30 e SPION@SiO₂-60 puras e com os fluoróforos HBT e HBO.49
- Figura 5.9. Curvas de magnetização em função do campo magnético a) SPION@SiO₂-30 com HBT e HBO e b) SPION@SiO₂-60 com HBO e HBT.....49
- Figura 5.10. Espectros de emissão de fluorescência no estado sólido do HBO e das SPION@SiO₂ de 30 e 60 nm com o HBO acoplado. (λ excitação = 350 nm).....50
- Figura 5.11. Espectros de emissão de fluorescência no estado sólido do HBT e das SPION@SiO₂ de 30 e 60 nm com o HBT acoplado. (λ excitação = 370 nm).....51
- Figura 5.12. Imagem de amostras dos corantes livres e acoplados às NPs iluminadas com luz UV de 365 nm e na presença de um ímã de neodímio (a) HBT e SPION@SiO₂-60-HBT (b). HBT, SPION@SiO₂-60-HBT e SPION@SiO₂-30-HBT (c) HBO puro no *ependorf* e SPION@SiO₂-60- HBO e SPION@SiO₂-30- HBO.....52
- Figura 5.13. Espectros de emissão de fluorescência do a) HBO e b) HBT em etanol na presença das SPION sem a casca de sílica. A seta indica a variação da emissão com o aumento da concentração de SPION.....54

- Figura 5.14. Espectros de emissão de fluorescência do (a- b) HBO e (c - d) HBT em etanol na presença das SPION revestidas com sílica nos tamanhos de 30 e 60 nm.55
- Figura 5.15. Espectros de emissão de fluorescência do a) HBO e b) HBT em diclorometano na presença das SPION sem a casca de sílica.56
- Figura 5.16. Espectros de emissão de fluorescência do (a-b) HBO e (c-d) HBT em diclorometano na presença das SPION sem a casca de sílica.58
- Figura 9.14. Espectros de absorção de fluorescência do HBO e HBT em etanol na presença das SPION sem a casca de sílica. A seta indica a variação da emissão com o aumento da concentração de SPION, números em cima dos picos indicam o λ máx. de absorção.....73
- Figura 9.15. Espectros de absorção de fluorescência do HBO e HBT em etanol na presença das SPION@SiO₂-30 e SPION@SiO₂-60 sem a casca de sílica. A seta indica a variação da emissão com o aumento da concentração de SPION, números em cima dos picos indicam o λ máx. de absorção.....74
- Figura 9.15. Espectros de absorção de fluorescência do HBO e HBT em diclorometano na presença das SPION@SiO₂-30 e SPION@SiO₂-60 sem a casca de sílica. A seta indica a variação da emissão com o aumento da concentração de SPION, números em cima dos picos indicam o λ máx. de absorção.....75

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Reagentes utilizados nos procedimentos de síntese e caracterização. .	32
Tabela 4.2. Equipamentos utilizados para a síntese e caracterização do material. ..	33
Tabela 4.3. Precursores utilizados para síntese das SPION@SiO ₂	34
Tabela 5.1. Tamanho médio das SPION obtidos por TEM, DLS, XRD e potencial zeta.	39
Tabela 5.2. Tamanho médio por TEM e DLS das SPION@SiO ₂ e variação do tempo de reação.	41
Tabela 5.3. Tamanho médio por TEM, DLS e potencial zeta das SPION@SiO ₂ -30 e SPION@SiO ₂ -60.	43

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A	Área	m^2
C_a	Número de átomos na superfície do substrato	m^{-3}
D_L	Coeficiente de difusão do líquido	m^2/s
T_f	Temperatura de fusão	$^{\circ}C$
λ	Comprimento de onda	nm
d_c	Diâmetro crítico	nm
DLS	Dispersão dinâmica de luz	
E_{DW}	Energia de domínio de parede	
ESIPT	Excited State Intramolecular Proton Transfer	
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy	
g	Gramas	g
h	Horas	h
H	Campo magnético	Oe
d_c	Diâmetro crítico	nm
D_H	Diâmetro hidrodinâmico	nm
IRM	Imagens por ressonância magnética	
MET	Microscopia eletrônica de transmissão	
M	Magnetização	Oe
MRI	Magnetic Resonance imaging	
MNPs	Nanopartículas magnéticas	
NPs	Nanopartículas	
S_0	Estado fundamental	
S_n	Estado de multiplicidade	
SPION	Superparamagnetic iron oxide nanoparticles	
TEOS	Tetraetilortossilicato	
T	Temperatura	$^{\circ}C$
V	Volume	L
IPD	Índice de polidispersividade	
APTS	3-aminopropiltoxissilano	
FTIC	fluoresceína	

RESUMO

SELLI, I. GISELE. Nanopartículas magnetofluorescentes de SPION@SiO₂ funcionalizadas com sondas ESIPT. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2018. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

No presente trabalho, investigou-se a síntese e caracterização de nanopartículas magnetofluorescentes compostas de um núcleo de óxido de ferro e casca de sílica, funcionalizadas com fluoróforos que emitem pelo mecanismo de ESIPT. A síntese das nanopartículas de óxido de ferro foi realizada através do método poliol e a casca de óxido de silício, utilizando a rota sintética sol-gel Stober. Os fluoróforos 2- [5'-N- (3 - triethoxisilil) propilureia - 2' - hidroxifenil] benzotiazol (HBT) e 2- [5'-N- (3 - triethoxisilil) propilureia - 2' - hidroxifenil] benzoxazol (HBO) foram acoplados as nanopartículas revestidas com sílica utilizando um sistema de refluxo com solvente acetato de etila. Foram obtidas nanopartículas com núcleo de óxido de ferro com tamanho médio de ≈ 10 nm, revestidas com uma casca de óxido de silício de duas espessuras ≈ 10 e 16 nm. A estrutura cristalina do núcleo obtida por XRD foi de espinélio inverso coerente com a magnetita. As nanopartículas não apresentam magnetização residual e histerese, indicando comportamento superparamagnético, independentemente do tamanho da casca. Os espectros de emissão fluorescente no estado sólido confirmam o acoplamento entre os fluoróforos e as SPION@SiO₂, e as propriedades fluorescentes das NPS. Pode-se verificar deslocamentos de Stokes maiores do que 150 nm. Os espectros de emissão em dispersões líquidas, dos fluoróforos HBO e HBT livres, contudo se mostraram dependentes da presença de nanopartículas de óxido de ferro, mesmo com a casca de sílica. A supressão de fluorescência foi observada em grande parte dos sistemas, no entanto o mecanismo pelo qual ele ocorre ainda não está bem entendido. A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que os compósitos sintetizados possuem características magnéticas e fluorescentes com potencialidades de uso como agentes de contraste em imagens biomédicas.

Palavras-Chaves: Nanopartículas magnéticas, óxido de ferro, Fluorescência.

ABSTRACT

SELLI, I. GISELE. Magnetofluorescents nanoparticles $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ coupled with ESIPT probe. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 2017. Master Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

In the present study, we investigated the synthesis and characterization of core-shell magnetofluorescent nanoparticles composed of an iron oxide core and silica shells functionalized with fluorophores, which emit by the ESIPT mechanism. The synthesis of the iron oxide nanoparticles was performed by the polyol method and the coating, using the Stober sol-gel synthetic route. The fluorophores 2- [5'-N-(3-triethoxysilyl) propylurea-2'-hydroxyphenyl] benzothiazole (HBT) and 2- [5'-N-(3-triethoxysilyl) propylurea-2'-hydroxyphenyl] benzoxazole (HBO) were coupled to the coated nanoparticles using a reflux system with ethyl acetate as solvent. The resulting nanoparticles have an iron oxide core with diameters of ≈ 10 nm and a silicon oxide shell with thicknesses of ≈ 10 and 16 nm. The peak patterns of the cores obtained by XRD correspond to the inverse spinel structure of magnetite structure. The nanoparticles do not present residual magnetization and hysteresis, indicating a superparamagnetic behavior, regardless of the shell size. The solid state spectra of fluorescence emission confirm the coupling between fluorophores and $\text{SPION}@SiO_2$, and the fluorescent properties of NPs. The samples showed Stokes displacements greater than 150 nm. The fluorescence emission spectra for the liquid dispersions, HBO and HBT fluorophores showed however, a behavior that depends on the presence of iron oxide nanoparticles, even in the presence of silica shell. Fluorescence suppression has been observed in most of the systems, however the mechanism by which suppression occurs is unclear the synthesized NP systems have both magnetic and fluorescent characteristics with potential to be used as contrast agents in biomedical imaging.

Key words: magnetic nanoparticles, iron oxide, fluorescence, ESIPT

1. INTRODUÇÃO

A pesquisa com nanopartículas de óxido de ferro têm sido alvo de grande interesse, principalmente por suas características magnéticas diferenciadas frente a sua forma massiva ou *bulk*, tais como o superparamagnetismo aliado ao baixo custo de produção e excelente biocompatibilidade [1, 2]. As SPION (do inglês, *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles* - SPION) são nanopartícula que possuem uma estrutura composta por um núcleo magnético de óxido de ferro com tamanho menores de ~30 nm e sua superfície pode ser modificada pela adição de camadas com diferentes materiais estabilizantes. A modificação da superfície funciona como proteção das SPION frente ao ambiente circundante, diminuindo o fenômeno de agregação, além de permitir o acoplamento de grupos químicos ou moléculas capazes de fornecer caráter multimodal ao sistema [3, 4]. Por exemplo, o acoplamento de um fluoróforo à superfície das SPION permite que as mesmas possam ser utilizadas para o imageamento óptico e atuar como materiais sinalizadores em ensaios de imunofluorescência, estudos de conformação de proteínas [5] e como agentes de contraste em imagens ópticas *in vivo* [6].

O desenvolvimento de materiais magnetofluorescentes pode levar a avanços na compreensão de processos biológicos em nível molecular, e ao desenvolvimento de ferramentas para diagnóstico para utilização em terapias inovadoras. Agentes de contraste de imagem com nanopartículas magnetofluorescentes, têm superado limitações dos agentes de contraste convencionais tais como fotoestabilidade e insuficiente estabilidade *in vitro* e *in vivo* [11].

Um fluoróforo eficiente para utilização em aplicações biomédicas deve apresentar uma boa intensidade de fluorescência e preferencialmente um elevado deslocamento de Stokes, pois isso permite uma melhor separação entre a luz de absorção e emissão de uma amostra [7, 8]. Uma classe de fluoróforos promissor que

apresenta um elevado deslocamento de Stokes são os 2'-hidroxifenilbenzazóis. Essas moléculas fluorescem através do mecanismo de transferência protônica intramolecular no estado eletrônico excitado (do inglês, *Excited State Intramolecular Proton-Transfer* - ESIPT). O mecanismo de ESIPT é um processo que resulta em um forte rearranjo eletrônico estrutural associado com variações no momento de dipolo e geometria da molécula levando um grande deslocamento entre o comprimento de onda de excitação e emissão [9, 10].

O presente trabalho apresenta a síntese e caracterização de nanopartículas superparamagnéticas com estrutura núcleo-casca constituídas de óxido de ferro e óxido de silício de diferentes espessuras. As nanopartículas núcleo-casca foram funcionalizadas com fluoróforos silanizados derivados de 2- (2'-hidroxifenil) benzazóis. A presença de grupos alcoxissilanos nestes fluoróforos permite a ligação covalente dos mesmos na casca de sílica [12]. Foram investigadas as propriedades físico-químicas, magnéticas e fluorescentes das SPION, além do estudo da influência da espessura da casca nas propriedades fotofísicas dos compósitos produzidos. Dando continuidade a investigações anteriores e desenvolvimento de agentes de contraste magnetofluorescentes a base de SPIONs [13], este trabalho foi desenvolvido em parceria entre o Centro Interdisciplinar de Nanociências e Micro Nanotecnologia da PUCRS e o Laboratório de Novos Materiais Orgânicos do Instituto de Química da UFRGS.

A dissertação conta com 7 capítulos incluindo esta introdução. No capítulo 2 são apresentados o objetivo geral e objetivos específicos do trabalho. O capítulo 3 expõe a fundamentação teórica e revisão bibliográfica sobre o assunto abordado. O capítulo 4 apresenta a descrição das metodologias utilizadas para execução dos experimentos. No capítulo 5, são demonstrados os resultados obtidos durante a realização do mestrado. O capítulo 6 contempla as conclusões. No capítulo 7 são descritas as propostas para trabalhos futuros.

2. OBJETIVOS

Os objetivos principais que nortearam o desenvolvimento deste trabalho, foram a síntese e estudo das propriedades magnéticas e fotofísicas de nanopartículas compostas de óxido de ferro e sílica funcionalizadas com fluoróforos 2 - (2' -hidroxifenil) benzazóis. Este material terá como diferencial o elevado deslocamento de Stokes, que pode atuar de forma a melhorar a intensidade de emissão de fluorescência do material para ser utilizado em testes *in vitro* e *in vivo*.

2.1. Objetivos Específicos

Tendo em vista as propriedades magnéticas e fluorescentes das NPs e a relação das mesmas com a estrutura núcleo-casca, os objetivos específicos foram:

- Sintetizar nanopartículas núcleo-casca de óxido de ferro (SPION) revestidas com diferentes espessuras de sílica (SPION@SiO₂);
- Acoplar dois fluoróforos 2 - [5' – N - (3 - triethoxisilil) propilureia - 2' - hidroxifenil] benzotiazol (HBT) e 2 - [5' – N - (3 - triethoxisilil) propilureia - 2' - hidroxifenil] benzoxazol (HBO) silanizados às SPION@SiO₂;
- Caracterizar as propriedades físicas e químicas das SPION@SiO₂, como composição, morfologia, distribuição de tamanho, estabilidade coloidal, fase cristalina, propriedades magnéticas e propriedades fluorescentes;
- Estudar o efeito que as SPION com diferentes espessuras de sílica provocam nas propriedades fotofísicas dos fluoróforos.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Nanopartículas magnetofluorescentes

A produção e o uso de materiais que contêm simultaneamente mais de um componente funcional, denominados materiais multifuncionais, é uma área de investigação atualmente ativa com potencial para amplas aplicações tecnológicas, como por exemplo, em *lasers* [9], em sondas médicas multimodais [14], e em materiais magneto eletrônicos [15,11]. Dentre esses materiais multifuncionais, destacam-se os que são a base de sistemas em escala nanométrica (10^{-9} m), tais como as nanopartículas (NPs). NPs multifuncionais que combinam propriedades magnéticas e ópticas, formam uma nova categoria de materiais, denominada de NPs magnetofluorescentes [16, 17].

NPs magnéticas, normalmente são compostas por metais (Fe, Ni e/ou Co) e seus respectivos óxidos. A magnetita (Fe_3O_4) e maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) pertencem à classe de óxidos metálicos magnéticos denominados como ferritas cúbicas e são classificadas como estruturas cristalinas de espinélio [18]. A miniaturização para tamanhos de 10 a 30 nm das NPs de Fe_3O_4 confere ao material um comportamento superparamagnético em temperatura ambiente, característica importante, visto que as SPION apresentam respostas magnéticas apenas na presença de campo magnético externo. Na forma de ferrofluidos, essas SPION formam suspensões magnéticas em meio líquido [19]. O superparamagnetismo dessas SPION permite que as mesmas possam ser manipuladas e controladas utilizando-se um campo magnético, podendo penetrar em células e tecidos humanos e ser direcionada para um alvo desejado quando injetadas no organismo [20, 21].

Os materiais magnetofluorescentes podem ser constituídos a partir de polímeros conjugados [22], semicondutores nanocristalinos (QDs) [23],

nanopartículas magnéticas com fluóroforos conjugados [24], sistemas núcleo- casca [25], nanodiamantes [26, 27], entre outros.. A Figura 3.1 mostra um exemplo de material magneto- fluorescente, que têm sua superfície modificada pela adição de grupos químicos ou moléculas capazes de induzir funcionalidades específicas [16].

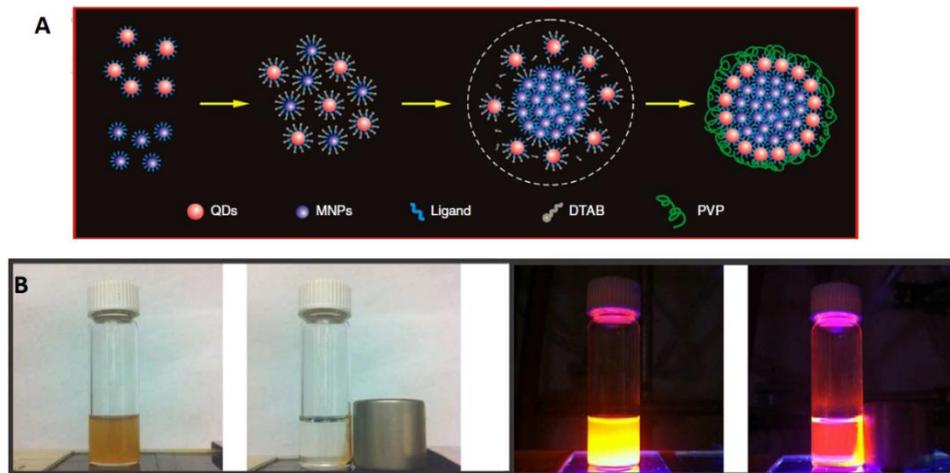


Figura 3.1 A) Formação esquemática de nanopartículas opto-magnéticas *core-shell*. B) Imagens demonstrando a atração magnética das nanopartículas na presença de um ímã sob luz ambiente e ultravioleta (adaptado de [16]). *QDs *Quantum Dots*, MNPs *magnetic nanoparticles*, Ligands ligantes, DTAB *Dodecyltrimetilamonium brometo*, PVP *polivinilpirrolidona*.

NPs magnetofluorescentes tem se tornado uma ferramenta precisa para identificação e caracterização de alvos específicos no contexto biomédico [9, 12, 28]. Suas aplicações envolvem imagens biológicas [21], rastreamento celular [29], biosseparação magnética [30] e nanomedicina [31], destacando-se o imageamento biomédico *in vitro* e *in vivo*, como ressonância magnética e microscopia de fluorescência [32]. Na nanomedicina, as NPs magnetofluorescentes podem ser utilizadas na terapia do câncer, abrangendo as capacidades fotodinâmica e hipertermia [33], bem como no diagnóstico e terapia de outras patologias, como é ilustrado na Figura 3.2.

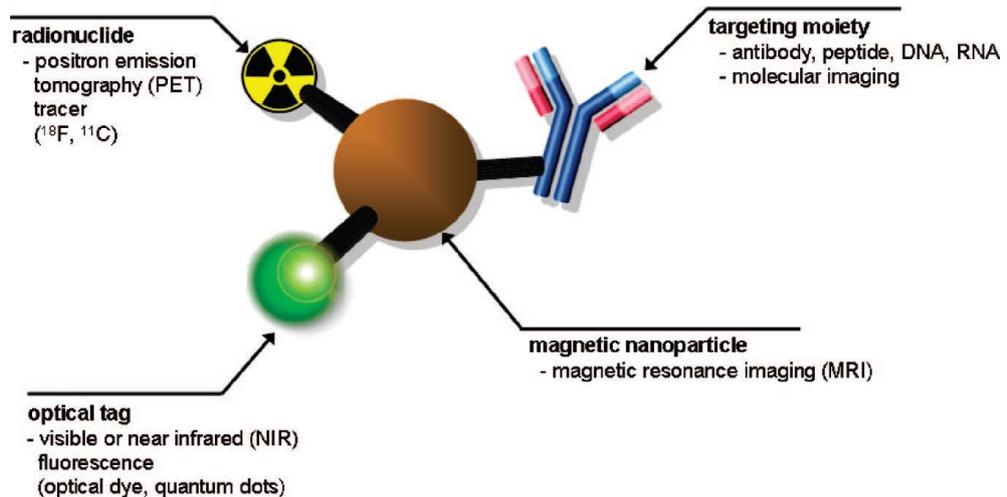


Figura 3.2 Sonda multimodal com várias funções (adaptado de [34])

3.1.1. Nanopartículas de óxido de ferro revestidas com sílica

Devido à elevada razão entre o número de átomos superficiais e os contidos no volume das NPs, as partículas tendem a se desestabilizar, podendo conduzir à agregação. Os usos de materiais de revestimento desempenham um papel importante na estabilização, principalmente quando em suspensões aquosas das SPION [3, 35]. A estabilização pode ser realizada pela presença de cargas, polímeros ou surfactantes sobre a sua superfície.

Dos diferentes revestimentos utilizados para a estabilização das NPs, destaca-se a sílica. A fácil modificação de sua superfície deriva da existência de grupos silanóis na camada de sílica compatíveis com outros grupos funcionais orgânicos (tióis, aminas, carboxilas). Dentro destes grupos funcionais, moléculas como proteínas, fluoróforos, entre outros, podem ser ligadas covalentemente a uma superfície de sílica funcionalizada. Além disso, podem-se formar partículas núcleo-casca (*core-shell*), com estabilidade contra a coagulação, inércia química e transparência óptica.

Dentre os diferentes métodos de produção de SPION com sílica (SPION@SiO₂) [36], o processo sol-gel é um método de síntese química muito utilizado. No processo sol-gel, ocorre a transição do sistema em solução de uma dispersão de partículas coloidais em um líquido para o sistema em gel, formando um

sistema gel-polimérico. A camada de sílica pode ser obtida via o método sol-gel a partir de dois tipos de precursores: sais de metais alcalinos ou alcóxidos. A fórmula dos sais de metais é M_mX_n , onde M é um metal, X é um grupo aniônico, m e n são coeficientes estequiométricos. A fórmula geral dos alcóxidos é $M(OR)_n$, em que o M é o cátion ligado a n grupos derivados de um álcool. Os precursores via organoalcóxissilanos são os mais utilizados e, em geral, são representados como $Si(OR)_4$, onde o R são radicais orgânicos na maioria das vezes grupos metil, etil ou propil. Dentre os alcóxidos mais utilizados, destacam-se o tetraetilortossilicato (TEOS), 3-aminopropilmetoxissilano (APTS) e anidrido 3- (trietoxissilil propilsuccínico (TEPSA)) [37, 38].

A reação de formação da camada de sílica ocorre pela hidrólise e condensação dos precursores de sílica. Devido ao fato da água e os alcóxissilanos serem imiscíveis, é necessário adicionar um solvente, geralmente um álcool, homogeneizando e também um catalisador ácido ou básico para acelerar o processo de hidrólise. A reação ocorre através de ataque nucleofílico do oxigênio da água ao átomo de silício pertencente à molécula do TEOS, de acordo com a Figura 3.3.

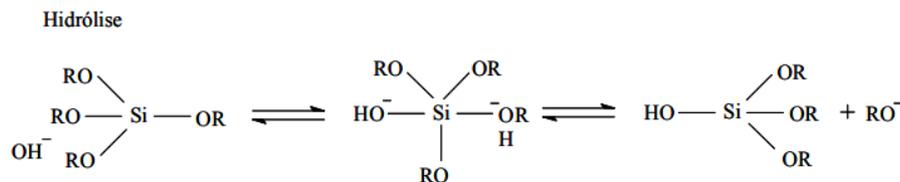


Figura 3.3 Exemplo de reação de hidrólise do precursor TEOS (adaptado de [36]).

A reação de condensação irá ocorrer pela alteração na polaridade quando os grupos etoxi (menos polar) são substituídos por grupos hidroxila (mais polar) durante a hidrólise. A condensação entre Si-O-Si pode ocorrer por reação entre $-\text{Si-OR}$ e um grupo silanol $-\text{SiOH}$, com eliminação de álcool ou por reação entre os grupos silanóis com a eliminação da água (Figura 3.4).

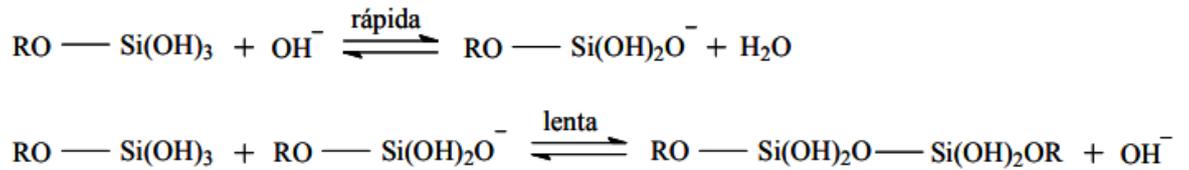


Figura 3.4. Exemplo da reação de condensação de espécies hidrolisadas de TEOS (adaptado [36]).

A condensação de espécies hidrolisadas origina uma rede polimérica tridimensional que se estende num meio líquido chamada de gel opção [25,39].

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, catalisador e solvente [40]. O método Stöber foi o primeiro a ser usada na síntese de NPs puras de sílica pela reação de hidrólise e condensação de organoalcoxissilanos em solução alcoólica usando a amônia como catalisador, obtendo nanoesferas de sílica com uma distribuição de tamanho homogênea. Stöber estudou a influência do tipo de álcool, meio básico, água e a quantidade do precursor alcoxissilano e concluiu que o uso de solução de amônia influenciava na morfologia das nanoesferas. Os alcoóis de maior massa molecular diminuíam a velocidade de condensação e alterava o tamanho das esferas, portanto considerou o etanol como melhor opção [41].

Mohammad-Beigi [37], estudou o efeito do pH na síntese das SPION, a sua estabilização pós-síntese com grupos citratos e a influência do revestimento de sílica perante o processo sol-gel. Assim como Stöber [41], os autores descreveram que o uso de solução de amônia no controle de pH diminuiu a distribuição de tamanho das SPION e o uso de citrato tornou as SPION mais homogêneas, não influenciando no processo sol-gel. Estudos realizados por Deng [42], demonstraram a relação do aumento da polaridade do álcool com a forma e a morfologia da sílica revestida nas SPION, na qual revelou que o uso de metanol não favoreceu o produto final e os melhores resultados foram com etanol. As SPION@SiO₂ híbridas, descrita no trabalho de Digigow [43], foram funcionalizadas com grupos amina. Utilizaram como precursor o TEOS e uma segunda etapa de revestimento com o precursor 3-aminopropiltoxissilano (APTS). Dependendo da quantidade de massa de SPION e

dos precursores, foi possível ajustar o número de grupos amina na superfície da SPION para posterior bio-conjugação.

Na literatura, é possível encontrar trabalhos que demonstram a utilização das SPION com revestimento de sílica e diferentes funcionalizações com fluoróforos. Dimitri [44, 38] mostrou a síntese SPION revestidas com carboxisilano (TEPSA). A fina camada de carboxilsilano obtida apresentou melhora na estabilidade coloidal e os grupos carboxílicos na superfície das NPs possibilitou a conjugação de grupos fluoróforos. Pinheiro [8] preparou nanosondas bifuncionais magnetofluorescentes utilizando SPION de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ e polieletrólitos de polietilenoimina acoplando a fluoresceína (FTIC). Chekina [45], também produziu SPION bifuncionais compostas de sílica e quitosana marcadas com FTIC. Yoon [46] sintetizou SPION a partir de sílica funcionalizada com FITC e rodamina, ambas com agrupamento amina como marcadores biológicos de proteínas. Jang [47] investigou a relação da espessura do revestimento de sílica na extinção de fluorescência de cianinas. Foi notado que conforme o aumento da espessura do revestimento nas NPs, menor será o efeito de supressão de fluorescência. Essa relação demonstra que o óxido de ferro pode atuar como supressor através de dois mecanismos diferentes: primeiro inibindo o acoplamento entre o óxido de ferro e os fluoróforos, já o segundo seria devido à auto absorção do óxido de ferro.

Mais recentemente, Oliveira [13], desenvolveu nanocompósitos de óxido de ferro e sílica contendo o 2-[5'-N-(3-triethoxysilil)propilureia-2'-hidroxifenil]benzotiazol (HBT), o qual foi covalentemente ligado a superfície das $\text{SPION}@\text{SiO}_2$, através dos grupos silanóis (Figura 3.6.). Essa dissertação deriva desse trabalho anterior, e amplia os estudos incorporando também a molécula HBO.

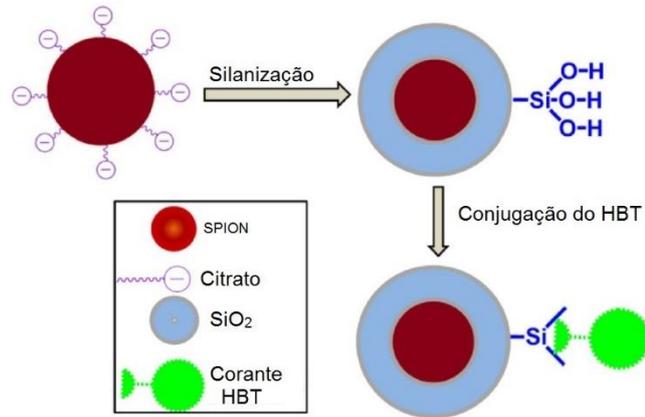


Figura 3.6 Processo de síntese das SPION@SiO₂-HBT estabilizada com ânions citrato seguidos de etapas de silanização pelo método de Stöber e acoplamento do HBT através dos grupos silanóis (adaptado de [13]).

Um grande desafio relatado por muitos autores está na baixa biocompatibilidade das NPs magnetofluorescentes, bem como complexidade de preparação que, frequentemente, envolvem várias etapas de sínteses e estágios de purificação [11].

3.2. Fluorescência

Determinadas moléculas tem a capacidade de absorver energia e, posteriormente, reirradiar. A absorção e emissão de luz são causadas por transições dos elétrons entre os níveis de energia do estado fundamental e níveis eletrônicos excitados. O efeito físico causado por essa absorção é a projeção de um elétron de um orbital de menor energia para um de maior energia. Os processos envolvidos na absorção e emissão de luz estão descritos na Figura 3.7, representados pelo diagrama de Jablonski [48, 49]. As transições eletrônicas ocorrem de um estado fundamental singlete (S_0) para um estado excitado de mesma multiplicidade (S_n). 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 [50, 51]. Nos processos radiativos, responsáveis pela emissão de luz, quando a energia é reemitida de estados singletes 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

(processo fotofísico rápido; $<10^{-6}$ s). Além disso, podem ocorrer transições menos prováveis singlete-triplete e posterior retorno ao estado fundamental, naquilo que é chamado de fosforescência. A intensidade da fosforescência é relativamente baixa em comparação à fluorescência [50, 51].

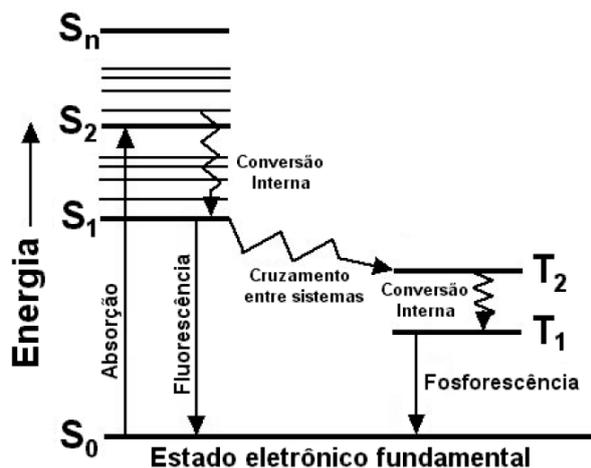


Figura 3.7. Diagrama simplificado de Jablonski (adaptado de [17]).

Para ocorrer a fluorescência em moléculas são necessárias condições fundamentais, tais como apresentar estrutura suficientemente rígida que possam minimizar as perdas não radiativas da energia absorvida e ampliar a possibilidade de transições radiativas [48]. Outro fator que influencia no processo de fluorescência é a presença de grupos substituintes na molécula, pois afetam a intensidade e o tipo de luminescência. Por exemplo, a existência de grupos hidroxila (-OH), metoxila (-OR), amino (-NR₂), cianeto (-CN) e sulfônico (-SO₃H) em geral favorecem amplificação da fluorescência. Já os grupos cetônicos (-C=O), carboxílicos (-COOH) e halogênios (-X) por interagirem no deslocamento dos elétrons diminuem a fluorescência. Além da estrutura molecular, fatores externos como a temperatura, pH e a natureza do solvente devem ser levados em consideração [48, 52].

3.2.1. Supressão de fluorescência

A supressão de fluorescência ocorre quando a intensidade de fluorescência de um fluoróforo é reduzida ou até extinta completamente por fatores extrínsecos. Ela pode ser descrita pela transferência de energia do fluoróforo quando este se apresenta no estado eletrônico excitado para outras moléculas ou para o meio

(agentes supressores). Geralmente a supressão de fluorescência ocorre através de processos não radiativos e pode ser dividida em dois tipos principais: estático e dinâmico [53].

A supressão dinâmica é causada por colisões com outras moléculas presentes no meio e, portanto, controlado por processos difusivos. Para que ocorra é necessário o contato entre as duas espécies envolvidas. Conseqüentemente, a magnitude da desativação é relacionada a maior ou menor concentração da molécula desativadora e a variação da temperatura [24, 52, 54].

Na supressão estática, ocorre a formação de um complexo entre o fluoróforo e o supressor no estado fundamental, resultando assim na redução da intensidade de fluorescência. O aumento da concentração do supressor afeta a intensidade da emissão, uma vez que favorece a formação de um complexo entre o fluoróforo e o supressor (Q), (Figura 3.8) [24, 53, 54].

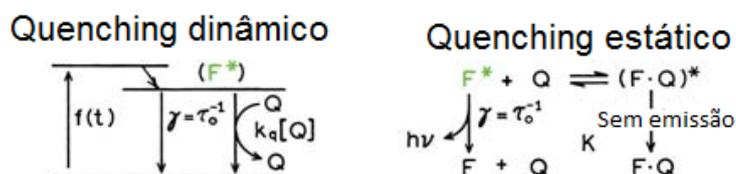


Figura 3.8. Ilustração representativa dos fenômenos de supressão de fluorescência estático e dinâmico (adaptado de [53]). * $f(t)$ função da constante de excitação, $\gamma = \tau_0^{-1}$ frequência de decaimento na ausência do supressor, Q o supressor, $[Q]$ concentração do supressor, F fluoróforo no estado fundamental, F^* fluoróforo no estado excitado, $k_q [Q]$ taxa de decaimento adicional.

3.2.2. Transferência protônica intramolecular no estado eletrônico excitado

A transferência protônica intramolecular no estado eletrônico excitado, designado como ESIPT, corresponde a uma fototautomerização que ocorre no estado eletrônico excitado para determinadas moléculas orgânicas [55]. Normalmente moléculas que apresentam ESIPT são formadas por um grupo doador de um átomo de hidrogênio (grupo ácido) e um grupo aceptor (grupo básico) que, ao estarem em proximidade, formam uma ligação de hidrogênio no estado fundamental. Para heterociclos como os 2'-hidroxifenilbenzazóis, o ESIPT ocorre a partir da transferência intramolecular de um próton do anel fenólico (posição 2') para o

nitrogênio do anel azólico (posição 3), conforme está representado na Figura 3.9 [48, 52, 54, 56].

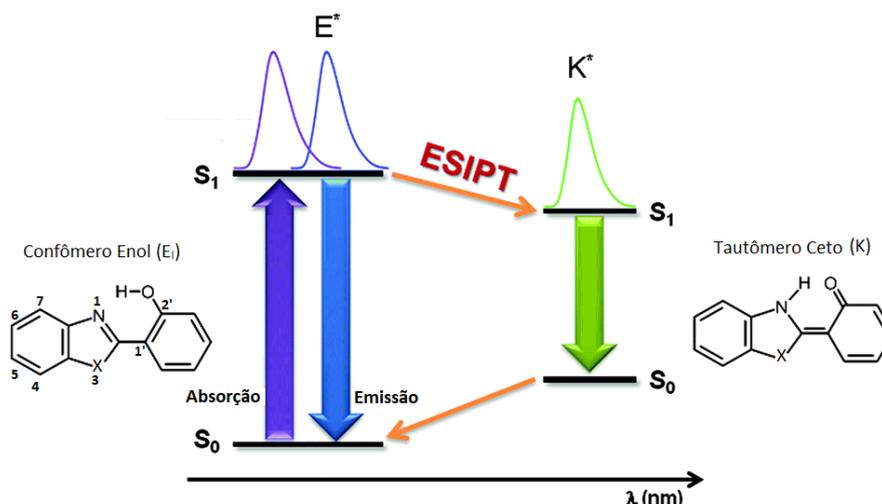


Figura 3.9. Mecanismo de ESIPT para 2'-hidroxifenilbenzazóis (X = O, S, NH) (adaptado de [57]).

O mecanismo de ESIPT ocorre devido à absorção da radiação do confômero enol-cis (E_i), o qual se apresenta predominantemente no estado fundamental como a forma mais estável com uma forte ligação de hidrogênio intramolecular entre o hidrogênio fenólico e o átomo de nitrogênio. A excitação E_i gera o enol-cis excitado (E_i^*), o qual pelo mecanismo ESIPT é convertido no tautômero ceto excitado (K^*) [62,63]. Para finalizar o mecanismo, o tautômero ceto excitado (K^*) relaxa emitindo um fóton e fluorescência retornando ao seu estado fundamental (K). Por fim, o próton retorna ao estado inicial regenerando a forma (E_i) sem mudanças fotoquímicas [56, 63, 64]. É importante salientar que ambos os tautômeros, enol e ceto, podem apresentar fluorescência, mas a emissão do $E_i^* \rightarrow E_i$ é acompanhada de um pequeno deslocamento de Stokes e a emissão do ceto $K^* \rightarrow K$ transcorre com um grande deslocamento de Stokes [52, 54].

Pode-se dividir os benzazóis em três diferentes famílias compostas pelos benzoxazóis (X= O), benzotiazóis (X= S) e benzimidazóis (X= NH) [48, 52, 58]. O acoplamento de um grupamento fenila na posição 2 do anel azólico contendo uma hidroxila localizada em posição orto (2') possibilita a formação dos 2- (2'-hidroxifenil)

benzoxazol, 2- (2'- hidroxifenil) benzotiazol, 2- (2'-hidroxifenil) benzimidazol, de acordo com a Figura 3.10 [52].

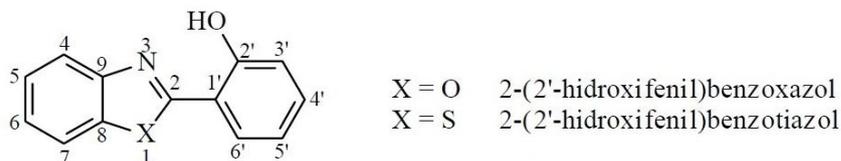


Figura 3.10. Diferentes estruturas de heterocíclicos 2- (2' –hidroxifenil) benzazóis (adaptado de [19]).

A intensidade de fluorescência em moléculas que apresentam o mecanismo de ESIPT é descrito por diferentes autores, que utilizam modificação das espécies químicas e exposição dos corantes a condições como variação de temperaturas, avaliação da influência do tempo de incidência de radiação e, em casos de líquidos, exposição a diferentes solventes. É possível encontrar trabalhos que propõe a utilização dos 2-(2'-hidroxifenil) benzazóis como sondas fluorescentes de materiais celulósicos [52], sondas fluorescentes para marcação de proteínas [48], aplicação como compostos anti-inflamatório [59] e sonda para diagnóstico por imagem [60]. Além das aplicações biológicas, os 2- (2'-hidroxifenil) benzazóis também são utilizados como corantes para laser, no armazenamento de dados, catalisadores e dispositivos orgânicos emissores de luz [52, 58, 61].

A influência da natureza do sistema solvente no mecanismo de ESIPT tem sido muito investigada, sendo que a polaridade, viscosidade e pH podem afetar em grandes proporções os fenômenos de fluorescência. Essa influência nas propriedades fotofísicas do mecanismo de ESIPT pode ser atribuída a presença de diferentes conformêros em solução no estado fundamental, a Figura 3.11 mostra as diferentes geometrias para os conformêros dos 2- (2'-hidroxifenil) benzazóis. Em solventes polares e próticos o conformêro *cis*- enol pode ser estabilizado pela formação da ligação intermolecular de hidrogênio com o solvente, consequentemente enfraquecendo a ligação intramolecular entre a hidroxila fenólica e o átomo de nitrogênio, resultando numa diminuição das espécies emissoras por ESIPT. Em solventes apolares e/ou apróticos a forma mais estável é o *cis*- ceto, espécie responsável pela emissão de ESIPT no estado eletrônico fundamental. Sendo assim, todos os conformêros que têm emissão normal (conformêros

representados na Figura 3.11) competem com a forma enol-*cis* (E_1) no estado fundamental, diminuindo ou inibindo a emissão por ESIPT [9, 10, 48, 56].

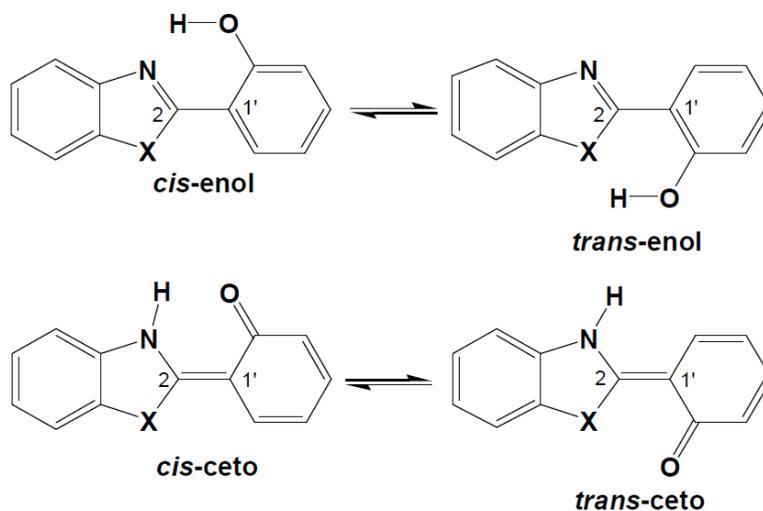


Figura 3.11. Geometrias das formas enol e ceto para os confôrmeros dos 2- (2'-hidroxifenil) benzazóis (adaptado de [9]).

Autores como os das referências [22, 54, 65], trazem revisões sobre o mecanismo de ESIPT nos quais apresentam as possibilidades para utilização desses fluoróforos, suas limitações e vantagens. Um fator citado nessas referências que têm sido utilizado a favor das pesquisas e se apresenta como uma ferramenta para ajuste das propriedades das moléculas fluorescentes é o fenômeno de anulação da fluorescência definido como supressão de fluorescência.

Este trabalho de mestrado amplia estudos preliminares das propriedades fotofísicas das nanopartículas magnetofluorescentes *core-shell* (SPION@SiO₂-2'OH-HBT e 2'OH-HBO), focando numa sistematização do processo de síntese das SPION@SiO₂ buscando um controle e diminuição da casca de SiO₂.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo será destinado a descrição dos materiais, equipamentos, procedimentos e análises empregadas no desenvolvimento desse trabalho.

4.1. Procedimentos experimentais

4.1.1. Descrição de equipamentos e reagentes utilizados

Os dois fluoróforos utilizados neste trabalho, 2- [5'- N- (3 -triethoxisilil) propilureia -2' – hidroxifenil] benzotiazol (HBT) e 2- [5' – N - (3-triethoxisilil) propilureia -2' – hidroxifenil] benzoxazol (HBO) foram sintetizados de acordo com a literatura [9]. Os reagentes e equipamentos utilizados, com as suas devidas especificações estão listados nas Tabelas 4.1 e 4.2.

Tabela 4.1. Reagentes utilizados nos procedimentos de síntese e caracterização.

Reagentes	Fórmula molecular	Pureza
Acetona	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_3\text{O}$	99,8 %
Água ultrapura	H_2O	
Acetato de Etila	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$	99,8%
Brometo de potássio	KBr	99,5 %
Citrato de sódio	$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	99%
Cloreto de ferro III	FeCl_3	97,0%
Cloreto de ferro II tetraidratado	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	98,0 %
Diclorometano	CH_2Cl_2	99,9%
Dietilenoglicol (DEG)	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_3$	99,5%
Etanol	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	100%
Hidróxido de amônio 25%	NH_4OH	28.0-30.0%
Tetraetilortossilicato (TEOS)	$\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$	98%

Tabela 4.2. Equipamentos utilizados para a síntese e caracterização do material.

Equipamento	Modelo	Marca
Agitador tipo vortex	Vortex 1	IKA
Centrífuga	KC5 – 40 kHz	Kindly
Agitador mecânico com haste	710	Fisatom
Chapa de aquecimento	752 A	Fisatom
Centrífuga	Minispin plus	Eppendorf
Difratômetro de raio-X	7000	Shimadzu
Espalhamento de luz dinâmico	Zetasizer-ZEN3600	Malvern
Espectroscopia na região do UV-vis	UV-2101PC	Varin Cary
Espectroscopia por fluorescência	F-4500	Hitachi
Estufa	Q317M	Quimis
Magnetômetro de amostra vibrante	EZ9	MicroSense
Microscópio eletrônico de transmissão	JEM-2010	JEOL
Ultrassonificador	UltraSonic Cleaner	Unique

4.2. Síntese das nanopartículas núcleo-casca de óxido de ferro e sílica

As SPION@SiO₂ foram preparadas em duas etapas. Primeiramente foi realizada a síntese das SPION pela rota sintética poliol [66]. Na segunda etapa, foi realizada a síntese do revestimento de sílica pelo método de Stöber [36].

4.2.1. Síntese das nanopartículas de óxido de ferro por poliol - SPION

As SPION foram preparadas por rota poliol na presença de dietilenoglicol (DEG) de acordo com o protocolo adaptado de [67]. 44 mmol de FeCl₂.4H₂O e 157 mmol de FeCl₃ em solução aquosa foram homogeneizados e então adicionados 2,63 mols de DEG. O sistema foi mantido sob agitação mecânica por 30 minutos a 170 °C. Posteriormente, 375 mmols de NaOH foram adicionados à mistura e mantidos assim por 1 h. Ao término deste período, a solução das SPION foi separada por decantação magnética. As SPION foram lavadas 5 vezes com uma solução de HNO₃ 0,1 M e novamente realizada a decantação magnética. O sólido remanescente foi redisperso em 100 mL de água e deixado sob agitação magnética durante 18 h. A

suspensão de SPION foi centrifugada a 10.000 rpm, por 45 minutos. Por fim, o sobrenadante contendo as SPION menores foi extraído, estocado e mantido a 4 °C.

4.2.2. Síntese da casca do sistema núcleo-casca

Para o revestimento das SPION com sílica foi utilizado como referência o método de Stöber [25]. Inicialmente, foi adicionado o ácido cítrico 0,01 M as SPION. Após, foi realizado decantação magnética com lavagens em acetona (3x). O precipitado resultante foi disperso em água e adicionou-se 0,3 mols de hidróxido de amônia (NH₄OH) para obter pH ~10. Em uma segunda etapa, foram adicionados 1,28 mmols de etanol, 1,30 mols de água e 0,3 mols de NH₄OH. A mistura foi mantida em agitação mecânica para homogeneização e então adicionado à solução de SPION. Ao final, foi colocado 3,01 mmols de TEOS na solução, a qual foi mantida sob agitação durante 12 h. A mistura remanescente foi centrifugada à 12.000 rpm por 30 minutos e lavada com etanol. As SPION recobertas com sílica foram denominadas de SPION@SiO₂. Para avaliar a influência do precursor de sílica no tamanho da SPION@SiO₂ as quantidades utilizadas dos reagentes foram variadas como estão descritos na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Precursores utilizados para síntese das SPION@SiO₂.

Precursores	Concentração (mol.L ⁻¹)	
	SPION@SiO ₂ -30	SPION@SiO ₂ -60
Ácido cítrico 0,01 M	0,0163	0,0163
SPION	0,27	0,27
Acetona	68	68
NH ₄ OH	0,01	0,01
EtOH	1,28	1,28
H ₂ O	2,5	2,5
TEOS	0,00318	0,00358

A influência do tempo de reação na espessura do revestimento também foi avaliada, mantendo as mesmas etapas do procedimento descrito na seção 4.2.2. No

entanto, alíquotas de 5 mL foram retiradas do sistema, a cada 30 minutos, depois a cada 2 h até completar 12 h de reação.

4.2.3. Ancoragem dos fluoróforos nas SPION@SiO₂

Os fluoróforos utilizados foram sintetizados de acordo com as referências [9, 12] e obtidas em colaboração com o grupo de pesquisa do Instituto de Química da UFRGS. Uma mistura de (SPION@SiO₂ e 2'-hidroxifenilbenzazóis) na proporção em massa de 1:10, foi dissolvida em acetato de etila. Essa suspensão foi submetida a agitação em refluxo a 70 °C, por 24 h. O sólido resultante foi lavado com etanol até que não se observasse fluorescência sob luz UV. As lavagens também foram lidas em espectrômetro UV-Vis onde confirmou-se a diminuição da fluorescência após a 3ª ou 4ª lavagem. O sólido resultante foi seco em estufa a 80 °C. Esse método para o acoplamento do fluoróforo foi realizado com base em trabalhos anteriores realizados no centro NanoPUC [13].

4.3. Procedimentos de caracterização

As NPs foram caracterizadas pelas seguintes técnicas: espalhamento dinâmico de luz (DLS), difração de raio-X (DRX), microscopia de transmissão eletrônica (TEM), magnetômetro de amostra vibrante (VSM), espectroscopia por ultravioleta visível (UV-Vis), infravermelho (FTIR) e espectroscopia de fluorescência (FL). Os procedimentos adotados em cada um deles são descritos de forma resumida abaixo.

4.3.1. Espalhamento dinâmico de luz e potencial zeta

As amostras estoque inicialmente ultrassonificadas por cerca de 45 minutos. Após, uma alíquota foi diluída 50 vezes, homogeneizada em vortex e dispostas na célula para análise de DLS e mobilidade eletroforética. As medidas foram realizadas a 25 °C.

Para avaliação do potencial zeta, foi utilizado a técnica de mobilidade eletroforética. As medidas foram realizadas em diferentes faixas de pH (2-12) e com

amostras na concentração de $\sim 1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ (relativo ao Fe). As análises foram medidas no equipamento Zetasizer, modelo ZEN3600, da Malvern.

4.3.2. Difração de raio-X

A estrutura cristalina das SPION foi medida por difração de raio-X. Os difratogramas foram obtidos variando-se 2θ de $15-80^\circ$, com passo de $0,05^\circ$ e tempo de aquisição de 4 s por ponto, utilizando-se radiação Cu- K_α ($\lambda=1,54056 \text{ \AA}$), 40 kV e 30mA. As amostras sólidas foram dispostas no porta-amostras de vidro disponível no próprio equipamento. As análises foram realizadas no equipamento de difração de raio X (DRX), modelo 7000 - Shimadzu.

4.3.3. Microscopia de transmissão eletrônica

Para análise de distribuição de tamanhos e morfologia das nanopartículas foi utilizado um microscópio eletrônico de transmissão. As amostras foram diluídas ($\sim 100x$) a partir da solução estoque de NPs, agitadas em vortéx e uma gota pingada diretamente no porta-amostras (grade de cobre com filme de carbono). A amostra depositada foi mantida sob vácuo por no mínimo 24 h antes da análise. O diâmetro médio e a espessura da casca de sílica das NPs foram medidas com auxílio do software *ImageJ*, com contagem de no mínimo 100 partículas por micrografia. As medidas foram realizadas no equipamento de TEM modelo JEM-2010, 200 kV – JEOL.

4.3.4. Magnetômetro de amostra vibrante

As curvas de magnetização das NPs foram obtidas em um magnetômetro de amostra vibrante (VSM), EZ9 - MicroSense, no Laboratório de Magnetismo do instituto de Física da UFRGS. As amostras foram pesadas e dispostas no porta-amostras de vidro. O campo magnético aplicado teve variação de -20 a 20 kOe e as medidas foram realizadas em temperatura ambiente.

4.3.5. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Foram preparadas pastilhas de brometo de potássio (KBr) e SPION pura e SPION@SiO₂ na proporção de 10:1. A mistura foi macerada em uma cápsula de porcelana e prensada a 10 Mpa, posteriormente secas em estufa a 110 °C, por 3 h. Os espectros foram obtidos no intervalo de 400- 4000 cm⁻¹, no equipamento Spectrum One, da Perkin Elmer.

4.3.6. Espectroscopia de absorção e fluorescência

Para o estudo das propriedades fotofísicas dos compósitos sintetizados em dispersões líquidas foram preparadas soluções dos fluoróforos puros em concentração de 360 µM e suspensões das NPs com 1,5 mg em 10 mL. O solvente utilizado para solubilizar as NPs foi o etanol. Para solubilização das dispersões líquidas dos fluoróforos foi utilizado o diclorometano e etanol. Partindo das soluções dos fluoróforos puros foi realizada a titulação com as seguintes amostras: SPION, SPION@SiO₂-30 e SPION@SiO₂-60. Este método de titulação foi utilizado com base no trabalho de Oliveira, 2016 [13].

Para verificação das propriedades fotofísicas dos compostos primeiramente foram medidas, no espectrômetro UV-vis e no espectrômetro de fluorescência, as soluções dos fluoróforos puros e então a cada nova alíquota das NPs novas leituras eram realizadas. As adições das amostras foram realizadas até que não houvessem alterações acentuadas na intensidade de fluorescência devido à adição das nanopartículas puras [13].

As leituras de absorção e emissão foram realizadas em um espectrofotômetro Varin Cary 50 e as medidas de fluorescência em um espectrofluorímetro Hitachi modelo F- 4500 [56].

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, serão apresentados os resultados obtidos na síntese das SPION com e sem revestimento de sílica e suas caracterizações. Numa segunda etapa, serão mostrados os resultados do acoplamento dos fluoróforos benzotiazol (HBT) e benzoxazol (HBO) nas SPION@SiO₂. Ao final, será apresentado o estudo das propriedades fotofísicas das NPs magnetofluorescentes.

5.1. Estrutura e morfologia das SPION

A Figura 5.1 apresenta dados estruturais e morfológicos das SPION sintetizadas obtidos com as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), difração de raios-X (DRX) e espalhamento de luz (DLS). A Tabela 5.1 ilustra os valores de tamanho médio obtidos pelas análises de TEM, DLS e XRD, bem como os valores do potencial zeta das NPs em solução aquosa e os valores do índice de polidispersibilidade (IPD) das NPs.

Nas micrografias de TEM é possível observar o formato, aproximadamente, esférico das SPION, com diâmetro médio em torno de 10 nm. Conjuntamente com as micrografias, foram realizadas medidas de EDS (*energy dispersive X-ray spectrometry*), em diferentes regiões da grade, confirmando a presença do elemento ferro.

O difratograma das NPs (Figura 5.1d) apresenta picos em 2θ de aproximadamente, 30,2 °, 35,3 °, 41,4°, 56,6 °, referentes aos planos cristalinos (220), (311), (400) e (222) da estrutura cúbica espinel inverso da magnetita (Fe₃O₄), obtidos da ficha cristalográfica JCPDS, n° 19-629. Foi possível também notar a presença de picos que coincidem com estrutura cristalina do cloreto de sódio (planos (116), (311) (400), (222)). Essa impureza pode ser remanescente do cloreto

de sódio utilizado na síntese, similarmente ao que foi observado em trabalhos anteriores [70]. O tamanho dos cristalitos estimado por XRD foi calculado de acordo com a equação de *Scherrer*:

$$D = \left(\frac{K\lambda}{\beta \cos(\theta)} \right) \quad (5.1)$$

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 [104]. Usando a largura do pico de maior intensidade, obteve-se um tamanho de cristalitos de 8,1 nm. A distribuição de tamanho das SPION em dispersão aquosa obtida por DLS indica um diâmetro hidrodinâmico médio de 10,5 nm. Observou-se que não houveram diferenças acentuadas nos valores de tamanho médio das SPION entre as três técnicas de caracterização utilizadas.

Tabela 5.1. Tamanho médio das SPION obtidos por TEM, DLS, XRD e potencial zeta.

Amostras	Diâmetro (nm)		Diâmetro hidrodinâmico (nm)		Potencial zeta (mV)	pH _{final} *
	TEM	DRX	DLS	IPD		
SPION	10,3 ± 2,4	8,1	10,5 ± 2,5	0,32	+ 50,1	5,0

* pH_{final} relativo à solução de SPION numa concentração de Fe de 2,7 mmol.L⁻¹ para medidas de PZ.

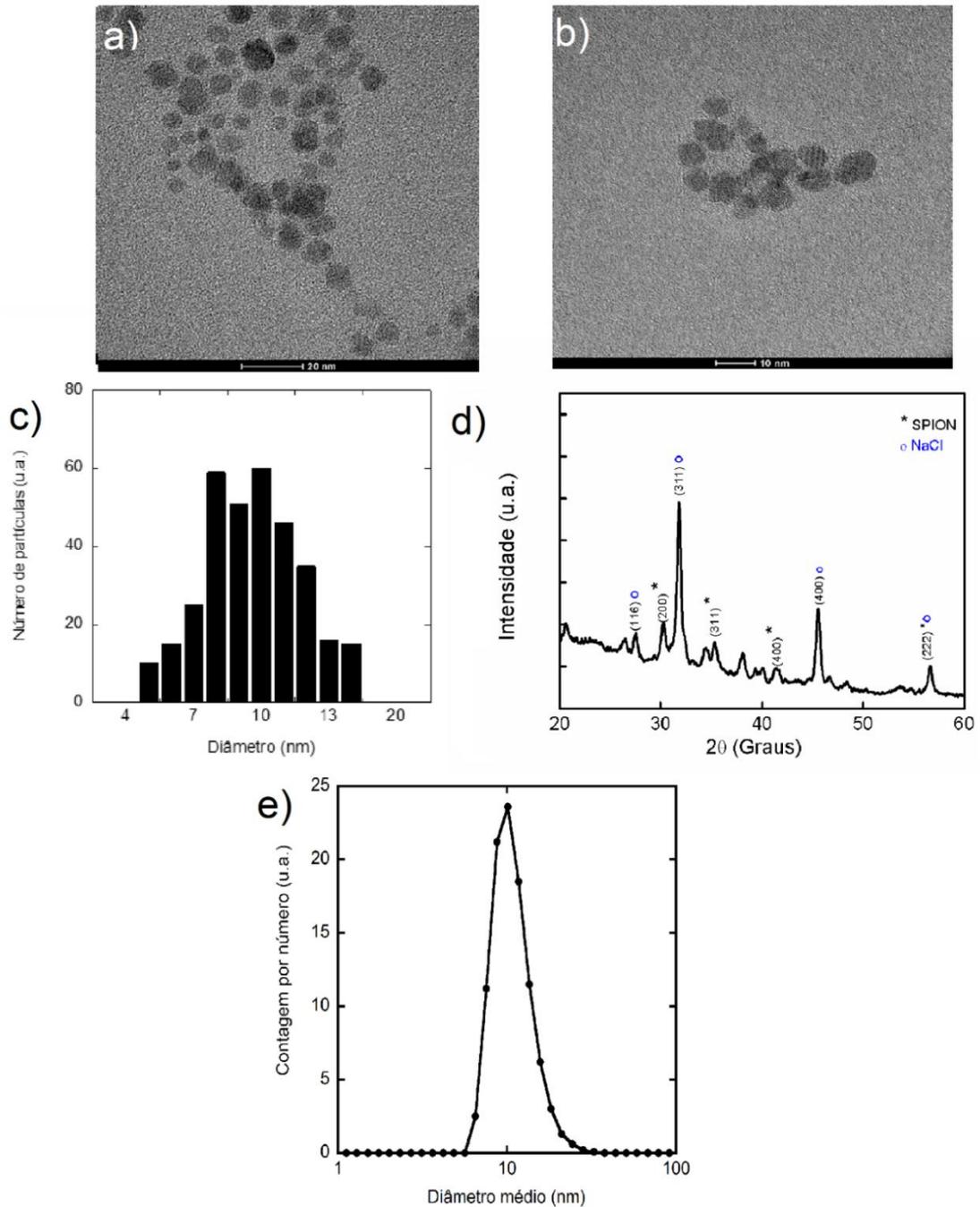


Figura 5.1 Características físicas das NPs de óxido de ferro como sintetizadas (a, b) Imagens de TEM, (c) distribuição de tamanho obtida das imagens de TEM, (d) Difratoograma obtido através da análise das SPION (e) distribuição de tamanho em escala logarítmica, obtida por DLS das SPION em solução aquosa.

5.2. Avaliação do controle da espessura da casca de sílica via rota sol-gel

Diferentes procedimentos de síntese foram adotados nesse trabalho almejando um controle adequado da espessura final da casca de sílica nas NPs. Os

testes de controle do tempo da reação fixando a concentração de TEOS em 2,3 mmol foram realizadas foram retiradas alíquotas em tempos de 0,5, 1,5, 2, 4, 8 e 12 h. Já em relação a variação da quantidade de TEOS o tempo foi fixado em 12 h e o precursor foi variado de 2,20 a 3,58 mmols.

Com relação à variação do tempo reacional, observou-se apenas uma leve variação do tamanho da espessura da casca de sílica com a alteração do tempo reacional. Na Tabela 5.2, os resultados obtidos estão descritos resumidamente e os dados demonstram que as nanopartículas são formadas nas primeiras horas de reação. Segundo Chen [31] e Rahman [36], todas as partículas são formadas nos primeiros estágios da reação e então crescem até que o TEOS seja completamente consumido. Segundo Carcouet [105], as partículas são formadas em aglomerados, porém com o passar do tempo de reação esses aglomerados serão desfeitos. Porém, os resultados obtidos neste trabalho não estão de acordo com os apresentados na literatura. Na literatura, o primeiro estágio de formação das partículas compreende tempos de 2 h. Já nos resultados obtidos observou-se a formação de nanopartículas revestidas em 30 minutos de reação. No entanto, nos primeiros trinta minutos há presença de aglomerados, e a partir de 4 h de reação começa-se obter partículas com forma mais homogênea. Os resultados obtidos indicam que a síntese não é tão simples como apresentada na literatura. Notou-se pelas imagens do TEM, que com 12 h foram obtidas nanopartículas contendo estrutura núcleo-casca a maioria das NPs têm apenas um núcleo e a casca de sílica amorfa tem forma ligeiramente esférica.

Tabela 5.2. Tamanho médio das SPION@SiO₂ obtidos por TEM e DLS em função do tempo de reação.

Amostras	Tempo (h)	Diâmetro (nm)	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	
		TEM	DLS	IPD
SPION@SiO ₂	0,5	39,2	50 ±13,1	0,34
	0,75	46,4	52,3 ± 9,4	0,47
	2	48,0	48,5 ± 1,3	0,32
	4	51,2	57,4 ±1,9	0,41
	8	51,4	50,3 ± 2,3	0,47
	12	48,1	52,2 ± 5,6	0,45

Em relação a variação da concentração do precursor, foram realizados diversos testes onde o tempo fixado foi de 12 h. Na literatura, a rota sintética utilizada é descrita como um método no qual o controle da espessura da casca de sílica com tamanhos entre 10-20 nm é facilmente obtida [71, 72]. No entanto, na tentativa de reproduzir condições similares às apresentadas na literatura, a camada de sílica com diâmetros menores que 30 nm, não foram alcançadas. Foi possível apenas obter o controle da espessura da casca de sílica quando utilizadas quantidades de 3,18 e 3,58 mmol.L⁻¹ do precursor de sílica, resultando em uma espessura de 10 e 16 nm respectivamente.

Dois tamanhos de partículas 30 e 60 nm foram selecionados para dar continuidade ao trabalho. As mesmas foram denominadas como SPION@SiO₂-30 e SPION@SiO₂-60, em função do seu tamanho médio medido por DLS.

5.3. Caracterização morfológica e estrutural das SPIONs revestidas com sílica

Nessa seção são apresentadas as características morfológicas e estruturais das NPs núcleo-casca de óxido de ferro e sílica (SPION@SiO₂) obtidas com diâmetros hidrodinâmicos totais de aproximadamente 60 e 30 nm.

A Figura 5.2 apresenta micrografias de TEM e a distribuição de tamanho em solução aquosa por DLS das SPION@SiO₂-30 e SPION@SiO₂-60. As imagens de TEM confirmam a estrutura do tipo núcleo-casca com formato arredondado, sendo que a maioria das partículas contém apenas um núcleo de óxido de ferro. A espessura média da casca de 10,1± 2,91 e 15,9±3,5 nm, respectivamente (Tabela 5.3), foi similar aos encontrados na literatura [3, 25, 70]. A análise por DLS indica um diâmetro hidrodinâmico total médio em torno de 33,6 e 56,5 nm.

Tabela 5.3. Tamanho médio (por TEM, DLS) e potencial zeta das SPION@SiO₂-30 e SPION@SiO₂-60.

Amostras	Diâmetro (nm)	Diâmetro hidrodinâmico (nm)		Potencial zeta (mV)	pH
	TEM	DLS	IPD		
SPION@SiO ₂ -30	32,0 ± 5,5	35,5 ± 4,3	0,480	-37,4	7,35
SPION@SiO ₂ -60	55,4 ± 4,5	57,3 ± 3,4	0,520	-34,3	8,50

pH_{final} relativo à solução de SPION numa concentração de Fe de 2,5 mmol.L⁻¹ para medidas de PZ.

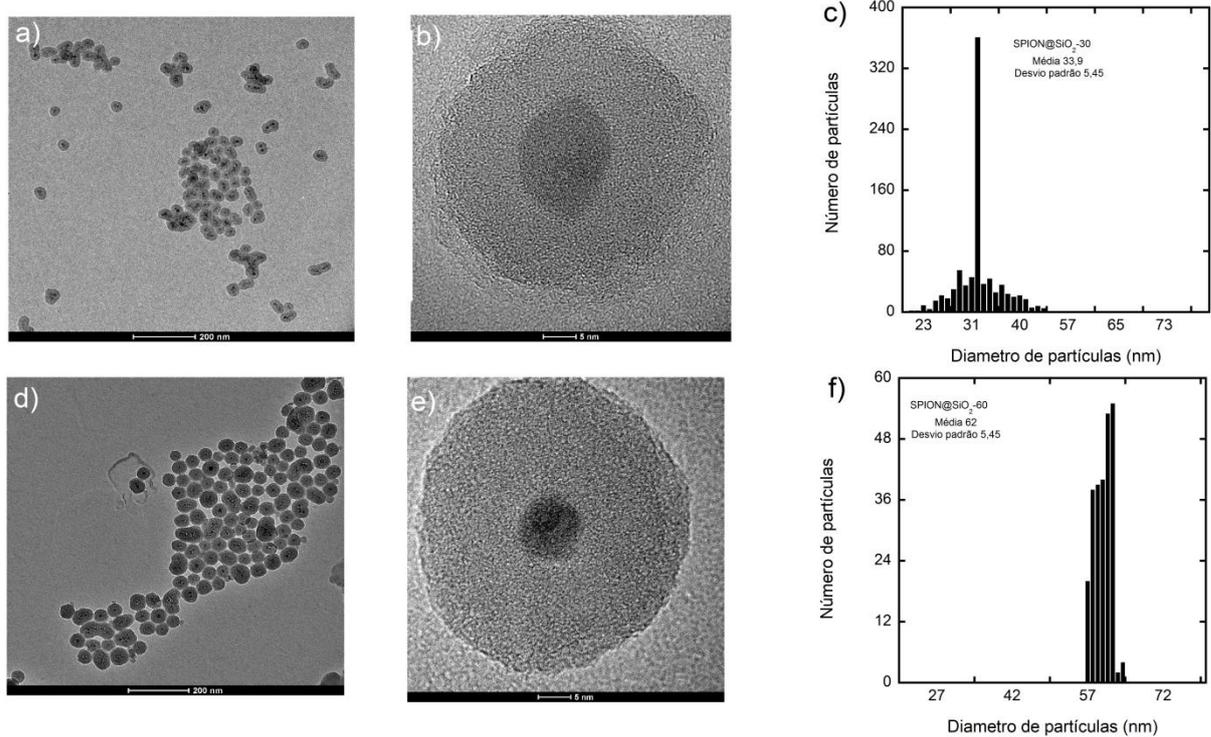


Figura 5.2. Imagens de TEM(a, b) das NPs SPION@SiO₂-30 e das (d, e) SPION@SiO₂-60. (c, f) Histograma distribuição de tamanho obtida por DLS das SPION@SiO₂-30 (c) e SPION@SiO₂-60 (f).

Os grupos químicos presentes nas SPION@SiO₂ podem ser identificados nos espectros de absorção na região do infravermelho, apresentados na Figura 5.3. Para comparação, os espectros das SPION sem sílica também são mostrados. Foram realizadas medidas com os dois grupos de NPs com casca de diferentes espessuras, mas como os espectros foram similares, apenas os resultados da SPION@SiO₂-60 são mostrados.

Observa-se no espectro das amostras a presença de bandas características das vibrações de estiramento do grupo OH em 3500 a 3400 cm⁻¹ presentes tanto na

SPION pura quanto nas SPION@SiO₂. As bandas na região de aproximadamente 1060 e 950 cm⁻¹ são devidas a modos de vibração dos grupos Si-O-Si e a banda em 1640 cm⁻¹ correspondente às ligações Si-OH [73]. Ambas as amostras apresentam picos em ~467 cm⁻¹, associados a deformação axial das ligações Fe-O [36, 74]. As bandas na região de aproximadamente 1103 cm⁻¹ podem ser atribuídas ao estiramento de ligação C-O remanescente da síntese das SPION [75]. Esses grupos provavelmente se originam de resíduos do DEG (C₄H₁₀O₃), como observado em NPs de óxido de ferro obtidas via rota poliol [75]. As bandas na região de 2911 e 2824 cm⁻¹ podem ser atribuídas a presença de grupos metilênicos (CH₂) do DEG.

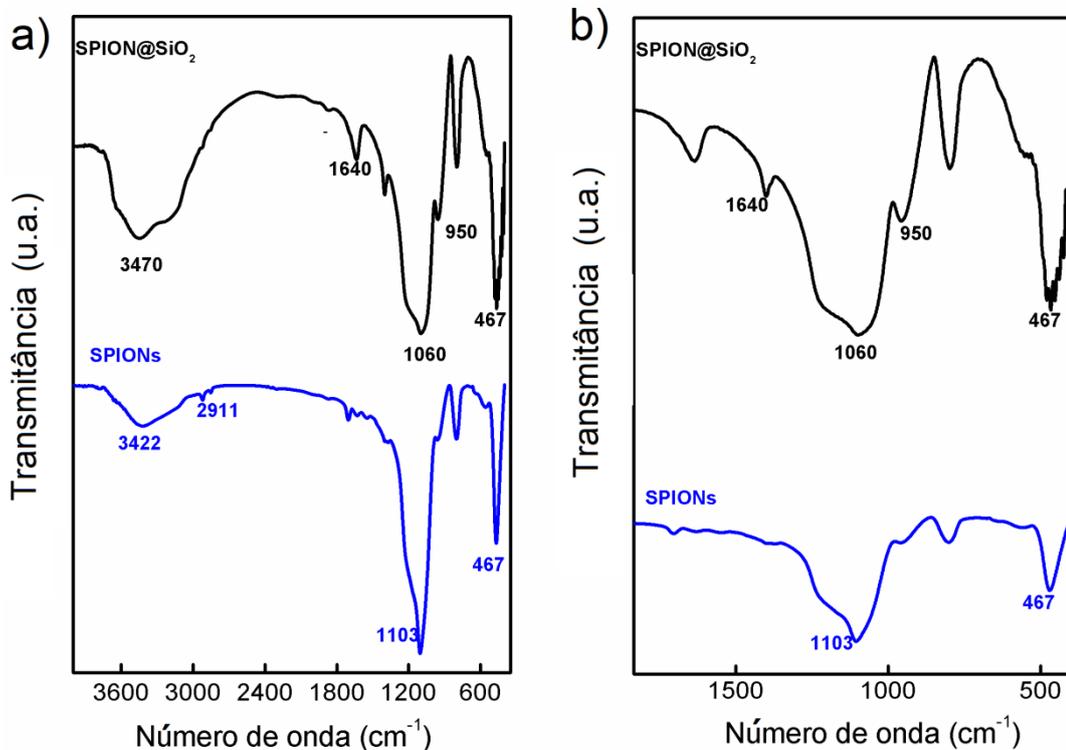


Figura 5.3. (a) Espectros de infravermelho de amostras de SPION e SPION@SiO₂-60, (b) ampliação do espectro de infravermelho na região de 1800-400 cm⁻¹.

Para o estudo das propriedades coloidais em meio aquoso das NPs, foi utilizada a técnica de mobilidade eletroforética, medindo os potenciais zeta das soluções estoque de em função do pH do meio. Os valores de potencial zeta obtidos a partir da solução estoque de NPs difeririam entre si. O valor positivo de potencial zeta obtido para SPION (Tabela 5.2) pode ser devido às lavagens em meio ácido. O ácido nítrico utilizado contém o contra- íon nitrato que estabiliza eletrostaticamente as NPs, conferindo melhor solubilidade em meio aquoso [38]. Os valores negativos

de potencial zeta para as SPION@SiO₂-30 e SPION@SiO₂-60 são atribuídos a presença de grupos hidroxilas na superfície de sílica.

Em relação à variação do potencial zeta em função do pH, foram obtidos valores de pontos isoelétricos (PI) de ~7 para as SPION e de ~2 para as SPION@SiO₂ (Figura 5.4). resultado similar aos descritos na literatura [38, 76, 77, 78]. O deslocamento dos valores de PI das SPION puras em relação às SPION com o revestimento de sílica confirma a modificação da superfície. Em pH básico o potencial zeta dos dois tipos de NPs fica similar e próximo a -40 mV, o que favorece a estabilidade da dispersão coloidal. As SPION@SiO₂, contudo, mantem valores altos negativos de ζ também em pH neutro o que é interessante para aplicações biológicas.

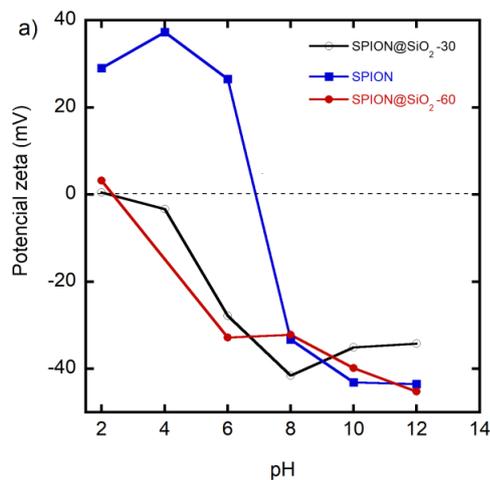


Figura 5.4 Potencial zeta em função do pH para as SPION e SPION@SiO₂ em dispersão aquosa.

5.4. Propriedades magnéticas

As curvas de magnetização das SPION puras e das SPION@SiO₂ em função do campo magnético externo, medidas na temperatura ambiente, estão mostradas na Figura 5.5. As curvas de magnetização de todas as NPs não mostraram magnetização residual na ausência de campo magnético, nem histerese, o que caracteriza um comportamento superparamagnético. As SPION apresentaram valor de magnetização de saturação de 38,1 emu/g, valores inferiores, comparados aos padrões comerciais de nanopartículas de óxido de ferro 75 emu/g, isto pode estar

relacionado a existência de aglomerados nessas NPs comerciais, o que aumenta os valores de magnetização de saturação. Resultados similares com relação à magnetização de saturação em nanopartículas sintetizadas pelo método poliol foram demonstrados por Oliveira, 2018 [70].

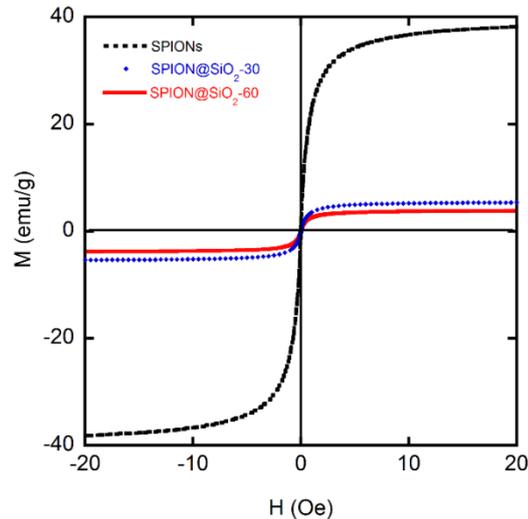


Figura 5.5. Curvas de magnetização em função do campo magnético das SPION, SPION@SiO₂-30 e SPION@SiO₂-60.

Os valores de magnetização de saturação para as SPION@SiO₂ foram inferiores aos obtidos pelas SPION puras. Essa diferença é dada pelo fato de que a magnetização foi medida em função da massa total de amostra sem descontar a presença de materiais não magnéticos (camada diamagnética de sílica) ao redor do núcleo de ferro [79, 80].

5.5. Acoplamento dos fluoróforos

Para a obtenção dos compósitos magnetofluorescentes utilizou-se os fluoróforos previamente descritos no capítulo 4: 2 - [5' - N - (3 - triethoxisilil) propilureia - 2' - hidroxifenil] benzotiazol (HBT) e 2 - [5' - N - (3-triethoxisilil) propilureia - 2' - hidroxifenil] benzoxazol (HBO) [9]. A motivação para a escolha destas moléculas deve-se ao fato de que há poucos trabalhos na literatura que relatam o comportamento de fluoróforos que emitem fluorescência através do mecanismo de ESIPT em presença de sistemas e/ ou partículas magnéticas [13]. Além disso, por terem grupos alcóxissilanos (Si (OEt)) em sua estrutura, estas

moléculas têm a capacidade de ligar-se covalentemente nas NPs através de reações com os grupos silanóis presentes na superfície da sílica, conforme esquematizado na (Figura 5.6) [10, 12].

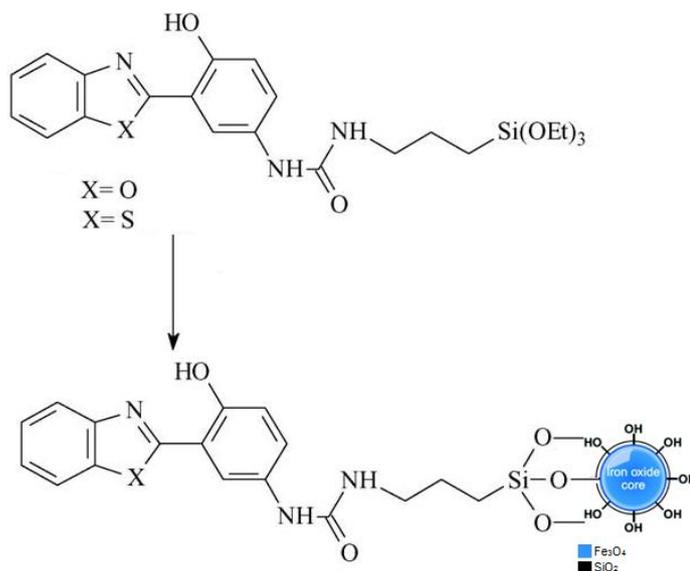


Figura 5.6 Esquema da reação de acoplamento das SPION@SiO₂ e fluoróforos benzazólicos.

Os espectros de absorção no infravermelho obtidos para as SPION@SiO₂-30 e SPION@SiO₂-60 acopladas com os fluoróforos HBT e HBO são mostrados na Figura 5.7. Além das bandas atribuídas a estrutura do sistema SPION@SiO₂ descritas na seção 5.3, foram observadas bandas de absorção adicionais devido aos grupos químicos presentes no HBO e HBT (Figura 5.7) [81, 10, 9]. As bandas de absorção presentes nos espectros atribuídos as SPION@SiO₂ acopladas com os corantes HBO e HBT em 3315-3329 cm⁻¹ são atribuídas ao grupamento amino (NH) e as bandas na região de 1600-1400 cm⁻¹ são atribuídas aos estiramentos C=O e C=C [81, 12].

Para o HBO e HBT pode-se encontrar bandas de absorção em torno de 2900 cm⁻¹ atribuídas aos grupos metilênicos (-CH₂-) e metilas (-CH₃), no entanto, essas bandas não se apresentam de forma muito pronunciada nos compósitos sintetizados. A baixa intensidade destas bandas deve-se à presença dos grupos -OH e Si-OH da rede de sílica que estão presentes em maior quantidade nos compósitos. Também é possível identificar sobreposição de bandas se compararmos

os espectros dos fluoróforos puros frente aos dos compósitos na faixa de 1600-400 cm^{-1} .

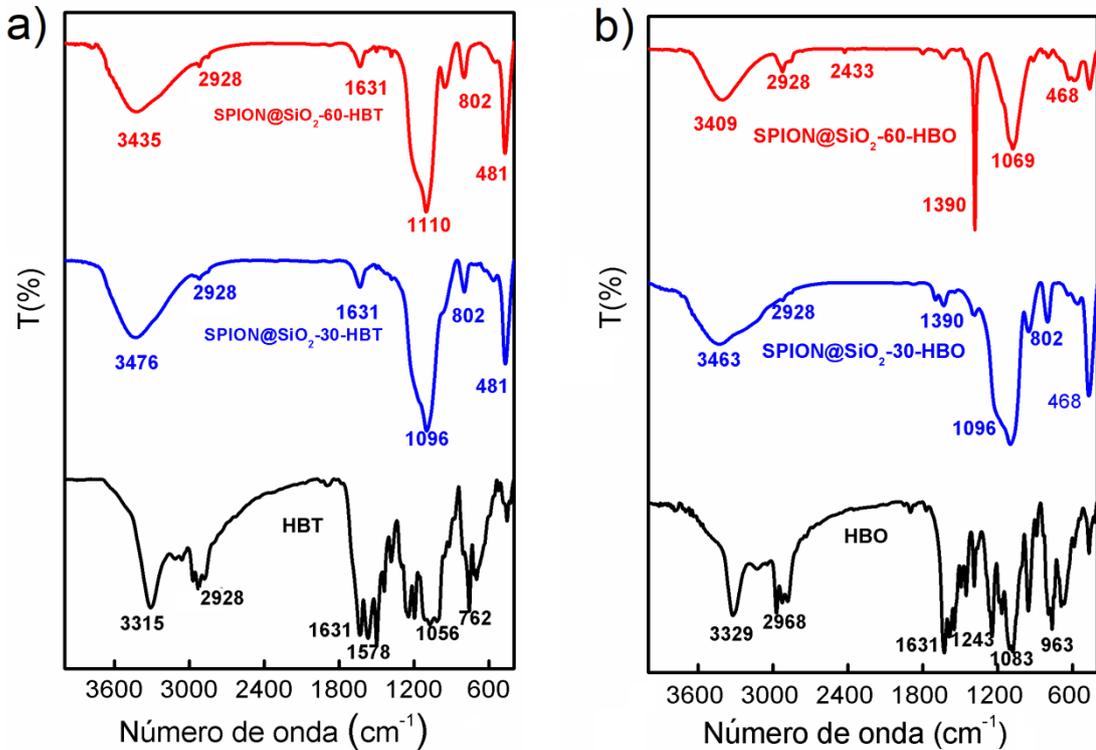


Figura 5.7. (a) Espectros de infravermelho das amostras SPION@SiO₂-30-HBT, SPION@SiO₂-60-HBT e espectro do fluoróforo HBT puro, (b) espectros de infravermelho das amostras SPION@SiO₂-30- HBO, SPION@SiO₂-60-HBO com acoplamento do HBO e do fluoróforo HBO puro.

A Figura 5.8 apresenta as medidas do potencial zeta em função do pH para as SPION@SiO₂ acopladas com os fluoróforos. Os resultados indicam pouca alteração nos valores de potencial zeta após o acoplamento dos benzazóis, com um leve deslocamento dos PI em relação às SPION@SiO₂. Tomados em conjunto os resultados indicam que o acoplamento das moléculas HBO e HBT nas SPION@SiO₂-30 e nas SPION@SiO₂-60 foram bem-sucedidas.

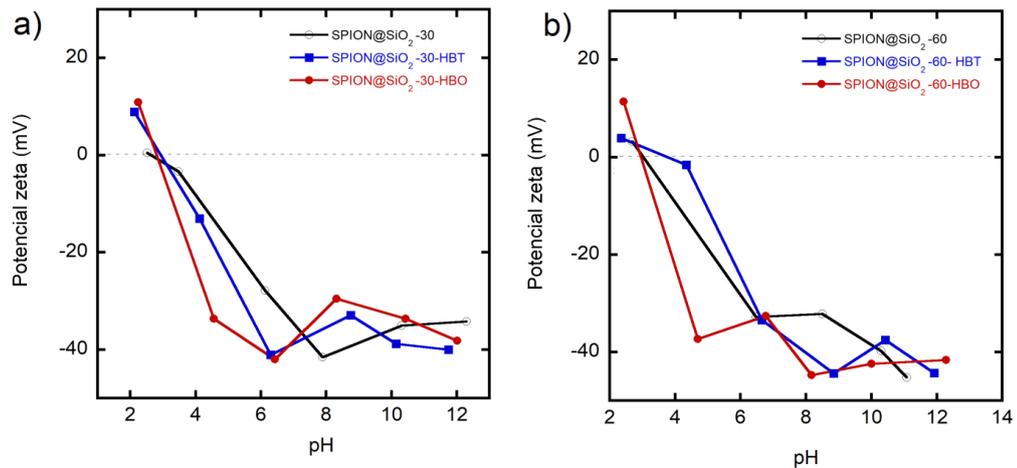


Figura 5.8. Potencial zeta em função do pH das SPION@SiO₂-30 e SPION@SiO₂-60 puras e com os fluoróforos HBT e HBO.

Além disso, não foram observadas alterações consideráveis nas curvas de magnetização das NPs acopladas aos fluoróforos HBT e HBO (Figura 5.9), apenas uma pequena redução nos valores de magnetização de saturação, em comparação as SPION, pela presença da camada diamagnética de sílica.

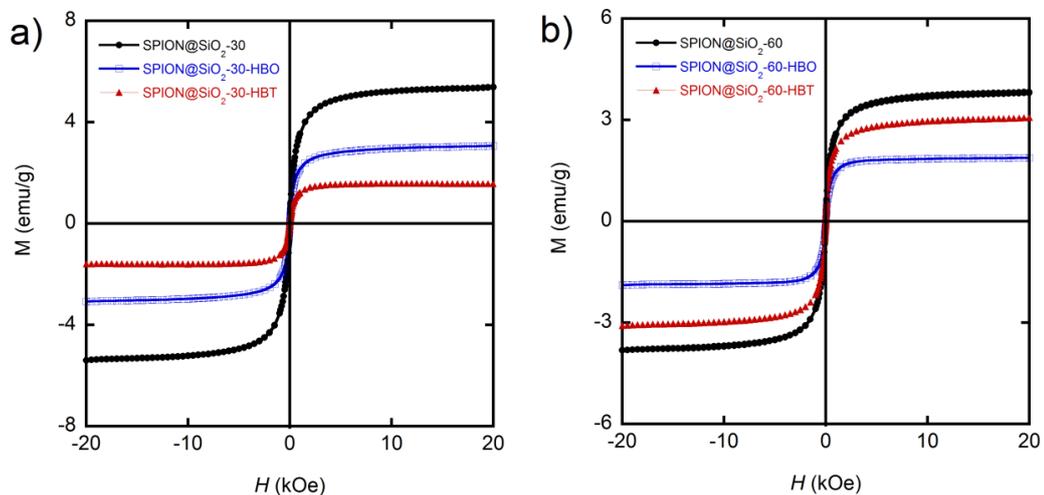


Figura 5.9. Curvas de magnetização em função do campo magnético a) SPION@SiO₂-30 com HBT e HBO e b) SPION@SiO₂-60 com HBO e HBT.

5.6. Propriedades fotofísicas das NPs magnetofluorescentes

5.6.1. Fluorescência no estado sólido

Os fluoróforos HBT e HBO apresentam emissão de fluorescência no estado sólido, uma característica associada ao mecanismo de emissão de fluorescência por ESIPT. Cabe ressaltar que na literatura encontram-se diversos trabalhos que descrevem aplicações de fluoróforos ESIPT em solução (meio líquido), no entanto, emissores no estado sólido inspirados no ESIPT foram pouco explorados até o momento [65].

Os espectros de emissão de fluorescência no estado sólido do HBO e HBT puros e acoplados nas SPION@SiO₂ de 30 e 60 nm estão apresentados nas Figuras 5.10 e 5.11. Tanto para o HBO quanto para o HBT, observou-se que os comprimentos de onda dos máximos de emissão permaneceram inalterados na presença das nanopartículas, estando estes localizados em 513 nm para o HBO e 552 nm para o HBT. Essas bandas estão associadas a emissão do tautômero ceto no mecanismo ESIPT (Figura 3.9). Não foi observada a emissão do tautômero enol. O espectro de emissão das SPIONS revestidas com sílica foram medidos e comparados com as nanopartículas fluorescentes para mostrar que não há emissão referente aos nanocompósitos sem a presença dos fluoróforos. Não houve supressão da fluorescência no estado sólido. Com relação a fluorescência do estado sólido, o acoplamento do HBO ([85], [12]) e HBT([13],[12]) apresentou resultados semelhantes aos encontrados nas respectivas referências.

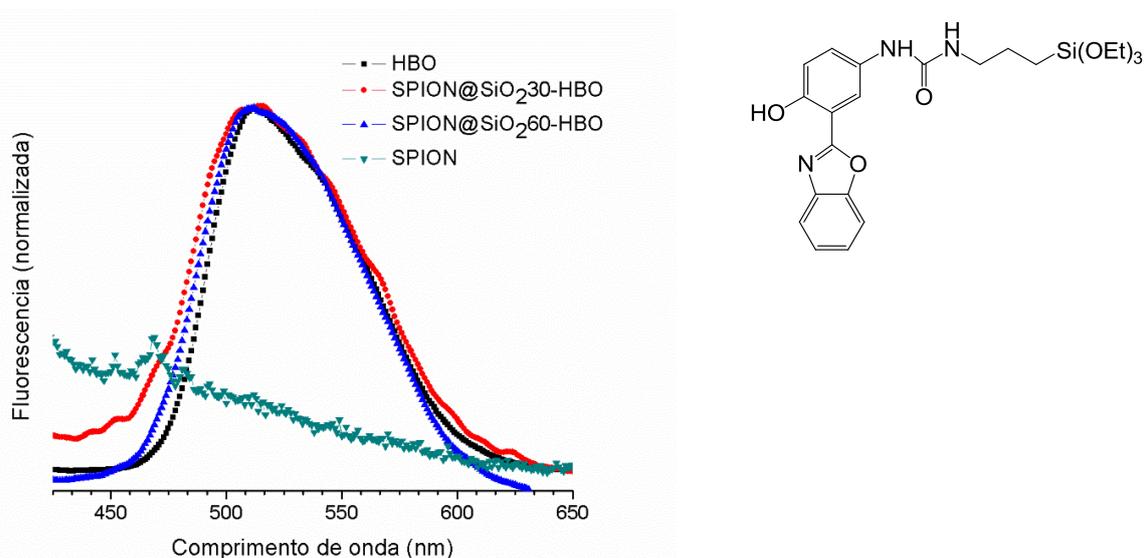


Figura 5.10. Espectros de emissão de fluorescência no estado sólido do HBO e das SPION@SiO₂ de 30 e 60 nm com o HBO acoplado. (λ excitação = 350 nm).

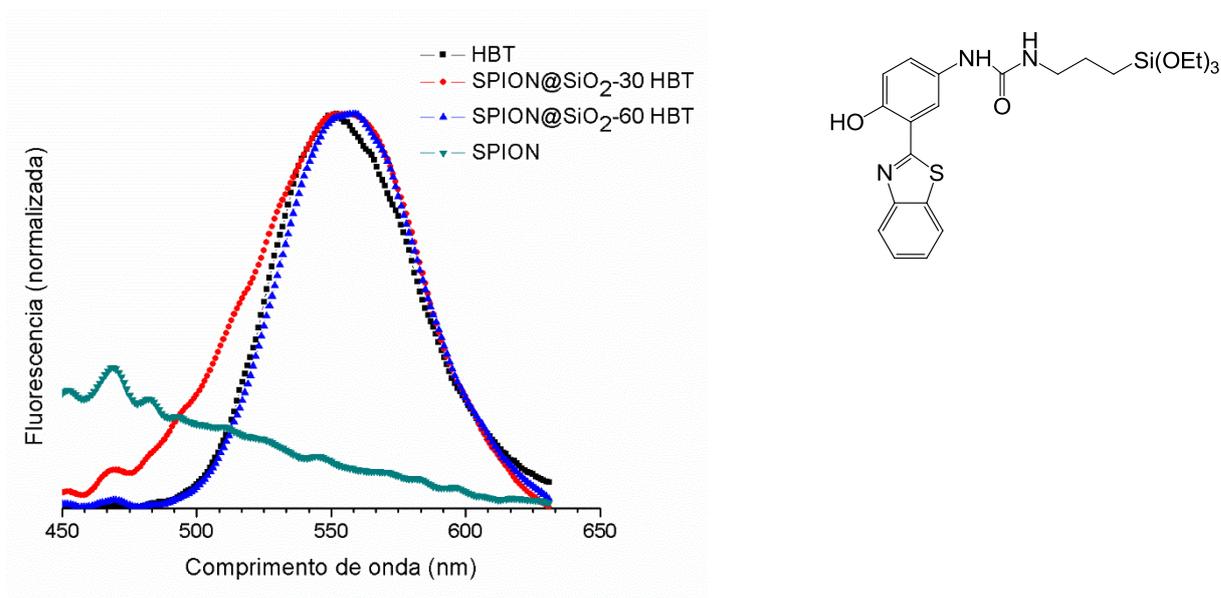
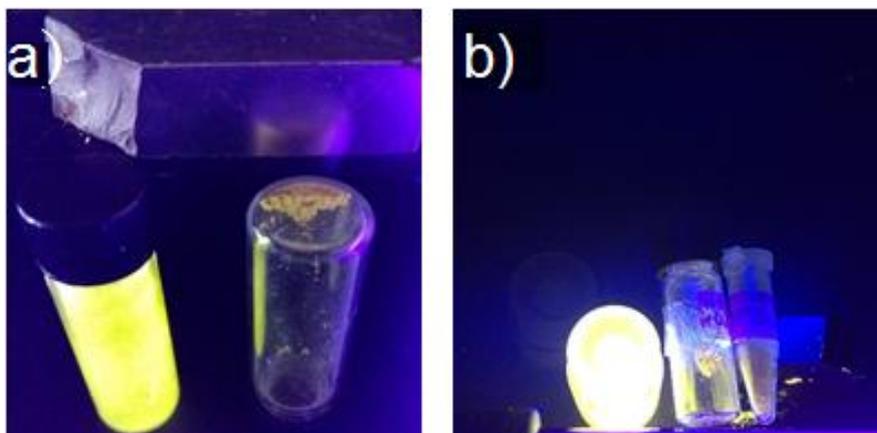


Figura 5.11. Espectros de emissão de fluorescência no estado sólido do HBT e das SPION@SiO₂ de 30 e 60 nm com o HBT acoplado. ($\lambda_{\text{excitação}} = 370 \text{ nm}$).

A fluorescência no estado sólido dos nanocompósitos pode ser vista também quando as amostras são iluminadas por uma lâmpada de luz UV de comprimento de onda igual a 365 nm (Figura 5.12). Em todas as imagens há presença de um imã demonstrando as propriedades magnéticas dos compósitos. Pode-se perceber que o pó permanece atraído pelo imã de neodímio evidenciando as propriedades magnéticas do material. Nas Figuras 5.12 (a e b) vê-se o HBT puro emitindo luz na região visível do laranja juntamente com as SPION@SiO₂-30-HBT e SPION@SiO₂-60- HBT, embora com intensidade menor. Já na Figura 5.12c, vê-se o caso do HBO livre e acoplado as NPs emitindo na região visível do amarelo.



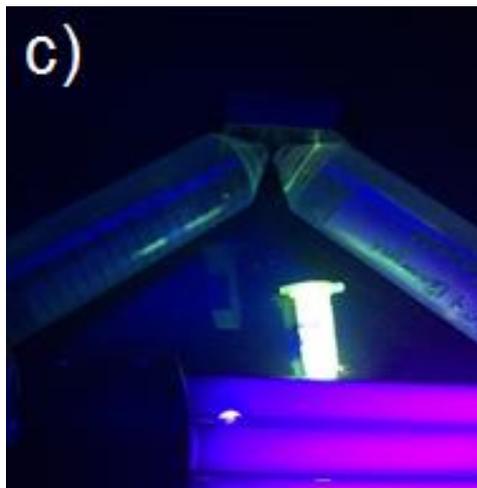


Figura 5.12. Imagem de amostras dos corantes livres e acoplados às NPs iluminadas com luz UV de 365 nm e na presença de um ímã de neodímio (a) HBT e SPION@SiO₂-60-HBT (b). HBT, SPION@SiO₂-60 - HBT e SPION@SiO₂- 30- HBT (c) HBO puro no *ependorf* e SPION@SiO₂-60-HBO e SPION@SiO₂-30- HBO.

Para a fluorescência no estado sólido não é possível afirmar, apenas com análises de emissão de fluorescência em espectrômetro e análise visual que ocorreu maior emissão de uma ou outra amostra. Para obtenção de dados com relação a maior ou menor intensidade de emissão de fluorescência é necessário comparar a eficiência quântica do material, no entanto, devido a complexidade de obtenção destes dados não foi possível a realização dessa análise durante o período da dissertação.

Com os resultados descritos até aqui foi possível concluir que os materiais sintetizados possuem ambas as propriedades: magnéticas e fluorescentes, possibilitando a sua aplicação como agentes de contraste para imageologia biomédica tanto em estudos *in vivo* quanto *in vitro*. Tendo em vista que para a utilização destes sistemas como agentes de contraste pressupõem-se que os mesmos terão que ser manipulados em suspensão, realizou-se adicionalmente estudo de fluorescência em dispersões líquidas descrito a seguir.

5.6.2. Fluorescência em solventes orgânicos

Com o objetivo de investigar de que forma os componentes presentes nas NPs podem influenciar na emissão dos fluoróforos HBO e HBT realizou-se um estudo em dois solventes diferentes. Para tanto, foram escolhidos dois solventes, um que favorecesse a emissão do tautômero ceto (diclorometano) e outro que favorecesse a emissão do tautômero enol (etanol). As soluções dos fluoróforos nestes dois solventes foram tituladas com as SPION com e sem a casca de sílica.

Na Figura 5.13, são apresentados os espectros de emissão dos fluoróforos HBO e HBT em função da concentração das SPION em um meio polar prótico (etanol). Foram adicionadas sucessivamente 12 alíquotas de 50 a 260 μL das SPION dispersas em etanol (em concentração de 0,105 g/L), para o HBO e 50- 240 μL para o HBT. A primeira curva de fluorescência em preto refere-se à solução dos fluoróforos puros e as demais curvas correspondem às adições sucessivas das SPIONs. Os comprimentos de onda utilizados para a excitação foram de 350 nm para o HBO e 370 nm para o HBT. O espectro do HBO em etanol mostra as duas bandas enol e ceto localizadas em 425 nm e 510 nm, respectivamente. Já para o HBT estas bandas são encontradas em 450 nm e 550 nm, conforme resultados semelhantes aos encontrados na literatura [12, 22, 85].

A adição das SPIONs nas soluções contendo os fluoróforos ocasionou uma supressão da fluorescência tanto da banda enol quanto da banda ceto, embora o decaimento da intensidade de fluorescência tenha sido mais pronunciado para o fluoróforo HBT. Sendo assim, as SPIONs podem ser consideradas como supressoras de emissão de fluorescência destes fluoróforos. Estudos semelhantes que citam a utilização de NPs de óxido de ferro como supressor de fluorescência utilizando diferentes fluoróforos [47, 13].

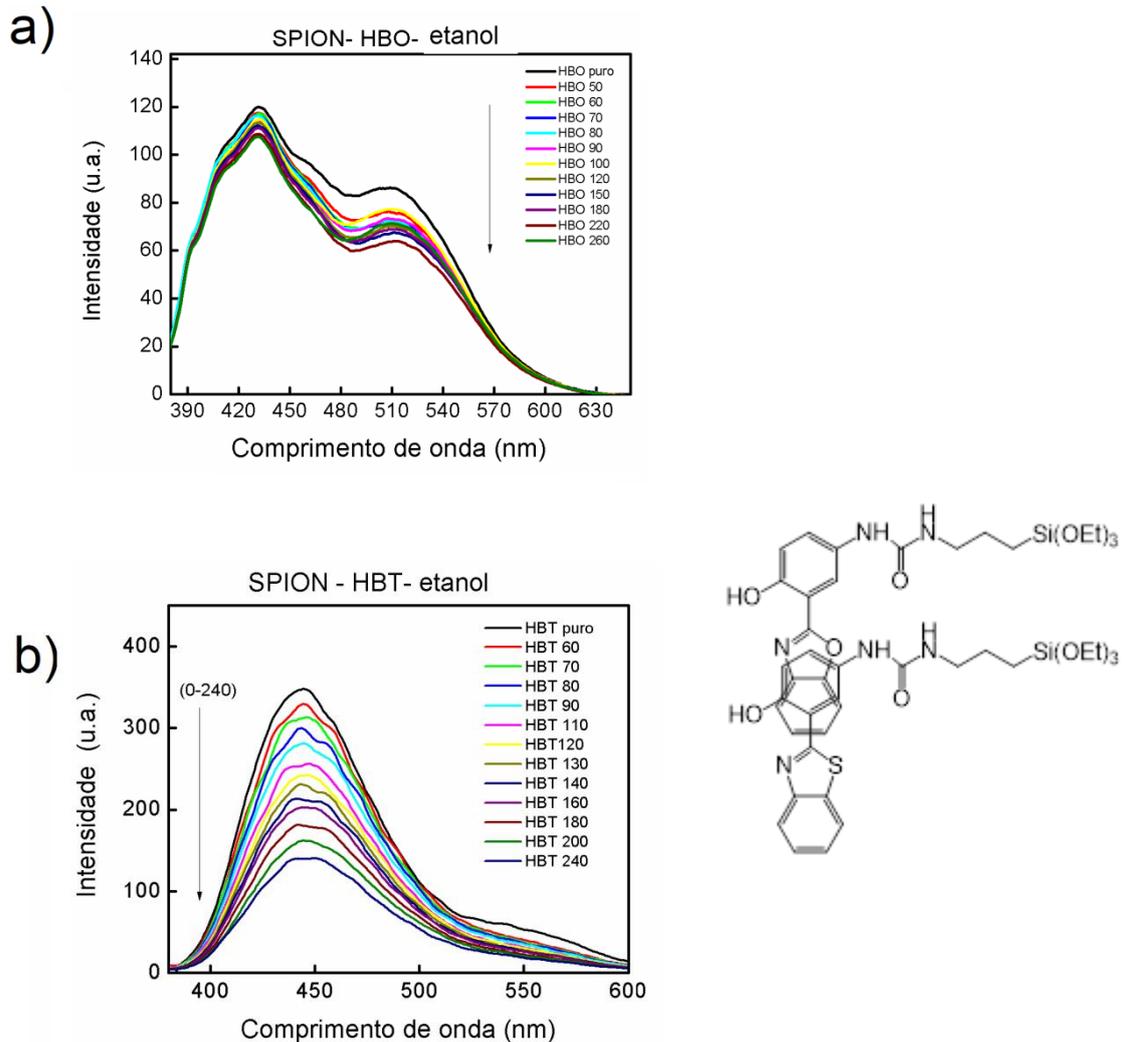


Figura 5.13. Espectros de emissão de fluorescência do a) HBO e b) HBT em etanol na presença das SPION sem a casca de sílica. A seta indica a variação da emissão com o aumento da concentração de SPION

A Figura 5.14 apresenta o resultado das titulações utilizando as SPION@SiO₂-30 e SPION@SiO₂-60 nm, adicionadas em alíquotas sucessivas nas soluções contendo os fluoróforos HBO e HBT em etanol. Observa-se ainda a supressão de fluorescência com o aumento da concentração de NPs. Para o HBT, contudo foi possível observar que a casca de sílica teve uma influência positiva na proteção contra a supressão da fluorescência, diminuindo a taxa de supressão em comparação com as SPION. É interessante notar nas SPION@SiO₂-60 nm que o aumento da casca de ~10 nm para ~15 nm melhora a proteção, apesar da já elevada separação núcleo /líquido nas partículas SPION@SiO₂-30.

Com relação ao HBO também houve a supressão de fluorescência de ambas as bandas enol e ceto com a adição de SPION@SiO₂- 30, porém, observou-se um comportamento diferente com a adição das nanopartículas de 60 nm de diâmetro. A banda correspondente ao tautômero ceto não foi afetada pela adição das nanopartículas, enquanto que na região da banda de emissão do tautômero enol houve o aparecimento de uma banda estruturada com três máximos de emissão. Adições sucessivas das SPION@SiO₂-60 provocaram um aumento na intensidade de emissão desta banda. **Este comportamento inesperado pode estar associado ao etanol, sendo que, dependendo da marca do álcool etílico o mesmo pode conter contaminantes e compostos fluorescentes.**

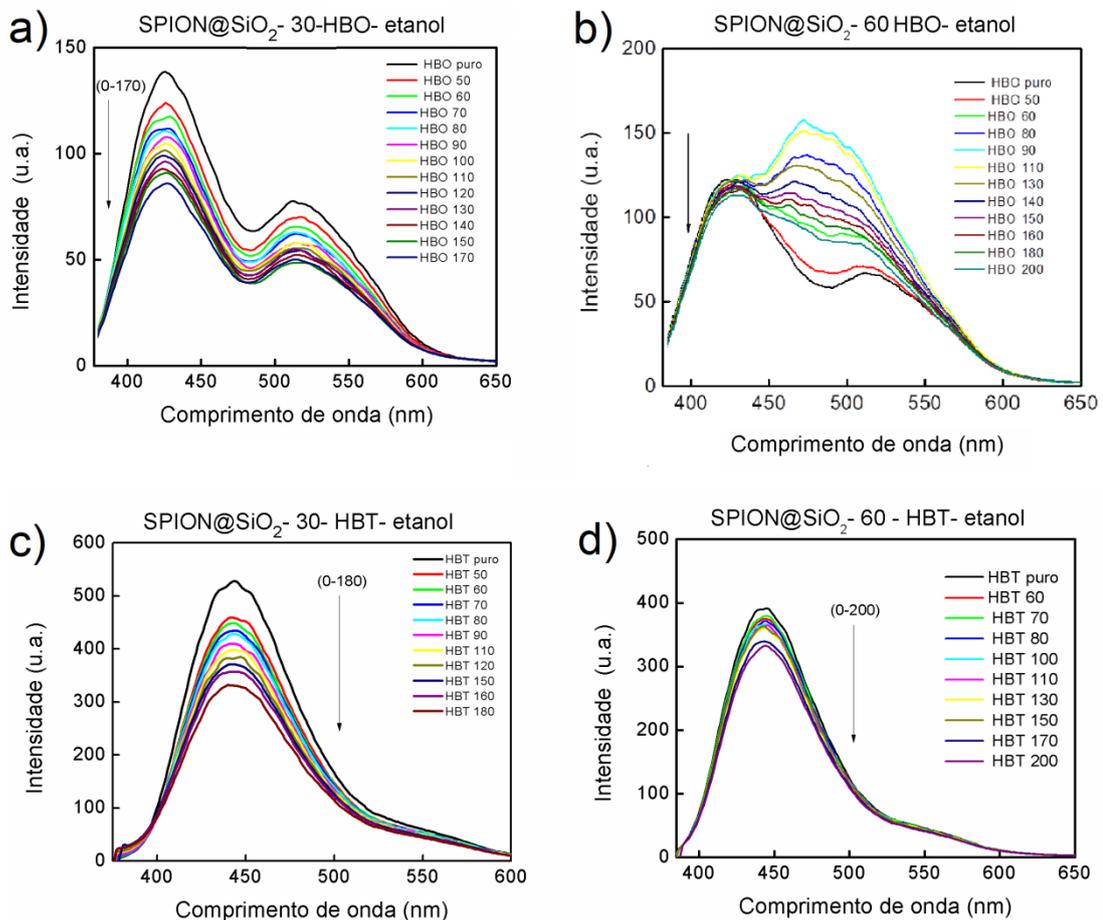


Figura 5.14. Espectros de emissão de fluorescência do (a- b) HBO e (c - d) HBT em etanol na presença das SPION revestidas com sílica nos tamanhos de 30 e 60 nm.

Na Figura 5.15 são apresentados os espectros de emissão dos fluoróforos HBO e HBT na presença de SPION em um meio polar aprótico (diclorometano). A

primeira curva de fluorescência em preto refere-se à solução dos fluoróforos puros. As demais curvas de 50-160 μL correspondem as adições sucessivas das SPION dispersas em etanol com concentração de 0,105 g/L. Os comprimentos de onda utilizados para a excitação foram de 350 nm para o HBO e 370 nm para o HBT. Para os dois fluoróforos verifica-se a presença majoritária da banda de emissão correspondente ao tautômero ceto, conforme resultados semelhantes aos encontrados na literatura [12, 22, 85].

Verificou-se que o HBO sofreu menos influência das SPIONs do que o HBT, uma vez que a supressão de fluorescência da banda ceto não foi muito pronunciada até a adição da alíquota de 120 μL . O HBT, além disso, não apresentou supressão de fluorescência da banda ceto em 550 nm, na região de emissão da banda enol verificou-se um efeito similar, mas muito mais pronunciado do aparecimento de uma banda estruturada com três máximos de emissão que cresce com o aumento da concentração de NPs (Figura 5.14).

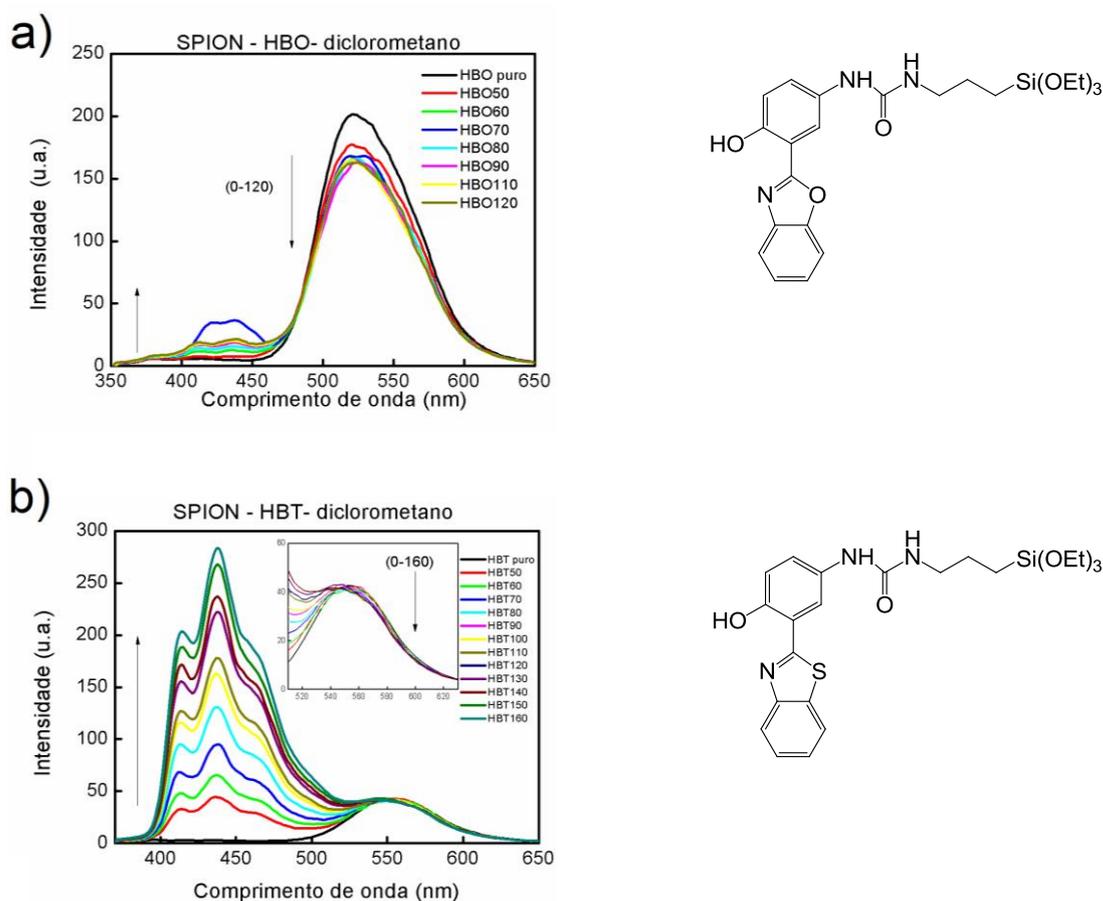


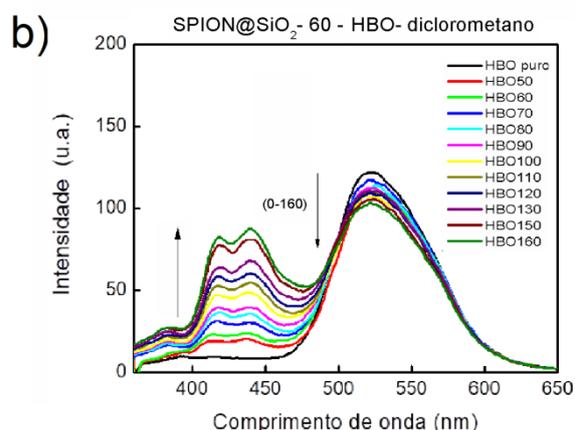
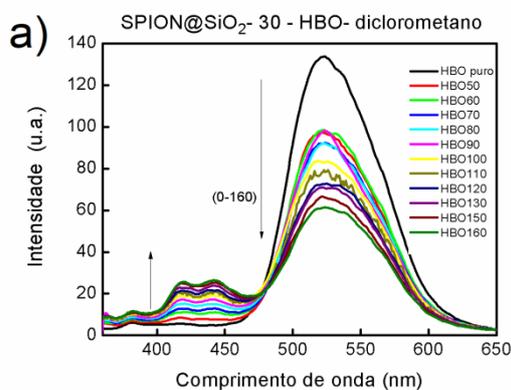
Figura 5.15. Espectros de emissão de fluorescência do a) HBO e b) HBT em diclorometano na

presença das SPION sem a casca de sílica.

A Figura 5.16 apresenta o resultado das titulações utilizando as SPION@SiO₂ nas soluções contendo os fluoróforos HBO e HBT em diclorometano. Para os dois fluoróforos, observou-se que tanto as nanopartículas de 30 nm como as de 60 nm provocaram alterações em ambas as intensidades das bandas de emissão (tautômero enol e ceto).

Para o HBO, as nanopartículas de 30 nm afetaram de forma mais significativa a banda de emissão do tautômero ceto quando comparado com as SPIONs sem a sílica (Figura 5.15) e as nanopartículas de 60 nm (Figura 5.16), mostrando a eficiência de supressão de fluorescência mais acentuada. Na região de emissão do tautômero enol, observou-se o aparecimento de uma banda estruturada de baixa intensidade, a qual mostrou-se mais intensa na presença das nanopartículas de 60 nm.

Assim como foi observado para o HBO, o HBT também mostrou uma banda estruturada localizada na região de emissão do tautômero enol entre 400 e 500 nm. Esta banda aumenta de intensidade com o aumento do tamanho da nanopartícula de 30 para 60 nm. As nanopartículas de 30 nm provocaram um decaimento da intensidade de fluorescência da banda de emissão do tautômero ceto mais acentuado do que as nanopartículas de 60 nm.



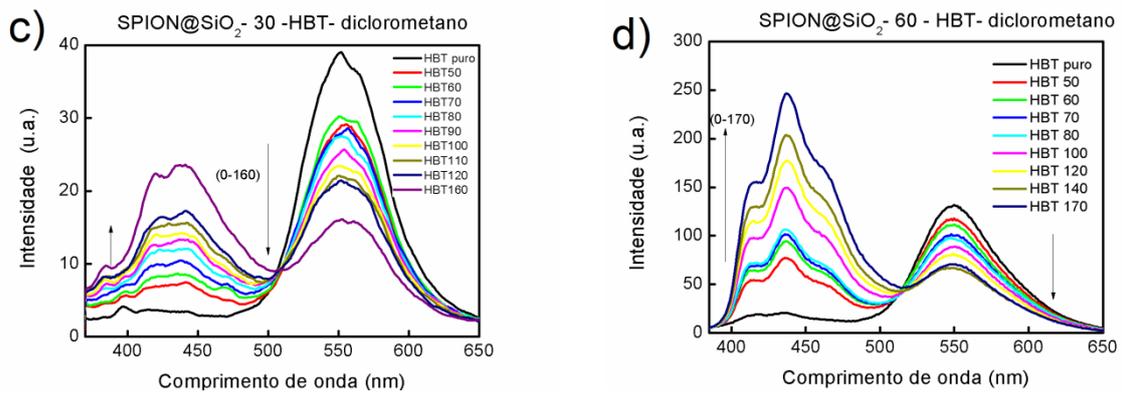


Figura 5.16. Espectros de emissão de fluorescência do (a-b) HBO e (c-d) HBT em diclorometano na presença das SPION sem a casca de sílica.

De uma forma geral, os espectros de emissão de fluorescência dos fluoróforos HBO e HBT mostraram um comportamento dependente da presença e espessura da casca de sílica. Os mecanismos através dos quais essa supressão acontece precisam ser melhor esclarecidos. O comportamento desses fluoróforos difere bastante quando eles se encontram no estado sólido e quando no estado líquido o que era esperado tendo em vista que em solução estas moléculas estão sujeitas aos equilíbrios existentes entre os diferentes confôrmeros possíveis (Figura 3.11).

Quanto ao tipo de mecanismo de supressão de fluorescência entre as SPION e os fluoróforos, há indícios de que ocorre a supressão dinâmica colisional, também observada em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa [13]. No entanto, para confirmar esta hipótese será necessário a realização de medidas adicionais envolvendo temperatura em trabalhos futuros.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como principais objetivos a síntese e investigação das propriedades magnéticas e fluorescentes de nanopartículas com estrutura *core-shell*, constituídas de um núcleo de óxido de ferro e uma casca de sílica funcionalizada com fluoróforos 2 - (2' -hidroxifenil) benzazóis.

Foram obtidas com sucesso NPs magnetofluorescentes tipo núcleo-casca. Com relação a avaliação do controle da espessura da casca de sílica obteve-se um melhor controle da espessura do revestimento quando a concentração utilizada do precursor TEOS foi de 3,18 e 3,58 mmols.

A SPION@SiO₂ foi obtida com tamanho de casca de sílica de ~10 nm e 16 nm, e o diâmetro total de ~ 30 a 60 nm. A natureza superparamagnética das NPs sintetizadas, foi confirmada pela ausência de magnetização residual e de histerese na curva de magnetização.

O acoplamento dos fluoróforos HBT e HBO às SPION@SiO₂-30 e SPION@SiO₂-60 foram comprovados por análise estrutural e físico-química. Os espectros de emissão no estado sólido e a exposição das NPs a lâmpada de luz UV e na presença de um ímã demonstraram a atividade dos fluoróforos acoplados e as propriedades magnéticas dos compósitos sintetizados. Foram obtidas NPs que exibem deslocamentos de Stokes > 150 nm, o que demonstra o uso potencial desse material para ser utilizado como sonda de sensoriamento ou imageamento *in vivo* e *in vitro*.

A influência da espessura da casca de sílica foi notada na supressão de fluorescência. Pode-se dizer a maior espessura da casca resultou na menor supressão de fluorescência, no entanto não alterou a magnetização do material.

Com base nisso pode-se afirmar que é possível ajustar as propriedades fluorescentes em um material multimodal.

Quando em dispersões líquidas, observou-se uma dupla emissão de fluorescência pela aparição de duas bandas distintas, características do mecanismo de fluorescência ES IPT. A primeira banda foi relacionada à emissão enol, caracterizada pelo deslocamento de comprimento de onda para a faixa para o azul, e a segunda relacionada à emissão ceto, para comprimentos de onda maior (amarelo).

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base no apresentado neste trabalho, propõe-se realizar alguns estudos adicionais, os quais não foram finalizados no período desta dissertação, entre eles destacamos: investigação dos mecanismos de supressão de fluorescência (colisional ou dinâmico), através da exposição das SPION e SPION@SiO₂-30 e SPION@SiO₂-60 aos fluoróforos HBT e HBO, em testes que visam a variação da temperatura e do tempo, como *Steady-State* e resolução temporal.

Com o objetivo de ampliar a abrangência do trabalho, poderia-se testar a influência da SPION e da espessura da casca de sílica utilizando o fluoróforo 2 - [5' - N - (3 - triethoxisilil) propilureia - 2' - hidroxifenil] benzimidazol (HBNH) ancorado às SPION@SiO₂-30 e SPION@SiO₂-60. Visto que na literatura não tem trabalhos que comparem a utilização dos três fluoróforos pertencentes a família dos benzazóis, a realização de um estudo que apresente esses dados seria muito interessante. Também seria pertinente estudar a influência de outro sistema de NP nas propriedades fotofísicas dos benzazóis, por exemplo, o ouro são alternativas interessantes para serem utilizados com fluoróforos que apresentam fluorescência por ESIPT.

8. REFERÊNCIAS

- [1] Sun, C., et alli. In vivo MRI detection of gliomas by chlorotoxin-conjugated superparamagnetic nanoprobcs. **Small**, Vol. 4, pp. 372-379, 2008.
- [2] Wu, W; He Q.; Jiang, C. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles : Synthesis and Surface Functionalization Strategies. **Nanoscale Res. Let.**, Vol. 3, pp. 397-415, 2008.
- [3] Laurent, S. et alli. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. **Chem. Rev.**, Vol. 108, p. 2064–211, 2008.
- [4] Mahdavi, M.; Ahmad, M.B.; Haron M. J. et alli. Synthesis, Surface Modification and Characterisation of Biocompatible Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. **Molecules**, Vol. 16, pp. 7533 - 7548, 2013.
- [5] Gosling, J. P. A Decade of Development in Immunoassay Methodology. **Clin. Chem**, Vol. 36, p. 1408, 1990.
- [6] Reguera, J. et alli. *Janus plasmonic–magnetic gold–iron oxide nanoparticles as contrast agents for multimodal imaging.* **Nanoscale**, Vol. 9, p. 9, 2017.
- [7] Santra, S., et alli. Drug/Dye-Loaded, Multifunctional Iron Oxide Nanoparticles for Combined Targeted Cancer Therapy and Dual Optical/Magnetic Resonance Imaging. **Small**. 16, Vol. 5, pp. 1852-1868, 2009.
- [8] Pinheiro, P. C., et alli. Fluorescent Magnetic Bioprobes by Surface Modification of Magnetite Nanoparticles. **Materials**, Vol. 6, pp. 3213-3225, 2013.
- [9] Campo, L. F. **Síntese de materiais fotossensíveis baseados em corantes fluorescentes como meio ativo para dispositivos ópticos.** *Tese de Doutorado.* Porto alegre , Brasil: UFRGS, p. 202, 2003.

- [10] Cohen, B. et alli. Femtosecond Fluorescence Dynamics of a Proton-Transfer Dye Interacting with Silica-Based Nanomaterials . **J. Phys. Chem. C**, Vol. 114, pp. 6281–6289, 2010.
- [11] Demchenko, A. P. Nanoparticles and nanocomposites for fluorescence sensing and imaging. **Methods Appl. Fluoresc**, Vol. 1, pp. 28, 2013.
- [12] Campo, L.F. et alli. Spectral properties of amorphous silica (SiO₂) and mesoporous structured silicates (MCM-41 and ITQ-6) functionalized with ES IPT chromophores. **J. Photoch. Photobio. A**. Vol. 178, pp. 26–32, 2006.
- [13] Oliveira, E. M. N., et alli. Iron Oxide Nanoparticles Labeled with an Excited-State Intramolecular Proton Transfer Dye. **Chem. Phys. Chem.**, v.17, p. 3176 –3180, 2016.
- [14] Cabral Filho, P. E. Sondas multimodais fluorescente-magnéticas para marcação do receptor de transferrina em células cancerígenas. *Anais: encontro anual da biofísica*, 2017.
- [15] Ortega, N. ; Kumar, A.; Scott, J. F. ; Katiyar, R. S. Multifunctional magnetoelectric materials for device applications. **J. Phys.: Condens. Matter**, Vol. 27, p. 23, 2015.
- [16] Corr, S. A.; Rakovich, Y. P.; Gun'ko, Y. K. Multifunctional magnetic-fluorescent nanocomposites for biomedical applications. **Nanoscale Res. Lett.**, Vol. 3, pp. 87–104, 2008.
- [17] Yee, C., et alli. Self-Assembled Monolayers of Alkanesulfonic and -phosphonic Acids on Amorphous Iron Oxide Nanoparticles. **Langmuir.**, Vol. 15, p. 7111-7115, 1999.
- [18] Cornell, M. R.; Schwertmann, U. **The oxides-structure, properties, reaction, occurrences and uses materials**. Freising: Wiley-VHC, p. 544, 2009.
- [19] Frey, N. A., et alli. Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage. **Royal Chem. Soc.**, Vol. 38, pp. 2532-2542, 2009.
- [20] Figuerola, A., et alli. From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. **Pharmacol. Res.**, Vol. 62, pp. 126-143, 2010.

- [21] Schladt, T., et alli. Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment. ***Dalton T.*** Vol. 40, pp. 6315-6343, 2011.
- [22] Azcárate, J. C., et alli. ESIPT and FRET probes for monitoring nanoparticle polymer coating stability. ***Nanoscale.*** Vol. 9, pp. 8647-8656, 2017.
- [23] Zhou, W.; Coleman, J.J. Semiconductor quantum dots. ***Curr. Opin. Solid. ST. M.*** Vol. 20, pp. 352–360, 2016.
- [24] Al-Kady, A.S. et alli. Structural and fluorescence quenching characterization of hematite nanoparticles. ***Spectrochim. Acta A.***, Vol. 83, pp. 398-405, 2011.
- [25] Pinho, S. L. C., et alli. Fine Tuning of the Relaxometry of γ -Fe₂O₃@SiO₂ Nanoparticles by Tweaking the Silica Coating Thickness. ***ACS Nano.***, Vol. 4, pp. 5339–5349, 2010.
- [26] Sharifia, S., et alli. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for in vivo molecular and cellular imaging. ***Cont. Med. Mol. Imag.***, Vol. 10, pp. 329–355, 2015.
- [27] Mochalin, V. N., et alli. The properties and applications of nanodiamonds. ***Nat. Nanotechnol.***, Vol. 7, pp. 11–23, 2012.
- [28] Tarkka, R. M.; Zhang, Z. e Jenekhe, S. A. Electrically generated intramolecular proton transfer: electroluminescence and stimulated emission from polymers . ***Am. Chem. Soc.***, Vol. 19 , pp. 1-12, 1996.
- [29] Behzadi, S. et alli. *Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell.* ***Chem. Soc. Rev.***, Vol. 46, pp. 4218-4244, 2017.
- [30] Lee et alli. Preparation of Silica Coated Magnetic Nanoparticles for Bioseparation. ***J. Nanosci. Nanotechnol.*** Vol. 18, pp. 1533-4880, 2018.
- [31] CHEN, Z. P., et alli. Preparation and characterization of water soluble monodisperse magnetic iron oxide nanoparticles via surface double-exchange with DMSA. ***Colloid surface***, Vol. 316, pp. 210-216, 2008.

- [32] Pan, Y.; et alli. Fluorescent-magnetic nanocomposites grafted with mannose derivatives: preparation, characterization, and bioapplication. **J. Nanopart. Res**, Vol. 16, p. 1819, 2014.
- [33] Lee, N., et al. Iron Oxide Based Nanoparticles for Multimodal Imaging and Magnetoresponse Therapy . **Chem. Rev.**, Vol. 115, pp. 10637–10689, 2015.
- [34] Yen, S. K.; Padmanabhan, P.; Selvan, S. T. Multifunctional Iron Oxide Nanoparticles for Diagnostics, Therapy and Macromolecule Delivery. **Theranostics**, Vol. 3, 12, pp. 986-1003, 2013.
- [35] Hong, R. Y., et alli. Preparation and characterization of magnetite/dextran nanocomposite used as a precursor of magnetic fluid. **Chem. Eng. J.**, Vol. 150, pp. 572-580, 2009.
- [36] Rahman, I.A., et alli. An optimized sol–gel synthesis of stable primary equivalent silica particles. **Colloid. Surface A**, Vol. 294, pp. 102–110, 2007.
- [37] Mohammad-Samani, MIRI, R., et alli. Preparation and assessment of chitosan-coated superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for controlled delivery of methotrexate. **Res. Pharm.**, Vol. 8, pp. 25–33, 2013.
- [38] Bridot, J. L. et alli. New carboxysilane-coated iron oxide nanoparticles for nonspecific cell labelling. **Contrast Media Mol. I.**, Vol. 8, pp. 466–474, 2013.
- [39] Pimenta, A. R. L. **Nanopartículas Magnéticas para Nanomedicina**. *Dissertação de mestrado*. Lisboa : Universidade técnica de Lisboa, 2010.
- [40] Garcia, M. T. C., et alli. The competing effect of ammonia in the synthesis of iron oxide/silica nanoparticles in microemulsion/sol–gel system. **Colloid. Surface. A**, Vol. 422, pp. 136–142, 2013.
- [41] Stober, W.; Fink, A. J. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. **Coll. Interf. Sci.**, Vol. 26, pp. 62-69, 1968.
- [42] Deng, Y. H., et alli. Investigation of formation of silica-coated magnetite nanoparticles via sol–gel approach. **Colloid. Surface. A.**, Vol. 262, pp. 87–93, 2005.

- [43] Digigow, R. G., et alli. Preparation and characterization of functional silica hybrid magnetic nanoparticles. **J Magn. Magn. Mater.**, Vol. 362, pp. 72–79, 2014.
- [44] Stanick, I D., et alli. Carboxy-silane coated iron oxide nanoparticles: a convenient platform for cellular and small animal imaging. **J. Mater Chem. B.**, Vol. 2, p. 387, 2014.
- [45] Chekina, N., et alli. Fluorescent magnetic nanoparticles for biomedical applications. **J. Mater. Chem.**, Vol. v. 21, p. 7630, 2011.
- [46] Yoon, T. J. et alli. Specific targeting, cell sorting and bioimaging with smart magnetic silica core–shell nanomaterials. **Small.**, Vol. 2, pp. 209–215, 2006.
- [47] Jang, E. S. et alli. Fluorescent Dye Labeled Iron Oxide/Silica Core/Shell Nanoparticle. **Pharm. Res.** Vol. 31, pp. 3371–3378, 2014.
- [48] Rodembusch, F. S., et alli. The first silica aerogels fluorescent by excited state intramolecular proton transfer mechanism (ESIPT). **J. Mater. Chem.**, Vol. 15, pp. 1537-1541, 2005.
- [49] Sotomayor, Maria D. P. T. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Quim. Nova.**, Vol. 31, 7, pp. 1755-1774, 2008.
- [50] Valeur, B.; Santos, M. N. B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**. 2ª ed. Paris : s.n., p. 671, 2011.
- [51] **Sauer, M.; Hofkens, J. ; Enderlein, J.** *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging*. s.l. : Wiley-VCH, 2011. Vol. 1st ed.
- [52] Kuplich, M. D. **Síntese de novos heterocíclis benzazólicos fluorescentes e sua incorporação em matrizes de celulose**. *Dissertação (Mestrado em química). Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre, Brasil : s.n., p. 124, 2007.
- [53] **Lakowicz, J. R.** *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd. s.l. : Springer, p. 954, 2006.

- [54] Zhao, J. et alli. Excited state intramolecular proton transfer (ESIPT): from principal Intramolecular Proton Transfer Dye. **Chem. Phys. Chem.**, Vol. 17, pp. 3176 – 3180, 2016.
- [55] Kim, C. H.; Park J.; J. Seo; Joo., S. Y. Park and T. Excited State Intramolecular Proton Transfer and Charge Transfer Dynamics of a 2-(2'-Hydroxyphenyl)benzoxazole Derivative in Solution. **J. Phys. Chem. A.**, Vol. 114, pp. 5618–5629, 2010.
- [56] **Grando, S.**, et alli. Modulation of the ESIPT Emission of Benzothiazole Type Dye Incorporated in Silica-Based Hybrid Materials. **Langmuir**. Vol. 25, pp. 13219–13223, 2009.
- [57] Santos, F. S., Ramasamy, E., Ramamurthy, V., & Rodembusch, F. S. Confinement effect on the photophysics of ESIPT fluorophores. **J. Mater. Chem.**, C. 14, Vol. 4, pp. 2820-2827, 2016.
- [58] Yadav, P. S. et alli. Benzothiazole: Different Methods of Synthesis and Diverse Biological Activities. **I.J.P.S.D.R.**, Vol. 3, pp. 01-07, 2011.
- [59] Kumar V.; Sharma S.; Husain A. Synthesis and in vivo Anti-inflammatory and Analgesic activities of Oxadiazoles clubbed with Benzothiazole nucleus. **International Current Pharmaceutical Journal**, Vol. 4, 2015.
- [60] Coelho, F. L., et alli. Lipophilic dyes. Partition experiments with different composed liposomes. **Dyes Pigments**, Vol. 110, pp. 134 - 142, 2014.
- [61] Keri, R.S., et alli. A comprehensive review in current developments of benzothiazole based molecules in medicinal chemistry. **Eur. J. Med. Chem.**, Vol. 89, pp. 207-251, 2015.
- [62] Dick, P. F. et alli. Amphiphilic ESIPT benzoxazole derivatives as prospective fluorescent membrane. **Tetrahedron Lett.**, Vol. 55, pp. 3024–3029, 2014.
- [63] Weller, A. Fast reactions of excited molecules. **Prog. React. Kinet. Mech.**, Vol. 1, pp. 187–214, 1961.
- [64] Yang, et alli. Theoretical Study of the ESIPT Process for a New Natural Product Quercetin. **Sci. Rep.-UK**, Vol. 6, 2016.

- [65] Padalkar, V. S.; et alli. AIE active triphenylamine benzothiazole based motifs: ESIPT or ICT emission. **Chem. Soc. Rev.**, Vol. 45, pp. 169-202, 2016.
- [66] Wu, X.; Wu, M. X.; Zhao J. Recent development of silica nanoparticles as delivery vectors for cancer imaging and therapy. **Nanomed. Nanotechnol.**, Vol. 10, pp. 297–312, 2015.
- [67] Forge, D., et alli. Optimization of the Synthesis of Superparamagnetic Contrast Agents by the Design of Experiments Method. **J. Phys. Chem.**, Vol. 112, pp. 112, 19178–19185, 2008.
- [68] Wunderbaldinger, P.; Josephson, L.; Weissleder, R. Crosslinked iron oxides (CLIO): a new platform for the development of target MR contrast agents. **Acad. Radiol**, Vol. 9, pp. S304-S306, 2002.
- [69] Chen, F. A sub-50-nm monosized superparamagnetic Fe₃O₄@SiO₂ T₂-weighted MRI contrast agent: highly reproducible synthesis of uniform single-loaded core-shell nanostructures. **Chem. Asian J.**, Vol. 4, pp. 1809 – 1816, 2009.
- [70] Oliveira, E. M. N. **Agentes de contraste nanoestruturados a base de óxido de ferro: síntese, caracterização e avaliação toxicológica.** Tese. Porto Alegre : PUCRS, 2018.
- [71] Forge, D. et alli. Optimization of the Synthesis of Superparamagnetic Contrast Agents by the Design of Experiments Method. **J. Phys. Chem. C.**, Vol. 112, pp. 19178-19185, 2008.
- [72] Kango, S. et alli. Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic–inorganic nanocomposites—A review. **Prog. Polym. Sci.**, Vol. 38, pp. 1232– 1261, 2013.
- [73] Attallah, O. A., et alli. Computer-aided design of magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for solid-phase extraction and determination of levetiracetam in human plasma. **RSC. Adv.**, Vol. 8, p. 14280, 2018.
- [74] Ding, H. L. et alli. Fe₃O₄@SiO₂ Core/Shell Nanoparticles: The Silica Coating Regulations with a Single Core for Different Core Sizes and Shell Thicknesses. **Chem. Mater.**, Vol. 24, p. 4572–4580, 2012.
- [75] **Chem., Compound.** *Analytical Chemistry – Infrared (IR) Spectroscopy.* [graphic] : Compound Interest, 2015.

- [76] Mohammad-Beigi, H. et alii. 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. *Physica E*, Vol. 44, pp. 618–627, 2011.
- [77] Xiao-Chen, Y.; Shang, Y. L.; Yin-Hua L. Synthesis of Monodisperse Iron Oxide Nanoparticles without Surfactants. *J. Nanomater.*, Vol. 2014, p. 5, 2014.
- [78] Wang, S., et alii. Synthesis of magnetite–silica core–shell nanoparticles via direct silicon oxidation. *J. Colloid. Interf. Sci.*, Vol. 432, pp. 43-46, 2014.
- [79] Xu, C. et alii. Dopamine as A Robust Anchor to Immobilize Functional Molecules on the Iron Oxide Shell of Magnetic Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 126, pp. 9938-9939, 2004.
- [80] Maldonado, C. L., et alii. Magnetic Characterization of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. *Biomedical Nanotechnology: Methods and Protocols*, Vol. 1570, pp. 47-71, 2017.
- [81] Holler, M. G., et alii. Synthesis and spectroscopic characterization of 2-(2'-hydroxyphenyl)benzazole isothiocyanates as new fluorescent probes for proteins. *J. Photochem. Photobio. A: Chem.*, Vol. 149, pp. 217–225, 2002.
- [82] Kober, U.A. et alii. Fluorescence behavior of powders and high-pressure compacts of silica containing benzazole silyl-functionalized dyes. *Journal of Photochem. . Photobio. A: Chem.*, Vol. 186, pp. 24–28, 2006.
- [83] Qiao, R.; Yang, C.; Gao, M. *Journal of Materials Chemistry: v. , p. , .* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications. *J. Mater. Chem.*, Vol. 19, pp. 6274-6293, 2009.
- [84] Mahmoudi, M., et alii. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. *Adv. drug deliver. rev.*, Vol. 63, pp. 24-46, 2011.
- [85] Prajapati, et alii. Recent advances in the synthesis of 2-substituted benzothiazoles: a review. *RSC Adv*, Vol. 4, pp. 60176–60208, 2014.

- [86] Achaiah et alli, IJPSR, 1375-1382. Review on 2-Substituted benzothiazoles: diversity of synthetic methods and biological activities. *Inter. Jour. Pharma. Sci. and Res.*, Vol. 7(4), 2016.
- [87] **Dahls, Jeff.** Description, Mechanisms of quenching of fluorescent probes. <<https://photochemistry.wordpress.com/2009/10/30/quenching-mechanisms/>>. [Online] [Citado em: 20 de 08 de 2017].
- [88] LU, A.-H., Salabas, E. L. e Schueth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chem.*, Vol. 46, p. 1222–1244, 2007.
- [89] Hachani, et alli. Polyol synthesis, functionalisation, and biocompatibility studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles as potential MRI contrast agents. *Nanoscale*, Vol. 8(6), pp. 3278-87, 2016.
- [90] Nishina, N.; Mutai, T.; Aihara, J. Excited-State Intramolecular Proton Transfer and Global Aromaticity. *J. Phys. Chem. A*, Vol. 121, p. 151–161, 2017.
- [91] Bi X., Liu B., et alli. Excited-State Intramolecular Proton Transfer (ESIPT) of Fluorescent Flavonoid Dyes: A Close Look by Low Temperature Fluorescence. *J. Phys. Chem. B*, Vol. 121, p. 4981–4986, 2017.
- [92] Yang, D. et alli. Theoretical investigation on ESIPT mechanism of a new fluorescent sensor in different solvents. *Spectrochim. Acta . A*, Vol. 159, pp. 30–34, 2016.
- [93] **Callister JR., William D.** *Ciência e Engenharia dos Materiais: Uma Introdução*. 1a ed. Rio de Janeiro : LTC, 2002. p. 620 .
- [94] Gürses, A., et al. Dyes and Pigments: Their Structure and Properties. *Singer*, Vol. 1st ed., pp. 13-28, 2016.
- [95] Alivisatos, A. P.; GU, W.; Larabell, C. Quantum dots as cellular probes. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, Vol. 7, pp. 55–76, 2005.
- [96] Domingues, N. S., et alli. Computational study of the excited states of 2,5-bis(benzoxazol-29-yl)-hydroquinone and its monomethoxy derivative. *J. Chem. Soc.*, Vol. 2, pp. 1861-1865, 1997.

- [97] Mathis, C. A., et alli. Synthesis and evaluation of ¹¹C-labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents. **J. Med. Chem.** Vol. 46, pp. 2740-2754, 2003.
- [98] Debroye, E. e Parac-Vogt, N. P. N. Towards polymetallic lanthanide complexes as dual contrast agents for magnetic resonance and optical imaging. **Chem. Soc. Rev.** Vol. 43, p. 8178, 2014.
- [99] Gill, R. K. et alli. Recent Advances in the Chemistry and Biology of Benzothiazoles. **Arch. Pharm. Chem. Life Sci.** Vol. 348, pp. 155–178, 2015.
- [100] Mariappan, G. et alli. Synthesis and Antidiabetic Evaluation of Benzothiazole Derivatives. **J. Korean Chem. Soc.** Vol. 56, pp. 251-256, 2012.
- [101] Jarzyna, P. A., et alli. Multifunctional imaging Nanoprobes. **Nanomed. Nanobiotec.**, Vol. 2, pp. 138-150, 2010.
- [102] Lu, Y., et al. Modifying the Surface Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles through A Sol-Gel. **Nano Lett.**, Vol. 2, 2002.
- [103] Kim, et alli. Surface treatment of silica nanoparticles for stable and charge-controlled colloidal silica. **Internat. J. of Nanomed.**, Vol. 9, pp. 29–40, 2014.
- [104] Mahadevan S., et al. X-ray diffraction-based characterization of magnetite nanoparticles in presence of goethite and correlation with magnetic properties. **Physica E.**, v. 39, pp. 20–25, 2007.
- [105] Carcouët, C. M. C. et alli. Nucleation and Growth of Monodisperse Silica Nanoparticles. **Nano Lett.** 2014, Vol. v.14, p. p.1433–1438

9. ANEXOS

Neste capítulo serão demonstrados os espectros de absorção dos compostos sintetizados, todos os espectros foram obtidos em condições iguais aos espectros de fluorescência relatados nessa dissertação.

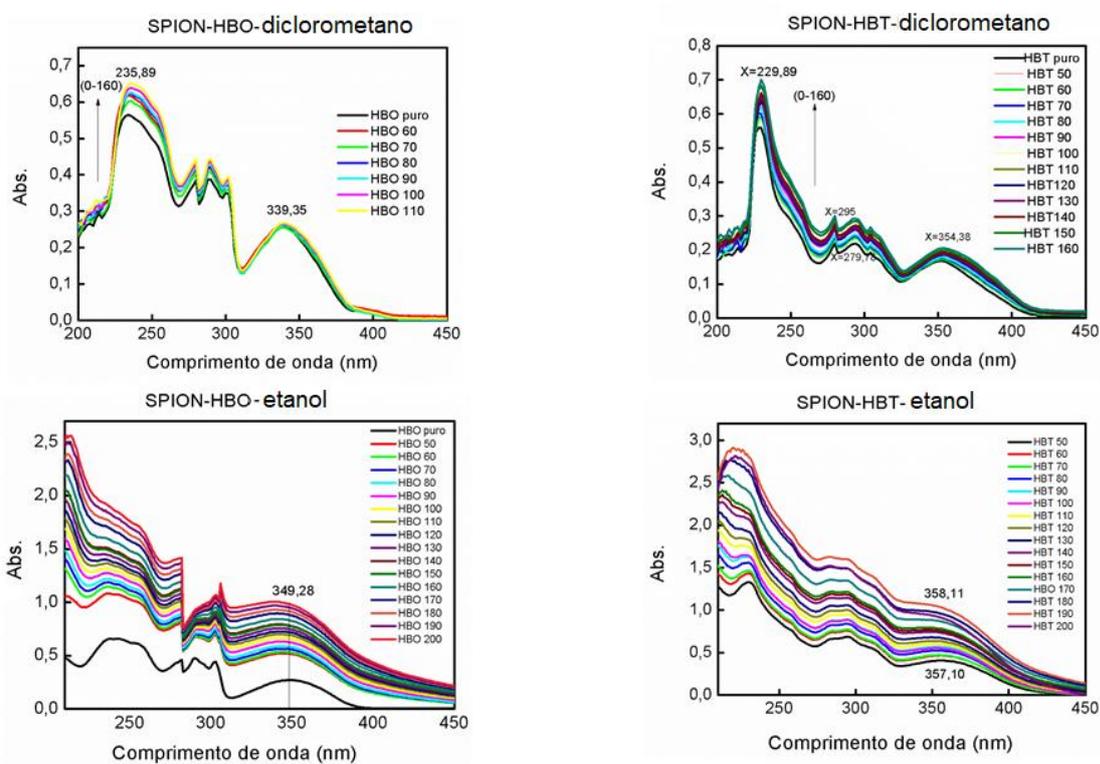


Figura 9.14. Espectros de absorção de fluorescência do HBO e HBT em etanol na presença das SPION sem a casca de sílica. A seta indica a variação da emissão com o aumento da concentração de SPION, números em cima dos picos indicam o λ máx. de absorção.

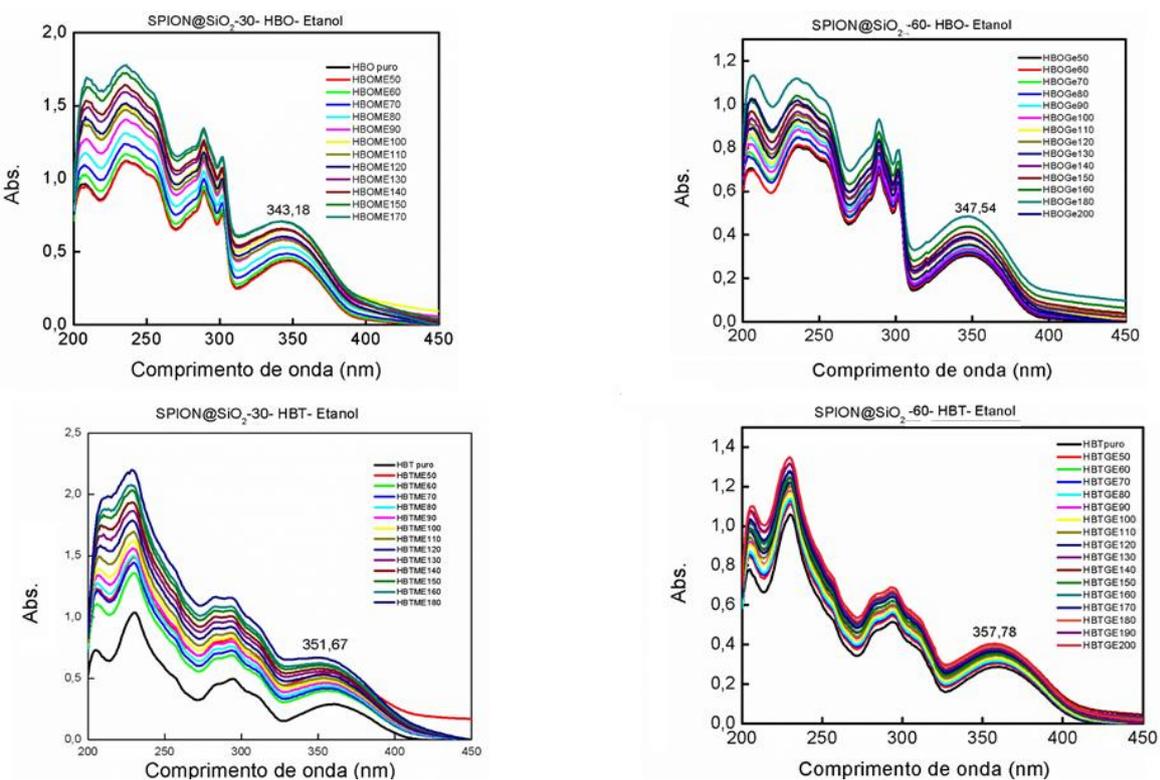


Figura 9.15. Espectros de absorção de fluorescência do HBO e HBT em etanol na presença das SPION@SiO₂-30 e SPION@SiO₂-60 sem a casca de sílica. A seta indica a variação da emissão com o aumento da concentração de SPION, números em cima dos picos indicam o λ máx. de absorção.

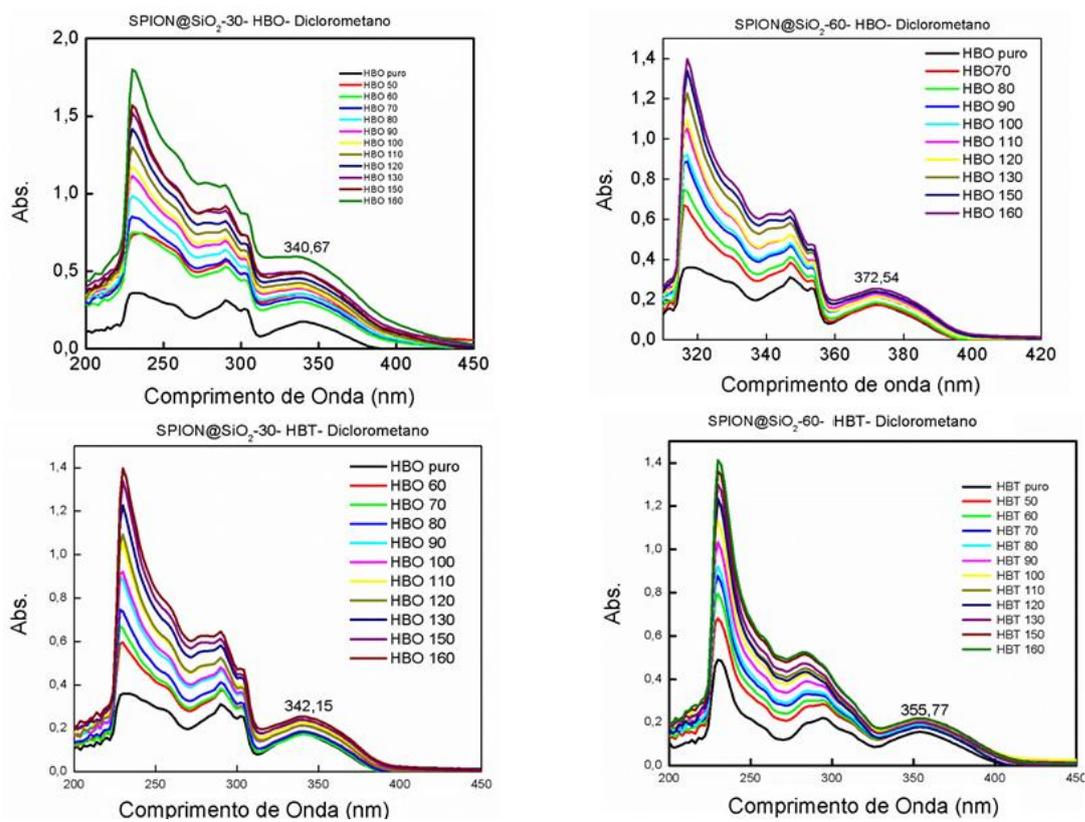


Figura 9.15. Espectros de absorção de fluorescência do HBO e HBT em diclorometano na presença das SPION@SiO₂-30 e SPION@SiO₂-60 sem a casca de sílica. A seta indica a variação da emissão com o aumento da concentração de SPION, números em cima dos picos indicam o λ máx. de absorção.



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