

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**NANOCOMPÓSITOS BIOPOLIMÉRICOS COM
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE FERRO OBTIDOS POR
AUTOMONTAGEM**

ANTONIA REGINA CLAVIJO DE SOUZA

Brasília, 16 de agosto de 2016

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**NANOCOMPÓSITOS BIOPOLIMÉRICOS DE
NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE FERRO OBTIDOS POR
AUTOMONTAGEM**

ANTONIA REGINA CLAVIJO DE SOUZA

ORIENTADORA:

Professora MARIA APARECIDA GODOY SOLER

Brasília, 16 de agosto de 2016

*Aos meus queridos pais, Daisy e
Lucas, e incríveis irmãos, José e Bárbara, as
pessoas que eu mais amo nessa vida.*

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por cada amanhecer e anoitecer em seu imensurável amor.

Aos meus pais, Daisy e Lucas, por me ensinarem o que é o amor, o respeito e o carinho e que a curiosidade é uma virtude. Pela sua imensa confiança em mim e apoio nesta jornada. Palavras não descrevem o quanto os amo.

Em especial à minha mãe, por ser mais que uma mãe, uma verdadeira amiga. Por todos os passeios, conversas, doces e momentos compartilhados. Sua candura e força me inspiram sempre a ser melhor!

Aos meus irmãos, José Antônio e Bárbara Isabela, meus amores, que me ensinam todos os dias a construir um mundo melhor, com eles e por eles. Vocês são demais.

Às mulheres fortes da minha família, minhas avós Marta e Julieta, sem elas não teria os meus pais maravilhosos, nem todas as oportunidades pelas quais elas batalharam tanto para que eu conseguisse. Por me mostrarem que pela persistência alcançamos nossos objetivos.

À mais incrível cunhada, Niely Gonçalves, você é uma luz na minha vida, pelo seu carinho e amor inesgotáveis. Agradeço imensamente pelas conversas, por me ouvir, pelas comemorações de Natal e réveillons, pelos passeios gastronômicos e pela honestidade em todos os momentos.

A los Clavijos, por todo el planeta. Tengo mucho orgullo de poder llamarlos de familia. Por todo el cariño, que, mismo separados por tan grande distancia, aun parece que estamos todos juntos. A todos, mi amor y estima

À srta. Maria Helena Castelo Branco, alguém de quem me orgulho poder chamar de amiga. Um porto seguro nas tempestades acadêmicas e cotidianas. Sempre com uma palavra de sabedoria, com um sorriso e com toda a disposição do mundo para me ajudar a encarar todos os desafios, por mais intransponíveis que eles pudessem parecer. Por trazer mais beleza e alegria à minha vida, serei eternamente grata!

À Camila Jéssica Letti, grande amiga e minha madrinha. Você é uma inspiração diária de força e ternura. Por me ajudar a ser sempre melhor, não poderia ter sido mais abençoada!

À professora Maria Aparecida Godoy Soler, pela sua confiança, paciência e compreensão e ensinamentos que ultrapassam o âmbito acadêmico. Pela sua paixão e curiosidade científicas que me contagiam e impulsionam a sempre querer saber mais. Obrigada por todas as oportunidades!

Ao professor Leonardo Giordano Paterno, por ser meu guia pelo fascinante mundo da Química, pelo acolhimento no laboratório, pela disponibilidade em ensinar a teoria e a prática. Meus sinceros agradecimentos.

Ao professor José Souza Filho (*in memoriam*), pela orientação das minhas atividades na disciplina de Histologia, pelas discussões, pela paciência, carinho e por me ensinar que o questionamento é um exercício diário. Será sempre lembrado.

Ao Dr. Marcelo Pereira Silva, do Instituto de Física da Universidade de São Paulo - Campus São Carlos, pelas medidas de microscopia de força atômica e discussões realizadas.

À professora Graziella Anselmo Joanitti, do Instituto Ciências Biológicas da UnB, pela realização dos ensaios de citotoxicidade e entusiasmo em discutir cada detalhe do processo.

À minha “vizinha” Ísis, sempre com uma palavra afetuosa e um doce para alegrar o dia.

Aos colegas e amigos, Paulo, Lucélia, Patrícia, Grazi, Queila que sempre compartilharam seus conhecimentos e experiências, por fazerem a rotina muito mais divertida.

Ao Hermano Farias, pelas análises de Raman, de IR. Mas, principalmente, pela amizade, pelas discussões sobre todos os assuntos que sempre me fazem repensar minhas opiniões, pelas curiosidades, pelo companheirismo e pelo sorvete!

Às minhas amigas Camila Harumi, Rachel e Lucienne com certeza tinha que agradecer a vocês que são parte da minha história e sempre me ensinam as coisas mais legais. E ao amigo e padrinho Prentice Raniery, tudo com você é mais divertido, sei que posso contar sempre com sua garra e sinceridade.

À minha amiga, Pamela Molck, que me ensina todos os dias o significado da amizade e acredita em mim muito antes que eu o fizesse. Obrigada por estar sempre comigo, não importa a distância.

À professora Deizilene Souza e sua família pelo seu apoio e incentivo durante a busca pela carreira docente, não importando a distância percorrida. Minha gratidão eterna!

Ao amigo Luis Miguel, pela terapia em grupo, pela ajuda inestimável e colossal nas análises de dados, na manipulação de equipamentos e por sempre estar disposto a me ensinar tudo o que ele sabe.

Ao Dr. Elton, Ana Paula, Ariane, Manuela, Jaqueline, Luana meus irmãos acadêmicos, pela amizade, ajuda e força durante toda a minha caminhada acadêmica. Vocês não imaginam o quanto me ensinaram. E continuam a ensinar!

Aos alunos de pós-graduação do Instituto de Química e Biologia, Fernanda Sodré, Luiza Ianny pelo apoio na realização do trabalho, pelas conversas e dicas.

Aos funcionários da secretaria do Instituto de Ciências Biológicas, especialmente à Kelly Cristina, pelo excelente trabalho, simpatia e carinho.

Ao prof. Sebastião William da Silva, pelo apoio administrativo.

À Capes, por financiar este trabalho.

.

“Fortitudine Vincimus.”

Ernest Shackleton

“Muitas coisas não ousamos empreender por parecerem difíceis; entretanto, são difíceis porque não ousamos empreendê-las.”

Lucius Annaeus Seneca

Resumo

O objetivo deste trabalho é a preparação, caracterização, avaliação da citotoxicidade *in vitro* e o estudo da estabilidade por ensaios de dissolução de nanocompósitos poliméricos contendo nanopartículas de óxidos de ferro. Os nanocompósitos formados por nanopartículas de óxido de ferro com cobertura de citrato (cit-MAG) e biopolímeros, quitosana (QUIT) ou poli (álcool vinílico) (PVA), foram depositados por meio da técnica de automontagem camada por camada, originando dois grupos de amostras (QUIT/cit-MAG)_n e (PVA/cit-MAG)_n, com n igual ao número de bicamadas. As nanopartículas de óxido de ferro foram sintetizadas por meio do método de coprecipitação em meio aquoso, funcionalizadas com ácido cítrico, e estabilizadas formando o coloide magnético. O crescimento das nanoestruturas foi monitorado por meio de espectroscopia UV-Vis, enquanto que a morfologia foi investigada por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura e de microscopia de força atômica. A dissolução dos nanocompósitos (QUIT/cit-MAG)₃₀ e (PVA/cit-MAG)₃₀, foi estudada em diferentes meios, com variação de pH em soluções iônicas (PBS) e não-iônicas, e em soluções salinas com concentrações crescentes de NaCl. Os resultados mostraram que o nanocompósito (PVA/cit-MAG)₃₀ sofreu um processo de dissolução quando imerso em solução com pH igual 4,0, liberando em torno de 70% da quantidade de nanopartículas de óxido de ferro depositadas, enquanto que o tratamento em solução tampão PBS com pH igual a 4,2 resultou em liberação de 25%. Ao contrário, o nanocompósito (QUIT/cit-MAG)₃₀ não sofreu dissolução quando submetido às mesmas condições. Ambas as nanoestruturas PVA/cit-MAG e QUIT/cit-MAG incubadas com células da linhagem NIH3T3, durante 24 horas, foram consideradas atóxicas em ensaios de citotoxicidade que empregou o protocolo MTT.

Palavras-chave: biopolímeros, nanocompósitos poliméricos, magnetita, fluido magnético, automontagem, *layer-by-layer*, citotoxicidade, nanopartículas de óxido de ferro, dissolução de nanocompósito, poli (álcool vinílico), quitosana.

Abstract

This study deals with the preparation, characterization, and investigation of in vitro toxicity and disassembly conditions of layer-by-layer assembled nanocomposites comprising iron oxide nanoparticles (cit-MAG) and the biopolymers chitosan (QUIT) or polyvinyl alcohol (PVA). Iron oxide nanoparticles were synthesized via chemical co-precipitation method, functionalized with citric acid, and dispersed as aqueous magnetic colloid. The magnetic colloid was used as source of nanoparticles for the layer-by-layer deposition. The growing structure was monitored by UV-Vis spectroscopy, and surface morphology was investigated by scanning electron microscopy and atomic force microscopy. The structures' disassembly was studied when incubated in aqueous solutions with pH values ranging from 3 up to 10, in saline conditions, whether PBS solution or increasing saline concentration of NaCl of (QUIT/cit-MAG)₃₀ and (PVA/cit-MAG)₃₀, being 30, the number of bilayers. (PVA/cit-MAG)₃₀ disassembled when incubated in aqueous solution at pH 4, losing approximately 70% of iron oxide mass, and when treated in PBS solution, at pH of 4.2, approximately 25%. Otherwise, (QUIT/cit-MAG)₃₀ remained very stable when incubated in the same conditions. Both structures, PVA/cit-MAG and QUIT/cit-MAG were considered non-toxic through MTT essay when incubated with NIH3T3 cell line for 24 hours.

Keywords: biopolymer, polymer nanocomposites, magnetic fluid, iron oxide nanoparticles, self-assembly, layer-by-layer, cytotoxicity, film disassembly, film, toxicity test, polyvinyl alcohol, chitosan.

Sumário

1 Sumário

1	Introdução.....	2
1.1	Motivação.....	9
1.2	Justificativa.....	9
1.3	Objetivos.....	10
1.3.1	Objetivo geral.....	10
1.3.2	Objetivos específicos.....	10
2	Metodologia e Materiais	8
2.1	Nanocompósitos.....	8
2.1.1	Técnica de Langmuir-Blodgett.....	9
2.1.2	Técnica de automontagem.....	10
2.2	Matriz Polimérica.....	14
2.3	Nanopartículas de Óxido de Ferro: Propriedades e Síntese.....	17
2.3.1	Nanopartículas de óxido de ferro (ION).....	17
2.3.2	Síntese de nanopartículas de óxido de ferro.....	18

2.4	Fluido magnético	20
3	Procedimentos Experimentais.....	25
3.1	Procedimentos experimentais	25
3.2	Materiais	27
3.3	Síntese do fluido magnético	28
3.4	Deposição dos nanocompósitos pela técnica de automontagem	29
3.4.1	Preparação dos Substratos.....	30
3.4.2	Deposição dos nanocompósitos pela técnica de automontagem.....	30
3.5	Técnicas de caracterização	31
3.5.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão	31
3.5.2	Microscopia Eletrônica de Varredura	32
3.5.3	Microscopia de Força Atômica	33
3.5.4	Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL).....	34
3.5.5	Espectroscopia Raman	35
3.5.6	Espectroscopia no Infravermelho.....	39
3.5.7	Espectroscopia no ultravioleta-visível	40
3.6	Estudo da citotoxicidade de nanocompósitos	41
3.7	Dissolução dos Nanocompósitos	44
4	Resultados e Discussão.....	4746
4.1	Caracterização do Fluido Magnético	4746
4.2	Nanocompósitos automontados.....	5251
4.2.1	Monitoramento de crescimento dos nanocompósitos	5251

4.2.2	Caracterização do nanocompósito QUIT/CitMag por espectroscopia no infravermelho por refletância total atenuada.....	5554
4.2.3	Caracterização morfológica da superfície dos nanocompósitos por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica	5958
4.2.4	Teste de citotoxicidade.....	6665
4.3	Estudo da dissolução dos nanocompósitos.....	7068
4.3.1	Estudo da dissolução de nanocompósitos (PVA/CitMag) ₃₀	7169
4.3.2	Estudo da dissolução dos nanocompósitos (QUIT/cit-MAG) ₃₀ ...	7775
5	Conclusões e Perspectivas.....	8280
5.1	Conclusões.....	8280
5.2	Perspectivas	8382
6	Referências Bibliográficas	8583

Lista de Tabelas

Tabela 3.1. Relação dos nanocompósitos analisados por MFA. Os índices nos nomes dos nanocompósitos representam a quantidade de bicamadas.

Tabela 3.2. Modos Raman atribuídos à magnetita e à maguemitita, segundo referência Soler, 2012 C e Alcântara, 2007.

Tabela 3.3. Relação dos controles negativos (controle com lâmina e controle DMSO) e nanocompósitos PVA₁, (PVA/CitMag)_{9,5}, (PVA/CitMag)₁₀, (QUIT/CitMag)_{9,5} e (QUIT/CitMag)₁₀ empregados para o teste de citotoxicidade.

Tabela 3.4. Condições de dissolução testadas para os nanocompósitos PVA/cit-MAG e QUIT/cit-MAG.

Tabela 4.1. Relação dos modos vibracionais observados nos espectros RTA no infravermelho obtidos do nanocompósito (QUIT/cit-MAG)₃₀ e dos espectros IV do polímero quitosana puro em forma de pó e do sólido nanoparticulado cit-MAG, cujas tentativas de atribuições foram realizadas a partir de dados da literatura (Brugnerotto, 2001; Duarte, 2002; Suyatma, 2004; Samuel, 1981 e Racucui, 2006; Rodrigues, 2009).

Lista de Figuras

Figura 1.1. Ilustração de Rao (2015) esquematizando a ação de nanocompósitos de epirrubicina-nanopartículas de óxido de ferro no combate de câncer de pele.

Figura 2.1. Figura (a) representa a adsorção de polímeros por interações eletrostáticas, em 1 apenas o polieletrólito positivo interagindo com o substrato com carga superficial negativa e, em 2, interagindo com o polieletrólito de carga oposta. Na figura (b), esquema similar representando o polímero positivo adsorvido no substrato e, em 2, com nanopartículas negativas adsorvidas no polímero. Nota-se que cada camada interpenetra a outra, não ocorrendo a separação de fase de cada camada.

Figura 2.2. Esquematização do processo de fabricação do nanocompósito automontado e da estrutura resultante.

Figura 2.3. Estrutura da quitina (I) formado por meros de 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glicopiranosose e da quitosana (II) quitosana, formada pela ligação $\beta(1,4)$ de 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glicopiranosose e 2-amino-2-deoxi- β -D-glicopiranosose.

Figura 2.4. Fórmula estrutural do álcool polivinílico (PVA). O PVA consiste de uma cadeia de carbonos saturados com grupos hidroxilas.

Figura 2.5. Representação da molécula de citrato em pH 6,9 com os grupos carboxilato.

Figura 2.6. Estrutura da molécula de ácido cítrico, em pH inferior a 3,1.

Figura 2.7. Ilustração das nanopartículas de óxido de ferro (NP) com cobertura de citrato (esferas amarelas). Quando em pH 3,7, o citrato apresenta grupos $-COOH$, representados pelas esferas alaranjadas.

Figura 3.1. Esquema ilustrativo das técnicas de caracterização utilizadas neste trabalho no FM e nos nanocompósitos automontados.

Figura 3.2. Ilustração do processo de síntese de nanopartículas de magnetita por coprecipitação alcalina, com cobertura de citrato.

Figura 3.3. Origem dos espalhamentos Raman Stokes e Anti-Stokes e Rayleigh. Adaptado de Ramirez (2013).

Figura.4.1 Imagem de MET típica da amostra de nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com citrato (a); e histograma de distribuição de tamanho obtido a partir de imagens de MET (b).

Figura 4.2 Espectro Raman típico da amostra de nanopartículas de óxido de ferro cobertas por citrato, sob intensidade do laser 0,25mW, ajustado por meio de lorentzianas.

Figura 4.3 Espectro FT-IR típico da amostra de nanopartículas de óxido de ferro cobertas por citrato, em pastilha de KBr. Em (a) o espectro de 350 a 4000 cm^{-1} e em (b)

espectro de 350 a 2000cm^{-1} , para melhor observar as bandas correspondentes aos óxidos de ferro.

Figura 4.4. Monitoramento por espectroscopia UV-Vis do crescimento de nanocompósitos (PVA/cit-MAG)_n, de 10 bicamadas (a) e com 30 bicamadas (b). A Figura inserida se refere aos valores obtidos da absorvância em 360nm (triângulos) e 480nm (círculos), em função do número de bicamadas.

Figura 4.5. Monitoramento do crescimento de nanocompósitos (QUIT/CitMag)_n, em (a) de 1 a 10 bicamadas, e em (b) de 1 a 30 bicamadas. A Figura inserida se refere aos valores obtidos da absorvância em 360nm (triângulos) e 480nm (círculos) em função do número de bicamadas.

Figura 4.6. Espectro no infravermelho de cit-MAG (a) e quitosana pura (b), em (c) o espectro no infravermelho por RTA do nanocompósito (QUIT/cit-MAG)₃₀.

Figura 4.7. Imagens de MEV de nanocompósitos (PVA/cit-MAG) depositados em vidro BK7, ampliadas 10.000 vezes. A imagem do nanocompósito (PVA/cit-MAG) com 9,5 bicamadas, camada superior de polímero (a) e imagem do nanocompósito (PVA/cit-MAG) com 10 bicamadas, camada superior de nanopartícula (b).

Figura 4.8. Imagens de microscopia de varredura de nanocompósitos (PVA/cit-MAG) depositados em vidro BK7 ampliadas 50.000 vezes. A imagem do nanocompósito de (PVA/cit-MAG)_{9,5} camada superior de polímero (a) e do (PVA/cit-MAG)₁₀, camada superior de nanopartículas (b).

Figura 4.9. Imagens MFA de topografia (a) e (c) e fase (b) e (d) de nanocompósitos $(PVA/cit-MAG)_n$, $n=5$ (a) e (b) e 10 (c) e (d) bicamadas.

Figura 4.10. Imagens MFA de topografia (a) e (c) e fase (b) e (d) de nanocompósitos $(QUIT/cit-MAG)_n$, $n=9,5$ (lado esquerdo) e 10 (lado direito) bicamadas.

Figura 4.11 Dados de espessura em função do número de bicamadas dos nanocompósitos de $(PVA/cit - MAG)_n$, com $n = 1; 1,5; 3; 5$ e 10, estimados por meio das imagens de MFA O ajuste linear foi realizado com a reta $y=8,77+4,58x$ ($r^2=0,97$).

Figura 4.12. Resultados do teste de viabilidade celular em linhagem de fibroblastos NIH3T3 após 24 horas de incubação. Da esquerda para a direita, controles negativos, grupo controle incubado com um substrato limpo (lâmina) e com DMSO, PVA_1 : nanocompósito sem nanopartículas; $(PVA/cit-MAG)_{9,5}$, com o polímero na superfície do nanocompósito; $(PVA/cit-MAG)_{10}$, com as nanopartículas na superfície do nanocompósito; $(QUIT/cit-MAG)_{9,5}$ e $(QUIT/cit-MAG)_{10}$.

Figura 4.13. Absorbância relativa dos nanocompósitos $(PVA/cit - MAG)_{30}$ após incubação por 2 horas (120min) em soluções de PBS em pH igual a 4,2, em (a); a 4,9, em (b) e a 5,6 em (c). O grupo 1 representa a absorbância relativa no instante inicial, sempre igual a 100%, o grupo 2 são as absorbâncias relativas em 360nm após o tratamento.

Figura 4.14. Nanocompósitos $(PVA/cit - MAG)_{30}$ após imersão por 6 horas em soluções aquosas com valores de pH igual a 3, em (a), pH 4 em (b), pH 5 (c), pH 6 (d) e pH 10

(e). O grupo 1 representa a absorvância relativa no instante inicial, sempre igual a 100%, o grupo 2 são as absorvâncias relativas em 360nm após o tratamento.

Figura 4.15. Absorvância relativa em 360nm para os nanocompósitos (*PVA/cit – MAG*)₃₀ imersos durante 6 horas em soluções aquosas com valores de pH 4 (a) e em pH 5(b).

Figura 4.16. Absorvância relativa dos nanocompósitos (*PVA/cit – MAG*)₃₀ imersos durante 2 horas em soluções de NaCl 1M (a), 2M (b), 3M (c), 4M (d) e 5M (e), todos em pH 6,9. O grupo 1 representa a absorvância relativa no instante inicial, sempre igual a 100%, o grupo 2 são as absorvâncias relativas em 360nm após o tratamento.

Figura 4.17 Absorvância relativa de nanocompósitos (*QUIT/cit – MAG*)₃₀ após incubação por 2horas (120min) em soluções de PBS em pH igual a 4,2, em (a); a 4,9, em (b) e a 5,6 em (c). O grupo 1 representa a absorvância relativa no instante inicial, sempre igual a 100%, o grupo 2 são as absorvâncias relativas em 360nm após o tratamento.

Figura 4.18. Absorvância relativa de nanocompósitos (*QUIT/cit – MAG*)₃₀ após imersão por 6 horas em soluções aquosas com valores de pH iguais a 3 (a), pH4 em (b). O grupo 1 representa a absorvância relativa no instante inicial, sempre igual a 100%, o grupo 2 são as absorvâncias relativas em 360nm após o tratamento.

Figura 4.19. Absorvância relativa dos nanocompósitos (*QUIT/cit – MAG*)₃₀ após imersos durante 2 horas em soluções de NaCl 1M (a), 2M (b), 3M (c), 4M (d) e 5M (e), todos em pH 6,9. O grupo 1 representa a absorvância relativa no instante inicial, sempre igual a 100%, o grupo 2 são as absorvâncias relativas em 360nm após o tratamento.

Lista de Símbolos

- 2D – bidimensional
- 3D – tridimensional
- A – Absorbância
- b – Espessura da amostra
- C – Número de intervalos de tamanhos
- c – Concentração da amostra absorvedora
- D – Coeficiente de difusão
- D_{MET} – diâmetro médio obtido por MET
- $D_{\text{méd}}$ – Diâmetro médio
- DMEM– Dulbecco’s Modified Eagle Medium
- DMSO – Dimetil sulfóxido
- EDL – Espalhamento dinâmico de luz
- Fe_3O_4 – Magnetita
- FM – Fluido magnético
- FT-IR – Espectroscopia Infravermelho por transformada de Fourier
- GO – Óxido de grafeno
- I – Intensidade do laser após atravessar a amostra
- ION– *iron oxide nanoparticles*
- I_0 – Potência do feixe que incide na amostra
- IV – Espectroscopia no infravermelho
- LB – Langmuir-Blodgett

- LbL – *layer-by-layer*
- MET – microscopia eletrônica de transmissão
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- MFA – microscopia de força atômica
- MTT– Brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio
- N – Número de partículas contadas
- NaCl – Cloreto de sódio
- NC – Nanocompósitos
- NIH3T3 – linhagem de fibroblastos não-tumorais da espécie *Mus musculus*
- NP – nanopartículas
- $P(D)$ – Distribuição log-normal
- PBS– Solução de tampão fosfato
- PDAC – Hidrocloro de poli (dialil dimetilamônio)
- pH – Potencial de hidrogênio
- pK_a – Potencial de acidez
- PVA – Poli (álcool vinílico)
- PVA/cit-MAG – nanocompósito constituído por poli (álcool vinílico) e nanopartículas
- QUIT – Quitosana
- QUIT/cit-MAG – nanocompósito constituído por quitosana e nanopartículas
- Raman – Espectroscopia Raman
- RTA – Refletância total atenuada
- SFB – Soro fetal bovino
- T – Temperatura absoluta
- T – Transmitância

- Uv-vis – Espectroscopia no ultravioleta/visível
- ν_0 – Frequência do laser
- ν_v – Frequência do fóton que é absorvido ou emitido no processo de espalhamento inelástico
- α -Fe₂O₃ – hematita
- γ -Fe₂O₃ – maguemita
- ζ – Potencial Zeta
- σ – Desvio padrão do diâmetro

Capítulo 1

Introdução

A nanotecnologia compreende a síntese e a manipulação de materiais na escala nanométrica, entre 1 e 100nm, com o objetivo de fabricar nanoestruturas com propriedades e comportamentos originais e/ou diferenciados daqueles apresentados pelos mesmos materiais em dimensões macroscópicas (MEDEIROS, 2012). Devido à baixa dimensionalidade, os nanomateriais apresentam redução da simetria translacional de longo alcance e aumento da razão entre área superficial e volume (SOLER, 2011). O empreendimento dessa revolução requer conhecimentos multidisciplinares e envolve profissionais de diversas áreas do conhecimento, desde o planejamento da síntese à aplicação. Não apenas materiais macroscópicos adquirem propriedades distintas quando na escala nano, mas também nanoestruturas fabricadas a partir desses materiais apresentam propriedades únicas e distintas dos seus componentes originais, como, por exemplo, o uso de cobertura biocompatível em nanotubos de carbono com o objetivo de aplicá-los em meio biológico, sem a qual eles seriam tóxicos (SHIM, 2002), ou a fabricação de nanoestruturas com antígenos virais para vacinação por via transdérmica (SU, 2009). A manipulação, mensuração e organização molécula por molécula de substâncias de interesse, como DNA, hormônios, neurotransmissores, fármacos, nanopartículas, pontos quânticos, nanotubos de carbono e as novas propriedades exibidas pelas

nanoestruturas nas quais essas moléculas estão inseridas indicam alguns dos impactos futuros da nanotecnologia. Em particular, os sistemas nanoestruturados para veiculação de fármacos vêm sendo muito investigados ultimamente (PY-DANIELS,2016; RIBEIRO, 2016).

As abordagens de síntese e fabricação dos novos materiais em tamanhos nanométricos podem ser realizadas partir do material macroscópico, ou *bulk*, processado até atingir as dimensões nanométricas desejadas, ou a partir dos componentes moleculares e/ou nanométricos para formar estruturas de duas (2D) ou três dimensões (3D), sendo que ao menos uma delas seja menor do que 100nm, abordagem denominada de *bottom-up*. Esta abordagem permite maior controle das dimensões e posições das partículas nas nanoestruturas (GRZELCZAK, 2010). Em adição, o desenvolvimento da química de coloides tem contribuído para a preparação de nanomateriais empregando alternativas mais simples em comparação com métodos sofisticados como nanolitografia e epitaxia de feixe molecular (SEISYAN, 2001 DE SALES, 2004; DE SALES, 2003).

Os nanocompósitos automontados atraem cada vez mais a atenção de pesquisadores em busca de estruturas com múltiplas propriedades específicas, como a biocompatibilidade, porosidade, flexibilidade, resistência, aderência, solubilidade em água, baixo custo e capacidade de incorporação de proteínas, além de mantê-las bioativas (LIN, 2015). A quitosana (QUIT) é um biopolímero comestível com atributos como a biocompatibilidade, bioadesividade, rigidez e baixo custo, por isso, é amplamente utilizado para a fabricação de compósitos nanoestruturados (CASTILHO, 2014; DHURAI,2013), coberturas de estruturas para implantes (BUMGARDNER, 2003) e agente antimicrobiano em cobertura de frutas e outros alimentos (RABEA, 2003). A quitosana, no entanto, é um polímero quebradiço, o que pode limitar o seu uso.

O polímero poli (álcool vinílico) (PVA) possui propriedades mecânicas mais interessantes para a construção de nanoestruturas do que a QUIT, devido à sua elasticidade.

Também é um polímero biocompatível, bioadesivo, solúvel em água, de baixo custo e presente em diversas estruturas comercialmente disponíveis, como lentes de contato (HYON, 1994). Contudo, a produção de nanocompósitos por meio da técnica de automontagem com PVA e nanopartículas de óxido de ferro, não se mostrou eficiente (CASTILHO, 2014).

A combinação de dois ou mais polímero, dentre os quais pelo menos um deles é um polímero biocompatível para formar estruturas, é uma estratégia utilizada para entrega de substâncias com baixa biodisponibilidade, ou que são rapidamente degradadas no organismo antes de atingir o tecido alvo. No caso dos nanocompósitos, é possível utilizar a matriz polimérica e nanopartículas que introduzirão funcionalidades como propriedades magnéticas, e /ou elétricas ao sistema nanoestruturado (ALCÂNTARA, 2011C; ALCÂNTARA, 2013A, ALCÂNTARA, 2013B, PATERNO, 2009A e PATERNO 2009B). Em adição, as nanopartículas podem ser carreadoras do princípio ativo ou no caso dos óxidos de ferro cúbicos, agirem como agentes de contraste em imagens de ressonância magnética (QIAO, 2009). Estes nanocompósitos podem se degradar progressivamente em ambientes com características específicas que provoquem a sua dissolução, e durante este processo, espécies de interesse poderão ser liberadas.

As nanopartículas de óxido de ferro (ION, do inglês *iron oxide nanoparticles*) apresentam grande potencial em aplicações biomédicas, devido ao pequeno diâmetro, entre 5 e 20nm, biocompatibilidade, biodegradabilidade, e propriedades magnéticas que permitem direcionamento das nanopartículas no organismo em resposta à aplicação de um gradiente de campo magnético (SOLER, 2014, SOLER, 2007 B, MELO, 2006) ou ainda via endereçamento por meio de proteínas ligadas à superfície da nanopartícula e reconhecidas por células-alvo (NEUBERGER, 2005). Os sistemas nanoparticulados para liberação de fármacos representam um aperfeiçoamento dos métodos tradicionais, pois permitem a diminuição da dose aplicada, e conseqüentemente dos efeitos colaterais, o aumento da biodisponibilidade do fármaco, além da

sua liberação em uma área específica. Aplicações das IONs como terapia envolvem a magnetohipertermia, técnica que por meio da variação do campo magnético aplicado, levam as IONs a vibrarem, aumentando a temperatura local. Quando aplicadas em neoplasias, o aumento de temperatura provoca a morte celular, sobretudo das células tumorais, diminuindo a necrose de tecidos saudáveis adjacentes (PANKHURST, 2003; LAURENT, 2011; MAHMOUDI, 2011). Em adição, entre as aplicações em diagnóstico, a mais comum é o aumento do contraste em imagens de ressonância magnética (QIAO, 2009). Nessas aplicações, as nanopartículas de óxido de ferro estão suspensas em meio aquoso, atóxico e estável, conhecido com fluido magnético (FM). O fluido magnético, ou ferrofluido, é uma suspensão coloidal de nanopartículas de óxidos de ferro, como a magnetita e a maguemita, que sob a ação de um campo magnético comporta-se, macroscopicamente, como uma fase líquida (SOLER, 2011). Esta fase líquida é obtida por meio da estabilidade coloidal que impede que as nanopartículas se aglomerem e precipitem. Isto pode ser evitado ao incorporar uma cobertura às nanopartículas que aumente as interações repulsivas entre as mesmas (SOLER, 2007 A; MORAIS, 2001; MORAIS, 2006). As moléculas de cobertura são, geralmente, moléculas orgânicas biocompatíveis e estáveis em condições fisiológicas (NUNES, 2014; SOLER, 2011 B).

A obtenção de nanocompósitos com arquitetura planejada e reprodutível persiste um desafio. Algumas técnicas foram desenvolvidas com o objetivo de produzir nanoestruturas com controle molecular dos componentes, de suas dimensões e da composição, com custo baixo empregando infraestrutura mais simples do que a técnica de Langmuir-Blodgett. Uma das técnicas alternativas para a fabricação de nanocompósitos é a técnica de automontagem camada por camada, do inglês *Layer-by-layer* (LbL) (DECHER, 1991). Este método consiste de uma via úmida relativamente simples, e altamente eficiente na fabricação de multicamadas empregando vários tipos de componentes como polieletrólitos, nanopartículas, nanotubos, óxido de grafeno, etc. (ALCÂNTARA, 2011B; GROSS, 2014; LETTI, 2013; PATERNO,

2009A; PATERNO, 2010; PATERNO, 2012; PATERNO, 2013; PEREGRINO, 2014; SOLER, 2012A). As multicamadas podem ser formadas por meio de interações eletrostáticas, Van der Waals, ligação de hidrogênio ou ligação dissulfeto entre a matriz entre seus componentes. No caso da automontagem de nanopartículas de óxidos de ferro e polímeros, o FM funciona como fonte de nanopartículas, com propriedades superficiais adequadas para serem ancoradas na matriz polimérica. Em alguns casos estas interações podem ser reversíveis e ocorrer a dissolução da estrutura quando imersa em ambiente com variação de temperatura, de acidez, força iônica, ou devido à ação de enzimas.

Os resultados do nosso grupo de pesquisa relativos à fabricação de nanocompósitos de polímeros e IONs mostraram que as nanopartículas encontram-se encapsuladas na matriz polimérica e imagens de microscopia eletrônica de alta resolução revelaram estruturas homogêneas com as nanopartículas depositadas uniformemente na matriz polimérica (ALCÂNTARA, 2011B; ALCÂNTARA, 2011C; CASTILHO, 2014; LETTI, 2013; NEUMANN, 2013; SOLER, 2012B).

A introdução do biopolímero PVA como matriz polimérica para a automontagem de NPs de óxidos de ferro representa mais uma contribuição no desenvolvimento de nanocompósitos para futuras aplicações, principalmente biomédicas. Este procedimento associa a técnica simples, não-onerosa e altamente eficiente de automontagem, com material biocompatível, biodegradável, de propriedades mecânicas interessantes e nanopartículas com propriedades superparamagnéticas em uma única nanoestrutura. O estudo e desenvolvimento de nanocompósitos permite explorar novas propriedades, como a dissolução da estrutura. A dissolução pode ocorrer quando a estrutura é exposta a condições não-ideais para a manutenção das interações que os mantém coesos. O ordenamento é desfeito e a estrutura se desfaz, liberando as nanopartículas do encapsulamento polimérico no meio. Esta dissolução do nanocompósito deve ocorrer em condições bastante específicas, considerando-se as condições

fisiológicas. No caso da entrega transcutânea, ou transdérmica, de fármacos, a dissolução dos nanocompósitos deveria ocorrer em condições específicas na faixa de valores de pH, de 3,0 a 7,0, e na presença de íons. Uma vez desfeita a estrutura, as nanopartículas são liberadas e, devido às suas dimensões nanométricas, podem penetrar na pele pela via dos folículos pilosos, como na ilustração da Figura 1.1, e atingir células específicas nesta área. Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de nanocompósitos poliméricos, matriz de quitosana ou poli (álcool vinílico), com nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com ácido cítrico. Os estudos de dissolução dessas estruturas foram realizados em condições que simulam as condições fisiológicas da pele, visando uma futura aplicação biomédica. Os ambientes de dissolução testados foram soluções com pH na faixa de 3 a 6, ou com concentrações crescentes de íons (NaCl 1-5M) e em soluções de PBS 1x com valores de pH iguais a 4,2, 4,9 e 5,6. Os, ou foram testados de forma a avaliar a citotoxicidade *in vitro* em linhagem de células o tipo NIH3T3 não-tumorais de murino. Os estudos foram realizados com base nos resultados de Su (2009), Wood (2005) e Picart (2005), de dissolução de estruturas poliméricas contendo fármacos, e em Han (2011), Rahim (2010) e Vásquez (2002) que investigaram as condições nas quais ocorre dissolução de diversas estruturas poliméricas sem fármacos.

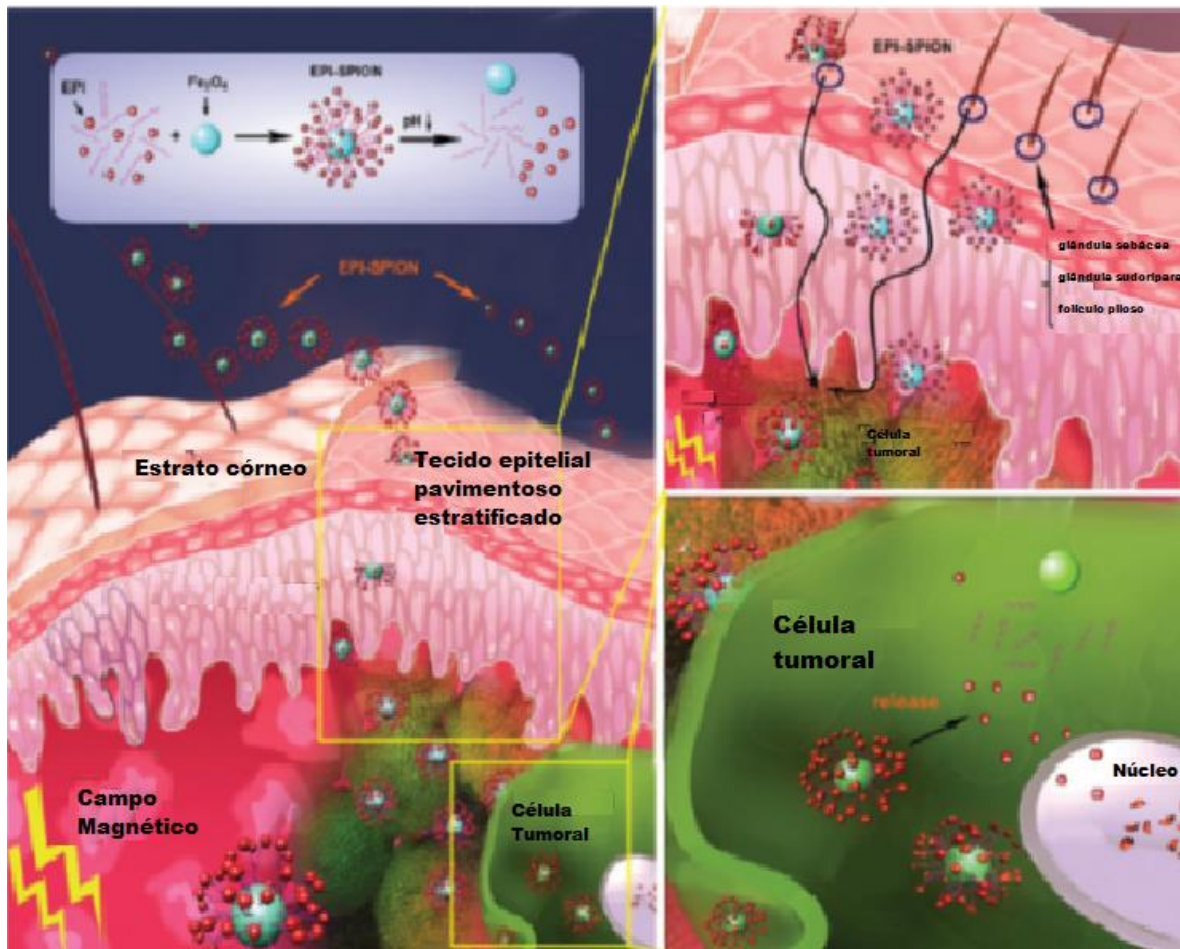


Figura 1.1. Ilustração que mostra a ação de nanocompósitos de epirrubicina-nanopartículas de óxido de ferro no tratamento de câncer de pele. Reproduzido de Rao (2015).

Este trabalho está organizado da seguinte forma: no capítulo 2, apresentação da técnica de fabricação dos nanocompósitos e dos materiais utilizados. O capítulo 3 descreve em detalhes os procedimentos experimentais e as técnicas de caracterização adotadas neste trabalho. O capítulo 4 apresenta e discute os resultados obtidos, e o capítulo 5 finaliza com as conclusões e perspectivas.

1.1 Motivação

A nanotecnologia permite o desenvolvimento de estruturas mais eficientes para liberação de fármacos, pois modificam uma ou mais das propriedades das formulações atualmente disponíveis, como o aumento da biodisponibilidade, diminuição da dosagem, liberação controlada, entre outros. A tecnologia dos nanocompósitos automontados, permite sua utilização como plataforma para diversos compostos ativos em uma estrutura biocompatível. Os nanocompósitos automontados podem, em determinadas condições, alterar-se, manter sua arquitetura, ou até desfazer-se, em resposta às condições do ambiente, como variação de pH, da concentração de sais, de concentração de glicose (LIN, 2015). O desenvolvimento e estudo de novas nanoestruturas com sensibilidade a um meio específico possibilita a expansão das aplicações destas estruturas.

1.2 Justificativa

O desenvolvimento de nanoestruturas construídas a partir de nanopartículas de óxido de ferro e polímeros biocompatíveis são uma nova estratégia para o desenvolvimento de nanomateriais multifuncionais. As nanopartículas de óxido de ferro são excelentes plataformas para a ancoragem de fármacos (RAMIREZ RIVERA, 2013), antígenos (SU, 2008), contrastes para diagnóstico (CHOI, 2004), entre outros. O polímero é a matriz na qual as nanopartículas podem ser dispersas e suas qualidades como aderência, solubilidade, resistência mecânica podem ser escolhidas de acordo com as especificidades do nanocompósito projetado. Estas nanoestruturas depositadas a partir de materiais biocompatíveis possibilitam a sua aplicação em

sistemas biológicos, e ainda a alteração de sua estrutura em resposta às condições do meio ao qual são expostas.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo geral

Depositar, caracterizar, avaliar a toxicidade e estudar o processo de dissolução dos nanocompósitos formados por poli (álcool vinílico) ou quitosana e nanopartículas de óxido de ferro depositados por automontagem.

1.3.2 Objetivos específicos

Visando alcançar o objetivo foram executadas as seguintes etapas:

- Síntese e caracterização estrutural e morfológica do fluido magnético e das nanopartículas de óxido de ferro;
- Deposição de nanocompósitos ultrafinos automontados formados por poli (álcool vinílico) e nanopartículas de óxido de ferro;
- Monitoramento do crescimento dos nanocompósitos;
- Caracterização morfológica dos nanocompósitos produzidos;
- Avaliação da toxicidade *in vitro* dos nanocompósitos;
- Estudo da dissolução dos nanocompósitos em ambientes com diferentes valores de pH e concentrações de sal.

Capítulo 2

Metodologia e Materiais

Neste trabalho, os nanocompósitos foram construídos empregando como matriz polimérica, quitosana (QUIT) ou poli (álcool vinílico) (PVA) e nanopartículas de óxido de ferro cobertas com citrato. Este capítulo trata da técnica empregada para produzi-los e das características dos materiais utilizados.

2.1 Nanocompósitos

Os nanocompósitos apresentam espessura muito pequena, variando de poucos nanômetros até centenas. Entre as técnicas mais empregadas para a fabricação desses nanocompósitos estão as de Langmuir-Blodgett, automontagem, spin-coating e sublimação. As técnicas de Langmuir-Blodgett e a de automontagem camada por camada, ou do inglês *Layer-by-layer* (LbL), serão apresentadas a seguir.

2.1.1 Técnica de Langmuir-Blodgett

Historicamente, a técnica de automontagem foi precedida pela técnica de Langmuir-Blodgett (LB). Esta técnica foi desenvolvida por Irving Langmuir e Katherine Blodgett no início do século XX, nos laboratórios da General Electric Co. A técnica consiste na deposição de camadas monomoleculares de surfactantes orgânicos em um substrato. Esta técnica emprega um equipamento específico, o qual consiste de uma cuba com barreiras laterais móveis e um braço mecânico, ambos controlados por computador. O substrato é fixado ao braço mecânico, que mergulha na cuba que contém água e uma solução do composto a ser depositado em solvente orgânico volátil, imiscível com a água, na superfície. A solução na cuba apresenta em sua superfície, uma camada de moléculas ordenadas lado a lado, mantidas nessa conformação por meio da compressão feita pelas paredes móveis da cuba. O substrato é mergulhado numa velocidade adequada que permita a interação do substrato com o composto de modo que essas moléculas sejam transferidas da superfície da cuba para a superfície do substrato, formando o filme. Os filmes LB possuem elevada organização estrutural em escala nanométrica, o que permite o uso de algumas substâncias como ácidos graxos, porfirinas, polímeros condutores, cristais líquidos, fosfolípidios, para formação de filmes que podem ser aplicados na fabricação de dispositivos ópticos não-lineares (TOCCI, 1995) e piezelétricos (SOUMETZ, 2009), sensores químicos (KAUSHIK, 2008; KAUSHIK, 2009; GOICOCHEA, 2008), fotodiodos (LI, 2011), eletrodos (SANTOS, 2014), entre muitos outros.

A técnica de Langmuir-Blodgett é sofisticada, que requer ambiente controlado, além de equipamento específico. A técnica apresenta também limitações para o tipo de materiais a serem depositados, pois requer o uso de solvente orgânico, inviabilizando o uso de diversas moléculas de interesse biológico, que são solúveis em água.

2.1.2 Técnica de automontagem

Visando contornar as limitações apresentadas pela técnica LB, Iler (1966) desenvolveu o método de deposição de multicamadas de partículas coloidais em substrato de vidro e mais tarde Sagiv e colaboradores (NETZER, 1983) propuseram a técnica de automontagem de monocamadas quimicamente adsorvidas entre si. Mais tarde, em 1991, Decher e colaboradores expandiram o uso da técnica de automontagem, realizando a deposição de multicamadas de polieletrólitos (DECHER, 1991).

A técnica de automontagem consiste na deposição camada por camada de compostos, os quais podem interagir para se manterem unidos por meio de interações eletrostáticas, por ligações de hidrogênio ou por ligação dissulfeto, entre outras (HAYNIE, 2005), formando uma bicamada em um substrato previamente funcionalizado. Em filmes automontados de polieletrólitos, por exemplo, o processo de automontagem é conduzido por interações eletrostáticas, entre pares iônicos. Outro aspecto importante a ser observado, é o da supercompensação de cargas. Na supercompensação de cargas, as cargas da camada depositada compensam as da camada antecedente, restando ainda, cargas superficiais suficientes para a ancoragem da próxima camada. Desta forma a carga superficial inverte-se a cada camada adsorvida (DECHER, 1997 e HOOGEVEEN 1996). Existe a possibilidade de adsorção entre as camadas ocorrer por ligações de hidrogênio (WANG, 1997; FU, 2002; SUKHISHVILI, 2000). A ligação de hidrogênio é uma interação atrativa entre um átomo de hidrogênio de uma molécula ou de um fragmento X-H, covalentemente ligados, no qual X é mais eletronegativo que H, e um átomo ou grupo de átomos na mesma molécula, ou em outra molécula, entre os quais ocorre a ligação. A ligação de hidrogênio pode ser ilustrada como: $X - H \cdots Y - Z$, onde $X - H$ representa o doador na ligação de hidrogênio, os três pontos ilustram a ligação de

hidrogênio propriamente dita e $Y - Z$ representam o aceitador (ARUNAN, 2011). O aceitador corresponde a uma região rica em elétrons tais como, mas não limitados a, um par de elétrons livres de Y ou uma ligação π entre $Y - Z$. Ainda segundo Arunan (2011), alguns critérios devem ser atendidos para a formação da ligação de hidrogênio, tais como: as forças envolvidas na formação da ligação devem incluir as forças de origem eletrostática, as originadas da transferência de carga entre aceitador e o doador e aquelas originadas da dispersão. Os átomos X e H são ligados covalentemente entre si e a ligação entre eles é polarizada, a ligação de hidrogênio entre $H \cdots Y$ torna-se mais forte quanto maior for a eletronegatividade de X . Uma característica importante da ligação de hidrogênio é a correlação entre o pK_a , potencial de acidez, de $X - H$ e o pK_b , potencial de basicidade, de $Y - Z$ em determinado solvente, e a energia da ligação de hidrogênio entre eles.

No processo de formação dos filmes automontados ainda pode ocorrer o fenômeno da interpenetração das camadas como observado por Schmitt (1993), em estudos de ordenamento das camadas por espalhamento de nêutrons e difração de raio-X. A interpenetração consiste de segmentos do material da camada anterior. Estas interações possuem intensidades distintas, mas o efeito cumulativo das mesmas faz que as monocamadas fiquem mais compactas e fortemente adsorvidas (PATERNO, 2001).

Diversas nanoestruturas podem ser empregadas para a construção de multicamadas automontadas, tais como polímeros sintéticos e naturais; nanopartículas de óxido de ferro (SOLER, 2012 A), de óxido de titânio (PATROCÍNIO, 2009), óxido de grafeno (LEE, 2011), entre outros, em meio aquoso. É necessário, entretanto, que as substâncias que compõem as camadas possuam propriedades tais como a carga superficial oposta ao do composto depositado anteriormente (Figura 2.1) ou grupos funcionais disponíveis para realizar a ligação de hidrogênio, ou dissulfeto.

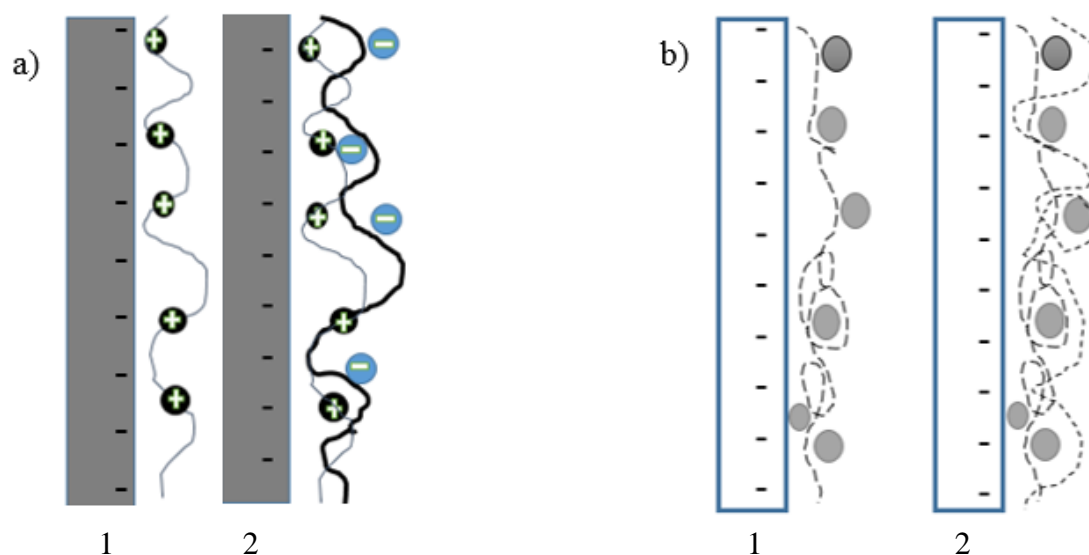


Figura 2.1. Figura (a) representa a adsorção de polímeros por interações eletrostáticas, em 1 apenas o polieletrólito positivo interage com o substrato com carga superficial negativa e, em 2, interage com o polieletrólito de carga oposta. Na figura (b), esquema similar representando o polímero positivo adsorvido no substrato e, em 2, com nanopartículas negativas adsorvidas no polímero. Nota-se que cada camada interpenetra a outra.

O processo de adsorção LbL depende dos sítios disponíveis da camada anterior para interagir com a posterior. No entanto, devido à pequena quantidade de material adsorvido, teoricamente deveria ocorrer 100% de aproveitamento dos sítios disponíveis para a formação contínua do filme, o que não se verifica. Efetivamente há a presença de impurezas que podem interagir com os sítios diminuindo a disponibilidade dos mesmos para formar a próxima camada, além do impedimento estérico, limitando o processo de montagem.

Comparativamente à técnica de Langmuir-Blodgett, a técnica de automontagem, ou (LbL), é simples, de baixo custo, rápida, faz uso de equipamentos simples e comuns, e emprega compostos em meio aquoso. É realizada à temperatura ambiente, não requer ambiente controlado e ainda é altamente eficaz na construção de multicamadas de espessura controlada. Desde o artigo seminal de Iler (1966) e a popularização por Drecher et al. (1991), a técnica

difundiu-se por diversos campos do conhecimento, como a farmácia (LIN, 2015), medicina preventiva (SU, 2009), engenharia eletrônica (SANTOS, 2014), de energia (PATROCÍNIO, 2009), de alimentos (SKURTYS, 2010), entre outras. Isto deve-se à versatilidade da técnica quanto ao tipo de material a ser utilizado, ao tipo, formato e tamanho do substrato, e ao emprego de suspensões aquosas adequadas para componentes biológicos.

Neste trabalho foram depositados nanocompósitos automontados formados por biopolímeros e nanopartículas depositados em substratos planos. Em resumo, o procedimento de deposição das multicamadas pode ser descrito por meio das seguintes etapas: (i) O substrato previamente tratado é imerso na solução do polímero, (ii) lavagem e (iii) secagem, formando-se a primeira monocamada. Em seguida, (iv) o substrato é imerso, na suspensão coloidal que contém as nanopartículas, (v) lavagem e (vi) secagem, formando-se a primeira bicamada. A repetição dos passos anteriores até atingir o número de bicamadas desejado permite a formação da nanoestrutura com a espessura desejada (Figura 2.2).

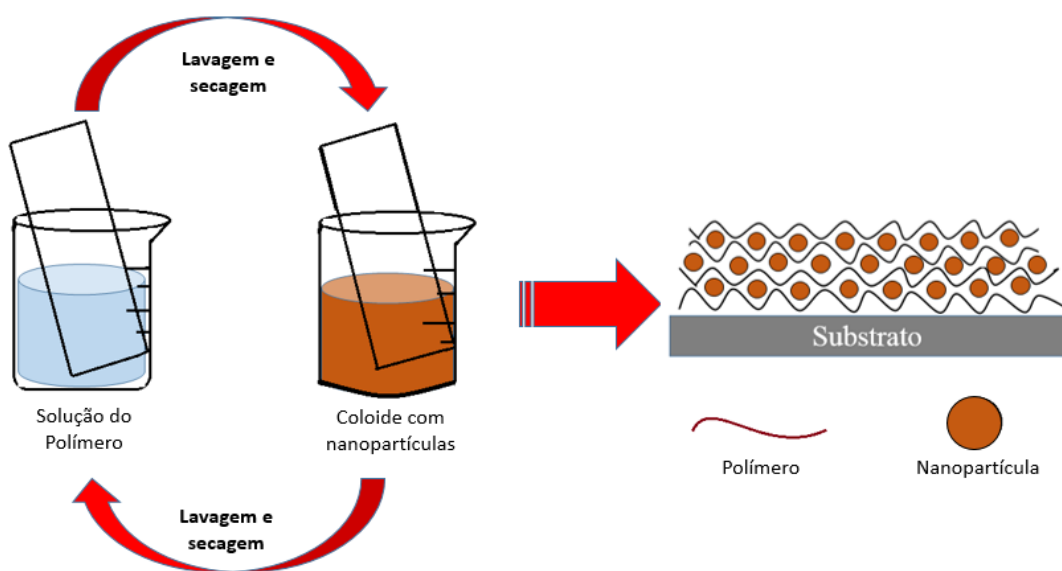


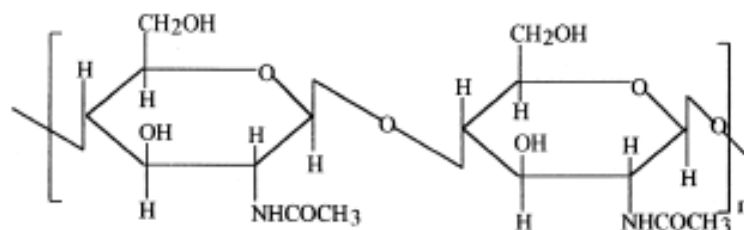
Figura 2.2. Ilustração do processo de deposição do nanocompósito por automontagem e da estrutura resultante.

Neste estudo a técnica LbL foi empregada para produzir multicamadas formadas pelos polímeros quitosana (QUIT) ou poli (álcool vinílico) (PVA) e nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com citrato (cit-MAG).

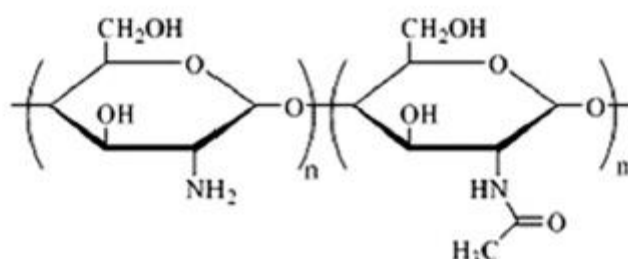
2.2 Matriz Polimérica

Segundo Young (2011), o termo polímero define uma substância composta por moléculas com longas sequências de uma ou mais espécies de átomos ligados, usualmente, por ligações covalentes, formadas por unidades repetitivas chamados meros, ligados uns aos outros em reações de polimerização. Os polímeros utilizados neste trabalho serão apresentados a seguir.

A quitosana (QUIT) é um polímero semissintético resultante da desacetilação alcalina do polímero quitina (Figura 2.3), formado por meros de 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glicopiranosose. O polímero consiste da ligação β -(1,4) de meros de 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glicopiranosose e 2-amino-2-deoxi- β -D-glicopiranosose, uma vez que o grau de desacetilação da quitina é variável de acordo com o tratamento do polímero (Figura 2.3). A quitina, um polissacarídeo estrutural amplamente produzido no reino animal, pode ser encontrada no exoesqueleto de artrópodes, insetos e crustáceos, e também na parede celular de bactérias e fungos, sendo uma das macromoléculas mais abundantes do planeta (KUMAR, 2000).



I. Quitina



II. Quitosana

Figura 2.3. Estrutura da quitina (I) formado por meros de 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glicopirranose e da quitosana (II), formada pela ligação $\beta(1,4)$ de 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi- β -D-glicopirranose.

A quitosana é solúvel em água e insolúvel em solventes orgânicos e quando seca é quebradiça. Possui qualidades interessantes como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, sendo, portanto, ecologicamente segura. Em adição, apresenta aderência à pele, baixo custo de produção, pois a principal fonte se baseia no subproduto da indústria de processamento de crustáceos que é desprezado. Os estudos sobre as aplicações biológicas da QUIT indicaram que ela apresenta propriedades antimicrobianas, estimula o sistema imunológico e acelera a cicatrização de feridas (HIRANO, 1990).

A quitosana, além de possuir as características supracitadas, é altamente solúvel em pH ácido, menor que 6.5, sendo um polieletrólito catiônico moderadamente básico. É um polímero versátil, adequado para aplicações na biomedicina e em outras áreas industriais

(COSTA-JÚNIOR, 2009). QUIT foi escolhida para o desenvolvimento deste trabalho pelas suas características de ser um polímero catiônico e pode interagir eletrostaticamente com nanopartículas negativas, solubilidade em água, o que permite a construção de nanocompósitos por LbL, biocompatibilidade e aderência à pele, já que posteriormente busca-se aplicação tópica da estrutura.

O poli (álcool vinílico), cuja estrutura é apresentada na Figura 2.4, é um polímero sintético resultante da hidrólise, ou hidrólise parcial, do poli (acetato de vinila). Desde 1930, possui amplos uso comercial, industrial, médico e alimentício. Suas características dependem da hidrólise, se total ou parcial. O PVA utilizado neste trabalho é 99% hidrolisado, apresentando as características gerais do PVA totalmente hidrolisado, apresentando grupos $-OH$ por toda a cadeia do polímero. O PVA é solúvel em água, biodegradável, biocompatível, não-carcinogênico (DERMERLIS, 2003), de alta aderência à pele, e é um polímero elástico (MANSUR, 2004). Devido a essas características, o PVA tem sido um polímero de grande interesse para a construção de estruturas para aplicações biomédicas, eletrônicas e na indústria alimentícia.

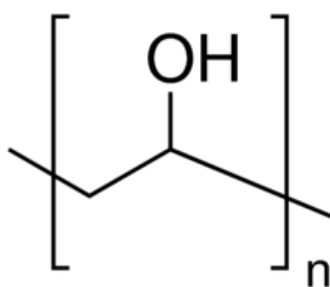


Figura 2.4. Fórmula estrutural do álcool polivinílico (PVA), que consiste de uma cadeia de carbonos saturados com grupos hidroxila.

2.3 Nanopartículas de Óxido de Ferro: Propriedades e Síntese

2.3.1 Nanopartículas de óxido de ferro (ION)

Os óxidos de ferro são compostos naturais, presentes na atmosfera, litosfera, hidrosfera e na biosfera. Os óxidos de ferro cúbicos são estruturas cristalinas constituídas por átomos de ferro e oxigênio. As ferritas cúbicas de espinélio possuem fórmula geral MFe_xO_y , onde M representa o cátion metálico divalente, podendo ser o próprio ferro, ou outros metais como níquel, cobalto, manganês, cobre ou zinco (CORNELL, 2003). Os óxidos de ferro *magnetita* (Fe_3O_4), e *maguemita* ($\gamma - Fe_2O_3$) têm sido muito investigados devido às suas múltiplas aplicações. Em adição, por meio de rotas sintéticas simples e de baixo custo esses materiais podem ser sintetizados na forma nanoparticulada, que, além de serem biocompatíveis, apresentam a propriedade de superparamagnetismo, que os credencia para aplicações biomédicas. (SOLER, 2011).

MAGNETITA

A magnetita é o mineral ferrimagnético mais abundante na crosta terrestre, encontrado em rochas ígneas, metamórficas e sedimentares, raramente encontrada na forma pura. Apresenta sistema de cristalização cúbico com estrutura do tipo espinélio inversa, cada célula unitária cúbica de face centrada formada por 32 íons de oxigênio O^{2-} . Nos sítios tetraédricos encontram-se os íons Fe^{3+} , enquanto que nos sítios octaédricos encontram-se os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} . A estrutura de espinélio inversa é caracterizada pela presença de cátions de Fe^{3+} tanto nos sítios octaédricos como nos tetraédricos, como ocorre na magnetita e maguemita.

MAGUEMITA

Assim como a magnetita, a maguemita apresenta estrutura cristalina do tipo espinélio inverso. Contudo, a última possui somente íons Fe^{3+} . A maguemita também é um óxido ferrimagnético em temperatura ambiente, cujas propriedades magnéticas dependem do tamanho das partículas. Obtém-se a maguemita através da oxidação dos íons Fe^{2+} em íons Fe^{3+} a partir da magnetita, processo que pode ocorrer naturalmente, ou ser acelerado por aumento da pressão de oxigênio e aumento da temperatura (LETTI, 2013).

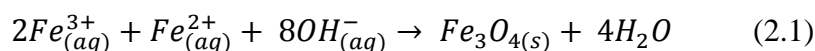
2.3.2 Síntese de nanopartículas de óxido de ferro

As nanopartículas de óxido de ferro podem ser obtidas por métodos *top-down* ou *bottom-up*, ou seja, de materiais macroscópicos diminuídos para a escala nanométrica (*top-down*) ou por rotas sintéticas nas quais as nanopartículas são sintetizadas a partir de unidades menores, os íons (*bottom-up*) (LAUREN, 2008). Dentre algumas das vias *top-down* estão a moagem de partículas micrométricas, e das vias *bottom-up* são exemplos a coprecipitação por hidrólise alcalina (MORAIS, 2006; RAMIREZ, 2013), por sol-gel (ENNAS, 1998, XU, 2007, PRAKASH, 2004) por microemulsão (CHIN, 2007 e ZHANG, 2010) e decomposição térmica (AMARA, 2009). A via de síntese escolhida influencia nas propriedades dos nanomateriais produzidos, tais como na dimensão, cristalinidade, estabilidade química e estrutural, meio no qual serão dispersos, se aquoso ou orgânico, e na polidispersão (ALCÂNTARA, 2007).

O método de coprecipitação em meio aquoso foi utilizado neste trabalho, pois produz partículas pequenas, em grande quantidade e a baixo custo, com controle razoável das dimensões, cristalinidade, morfologia das nanopartículas. (WILLARD, 2004). Os pioneiros do

método de coprecipitação são Khalafalla e Reimers (KHALAFALLA, 1973) que por esse método sintetizaram fluido magnético à base de magnetita. E em 1981, Massart e equipe produziram FM de nanopartículas iônicas, em solvente polar, que não requer a presença de surfactante para manter-se estável.

A síntese das nanopartículas por coprecipitação consiste da hidrólise alcalina de sal férrico na presença de um outro sal, que possua como componente íons de um metal de transição divalente como o próprio Fe, o Ni, o Co, ou Zn. A magnetita, Fe_3O_4 , forma-se conforme a reação química 2.1 (KANG, 1996):



Nesta reação, a precipitação total da magnetita ocorre em pH entre 9 e 14, enquanto mantém-se a proporção de $Fe^{3+}:Fe^{2+}$ em 2:1 (KANG, 1996; SOLER, 2011 A). A maguemita pode ser obtida em uma segunda etapa por meio da oxidação da magnetita.

A formação das nanopartículas por coprecipitação envolve o processo de nucleação e de crescimento cristalino. Em condições ótimas de síntese, ou seja, quando o meio está supersaturado, formam-se pequenos núcleos cristalinos. Estes crescem por difusão dos solutos na superfície dos cristais realizando o crescimento cristalino e conseqüentemente, aumentando o diâmetro das NPs. Para obter-se nanopartículas com dispersão de tamanho mais uniforme, os estágios de nucleação e de crescimento cristalino não podem se dar simultaneamente, para que não haja a formação de novos núcleos durante o crescimento cristalino, já que as NP maiores se formam pela incorporação dos núcleos menores (BOISTELLE, 1988 e GRIBANOV, 1990).

Para se obter nanopartículas pequenas é necessário controlar a taxa de nucleação e a taxa de crescimento cristalino por meio de parâmetros como pH das soluções, a temperatura da reação, a velocidade de agitação, concentração dos íons, concentração da base utilizada e a

presença ou não de surfactantes (AQUINO, 2002 e MORAIS, 2001). O método de co-precipitação foi utilizado neste trabalho para obtenção das nanopartículas de óxidos de ferro coloidais que foram empregadas como fonte de nanopartículas na deposição dos nanocompósitos.

2.4 Fluido magnético

O fluido magnético (FM), também chamado de coloide magnético, é formado por uma fase sólida, as nanopartículas de óxido de ferro, dispersas no meio líquido, e que se comporta, macroscopicamente, como uma fase líquida contínua quando submetido a um campo magnético (SOLER, 2011). Os FM foram desenvolvidos pela primeira vez pela agência espacial americana (NASA) como uma estratégia de controlar o fluxo de combustível na ausência de gravidade por meio de campo magnético (PAPELL, 1965). Entretanto, a aplicabilidade dos FM ultrapassou as aplicações aeroespaciais e expandiu-se para fins diversos, como a recuperação de áreas degradadas, e recentemente para aplicações em nanomedicina, em diagnóstico e terapia de doenças. No caso das aplicações biomédicas, as nanopartículas devem ser dispersas em meio biocompatível, comumente água ou soluções tampão.

Para os fins biomédicos e tecnológicos em geral, a estabilidade do FM é muito importante. Esta depende do tamanho e da carga superficial das nanopartículas, que tendem a agregar-se e precipitar espontaneamente devido à grande energia livre de superfície. Uma estratégia para aumentar a estabilidade do sistema é a tratar a superfície das nanopartículas a fim de obter-se um desequilíbrio entre as forças repulsivas e atrativas responsáveis pela estabilidade do FM. Algumas das forças atrativas a serem consideradas são as interações dipolar magnética e as interações de van der Waals, que podem ser compensadas por forças repulsivas,

como a repulsão eletrostática ou repulsão estérica, ou uma combinação das duas, garantindo a estabilidade ao FM.

A cobertura das nanopartículas com citrato aumenta a estabilidade do FM através da repulsão estérica e eletrostática. A repulsão estérica ocorre entre as moléculas adsorvidas na superfície das partículas, ou surfactante; este possui alta afinidade pelo solvente e impede a aproximação das partículas, pelo preenchimento de espaço entre elas. A molécula de citrato também confere à superfície das nanopartículas carga negativa, devido à presença de grupos carboxilato (Figura 2.6), o que também favorece a repulsão entre as mesmas. Portanto, o FM é estável em condições fisiológicas, de pH e salinidade, adequadas para aplicações biomédicas (MORAIS, 2006).

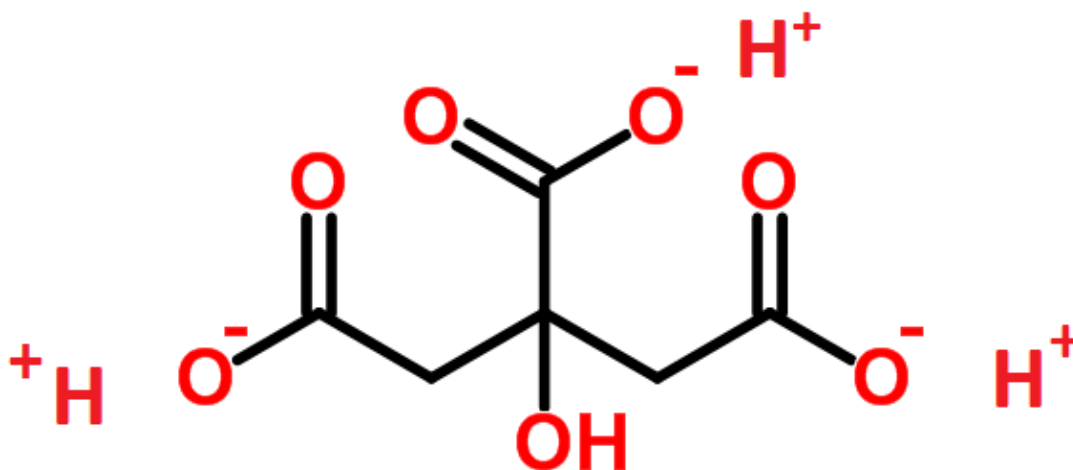


Figura 2.5. Representação da molécula de citrato em solução aquosa com pH igual a 6,9, com os grupos carboxilato.

O pH do FM pode ser ajustado, alterando a estrutura do citrato e o tipo de interações que ele pode realizar. Quando em pH fisiológico (6,9), a cobertura apresenta-se na forma de citrato como na figura 2.5, devido aos valores de pK_a dos grupos $-COOH$ da molécula. O pK_a (Equação 2.3) é uma forma de expressar K_a (Equação 2.2), a constante de

acidez, que é a constante de equilíbrio para a ionização em solução aquosa do composto AH, que será hidrolisado em ânion A^- e cátion H^+ (CAREY, 2009).

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]} \quad (2.2)$$

$$pK_a = \log \frac{1}{K_a} = -\log K_a \quad (2.3)$$

$$pH = -\log[H^+] \quad (2.4)$$

$$\text{Se } [A^-] = [HA], \quad pK_a = pH \quad (2.5)$$

Um ácido poliprótico, como o ácido cítrico (Fig. 2.6), é uma substância que pode doar mais que um próton. A perda de prótons ocorre em uma sequência de sucessivas desprotonações que são progressivamente menos favoráveis a cada desprotonação (LEE, 1999). Quando o ácido está em meio com pH superior ao valor de pK_a , ocorrerá a desprotonação, porém em solução com pH menor do que o pK_a , a molécula permanecerá protonada (BERG, 2002). Os valores de pK_a dos grupos ácido carboxílico da molécula de ácido cítrico ligados aos carbonos 1 a 3 da estrutura são: $pK_{a1} = 3,13$; $pK_{a2} = 4,76$ e $pK_{a3} = 6,40$ (HIDBER, 1996). Quando em pH 6,9 todos os grupos ácidos carboxílicos apresentam-se desprotonados porque o pH do meio é maior do que os valores de pK_a . Quando em pH 3,7 apenas um dos grupos de ácido carboxílico estará protonado, aquele com valor de $pK_{a1} = 3,13$, e este grupo poderá interagir com grupos aceitadores de prótons, formando a ligação de hidrogênio.

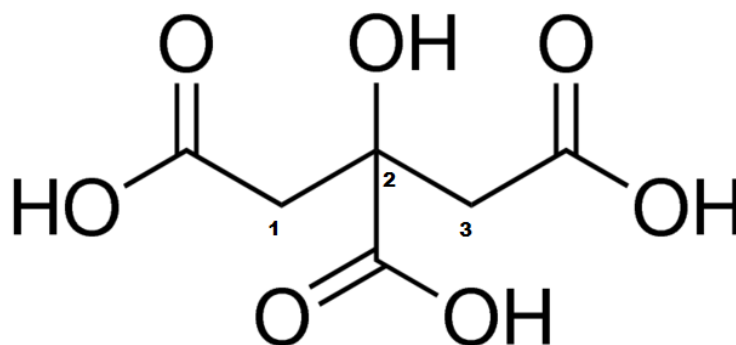


Figura 2.6. Estrutura da molécula de ácido cítrico, em solução aquosa com pH inferior a 3,13.

Quando em pH igual a 6,9, a carga negativa da cobertura das nanopartículas permite que as NPs interajam fortemente com moléculas positivas, como a quitosana, permitindo a deposição de NPs na matriz polimérica. Ao contrário, em pH 3.7, devido ao grupo $-COOH$, ligações de hidrogênio podem ocorrer com o polímero da camada subjacente, resultando na adesão das nanopartículas ao polímero.

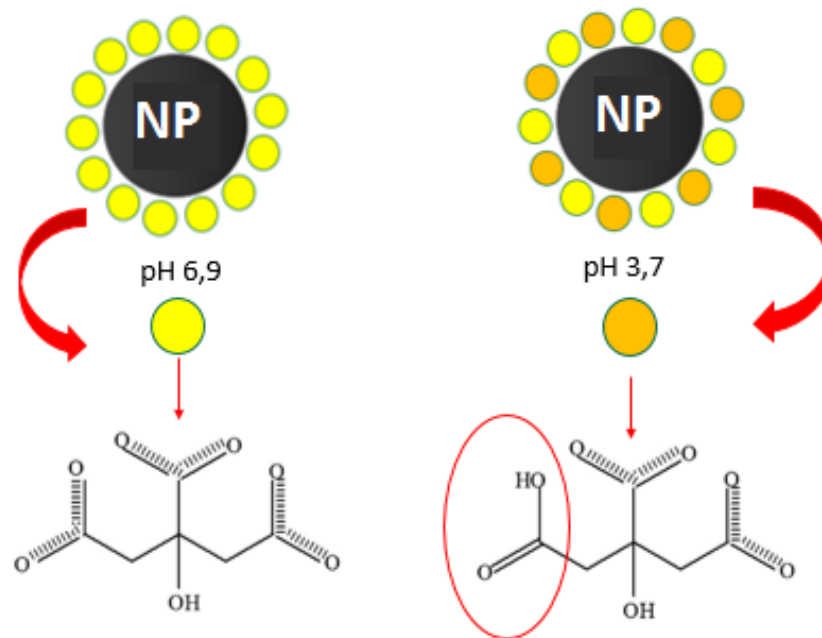


Figura 2.7. Ilustração das nanopartículas de óxido de ferro (NP) com cobertura de citrato (esferas amarelas). Quando em pH 3,7, o ácido cítrico apresenta grupos $-COOH$, representados pelas esferas alaranjadas.

A presença de grupos $-COOH$, contudo, não altera a estabilidade do fluido, e neste pH igual a 3,7, permite que ocorram ligações de hidrogênio com moléculas neutras e com grupos aceitadores de elétrons, como o PVA. Desta forma, o FM foi empregado com valores de pH distintos podendo ser utilizado para a deposição de nanocompósitos com polímeros de características distintas por meio de interações diferentes (Fig. 2.7).

Capítulo 3

Procedimentos Experimentais

3.1 Procedimentos experimentais

Os procedimentos experimentais realizados neste trabalho serão apresentados neste capítulo, bem como uma breve discussão das técnicas de caracterização que foram utilizadas.

Na produção de estruturas nanométricas, é fundamental a caracterização dos seus componentes e da estrutura final. Inicialmente as partículas coloidais foram sintetizadas e caracterizadas. Em seguida, o coloide foi empregado como fonte de partículas para a deposição dos nanocompósitos por meio da técnica LbL. O monitoramento do crescimento dos nanocompósitos foi realizado por meio de medidas de absorvância no espectro UV-vis das IONs incorporadas à matriz polimérica. Uma vez produzidos os nanocompósitos com a quantidade desejada de bicamadas, foram realizadas as caracterizações morfológicas e estruturais. A possibilidade de dissolução dos nanocompósitos quando imersos em ambientes fisiológicos, também foi investigada.

Após a síntese do FM foi realizada a sua caracterização empregando diversas técnicas, de forma a determinar as dimensões, formato, distribuição de tamanho, composição e carga das

nanopartículas. As técnicas utilizadas foram a microscopia eletrônica de transmissão (MET), espalhamento dinâmico de luz (EDL), mobilidade eletroforética, espectroscopia Raman e espectroscopia e no infravermelho (IR). O crescimento dos nanocompósitos foi monitorado por espectroscopia de absorvância no ultravioleta-visível, a morfologia e arquitetura foram estudadas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica, os nanocompósitos de quitosana e nanopartículas (QUIT/cit-MAG) foram caracterizados, também, por espectroscopia no infravermelho. Após a caracterização, os nanocompósitos foram imersos em soluções de pH controlado e salinidade crescente, visando estudar a dissolução dos nanocompósitos por meio do monitoramento da absorvância relativa às IONs por espectroscopia UV-Vis.

A toxicidade dos nanocompósitos finos em meio biológico foi investigada por meio do ensaio de citotoxicidade empregando o protocolo MTT (Brometo de 3(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio), que foi realizado plaqueando a linhagem celular NIH3T3 sobre a superfície dos nanocompósitos e, após 24 horas de incubação, foi verificada a viabilidade das células expostas aos mesmos.

A Fig. 3.1 apresenta um esquema que sumariza as técnicas de caracterização empregadas para as análises do FM e dos nanocompósitos nanoestruturados.

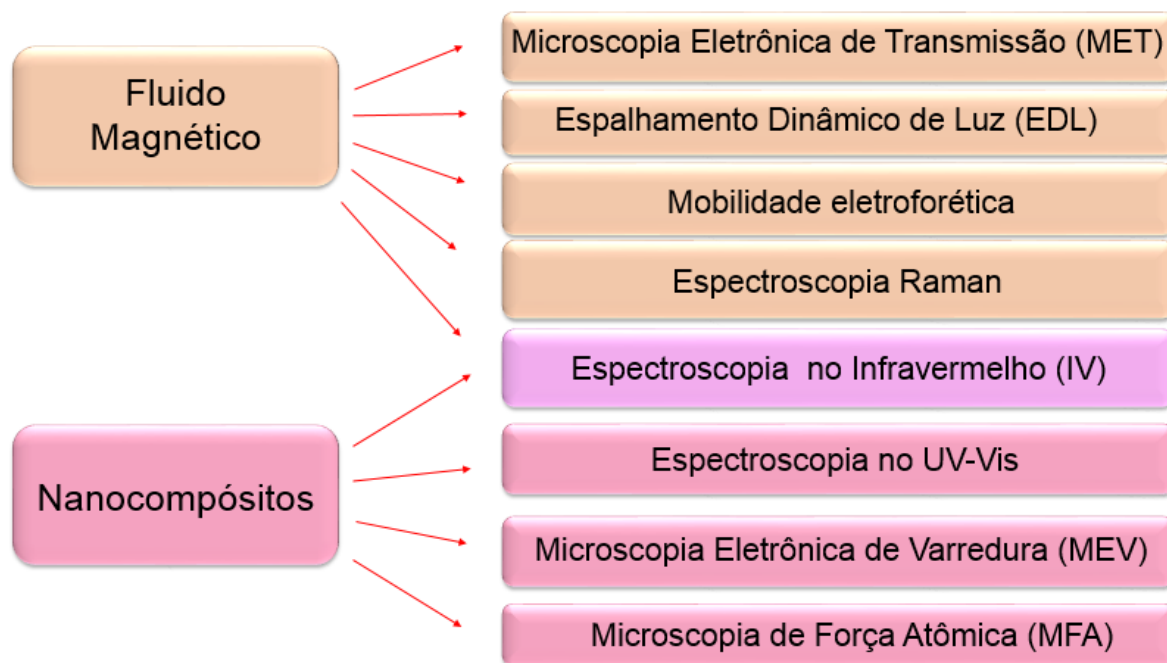


Figura 3.1. Esquema mostrando as técnicas empregadas na caracterização do FM dos nanocompósitos automontados.

3.2 Materiais

Os reagentes empregados foram o cloreto férrico ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), cloreto ferroso ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$), ácido perclórico ($HClO_4$), hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl), ácido sulfúrico (H_2SO_4), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidróxido de amônio (NH_4OH), os polímeros poli (álcool vinílico) 99% hidrolisado (C_2H_4O)_n, quitosana ($C_6H_{12}O_5N$)_n, hidrocloreto de poli (dialil dimetilamônio) ($C_8H_{16}ClN$)_n de grau analítico (P.A.) foram adquiridos da Sigma Aldrich do Brasil. Uma suspensão de óxido de grafeno foi gentilmente fornecido pelo Laboratório de Polímeros (LabPol), (Instituto de Química, Universidade de Brasília) e utilizado nas condições que foi recebida. A solução de PBS (*phosphate buffer saline*) foi preparada utilizando 137mM de NaCl, 2,7mM de KCl, 10mM de Na_2HPO_4 e 1.8mM de

KH_2PO_4 para 1l de solução concentração 1x. Os substratos de vidro óptico BK7 foram funcionalizados. A água utilizada é proveniente de sistema de purificação Milli-Q (resistividade $18M\Omega\text{ cm}^{-1}$). Foram preparadas soluções 1mg mL^{-1} de cada um dos polímeros quitosana, álcool polivinílico ou hidrocloreto de poli (dialil dimetilamônio) em água deionizada. Utilizou-se cuba de banho-maria digital, da marca Kacil BM02.

As leituras de placas de viabilidade celular empregando o protocolo MTT foram analisadas no espectrofotômetro Spectra Max M2, comprimento de onda 595nm, e pelo software Softe Max M2, no Laboratório de Genética e Morfologia (Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília).

3.3 Síntese do fluido magnético

O FM utilizado neste trabalho foi sintetizado em três etapas: a primeira se refere à coprecipitação em meio aquoso alcalino de IONS, (CASTILHO, 2014), prosseguiu-se com a funcionalização dos IONS com a cobertura de citrato e finalmente a dispersão destas em meio aquoso em pH 6,9 ou 3,7. A seguir será descrito o procedimento experimental ilustrado na Figura 3.2.

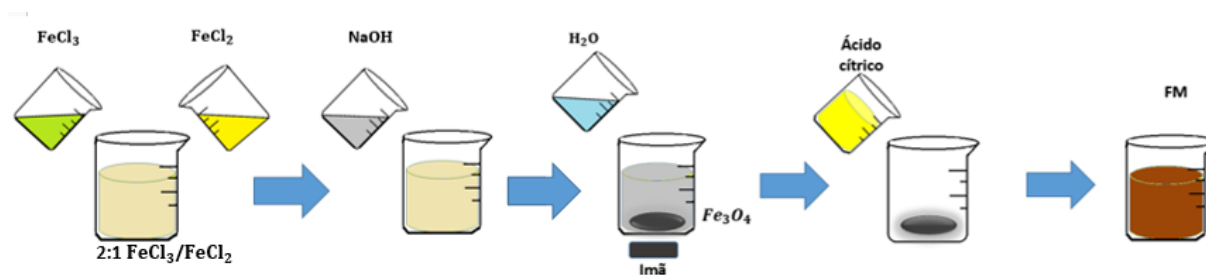


Figura 3.2. Ilustração do processo de síntese de nanopartículas de magnetita por coprecipitação alcalina, com cobertura de citrato.

As soluções aquosas de cloreto férrico ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) concentração 0,1M e cloreto ferroso ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$) com concentração 0,05M foram adicionadas à solução de hidróxido de sódio ($NaOH$), com concentração 400 mM, sob agitação e à temperatura ambiente. Observou-se a formação de um precipitado preto, indicando a formação das nanopartículas de magnetita. A solução foi deixada em decantação magnética e lavada com água deionizada e novamente separada por decantação magnética. O sólido foi adicionado, sob agitação, à solução de ácido cítrico 0,05M, pH 5,5. Em seguida a suspensão foi centrifugada para remoção dos agregados maiores. A suspensão foi, então, dializada utilizando-se membrana de celulose, com porosidade de 25Å por 24 horas em água deionizada sob agitação. A membrana de diálise permite que as moléculas de citrato não ligadas às nanopartículas passem do meio interno ao externo pelos poros. O pH de uma alíquota do FM obtido foi ajustado para pH 6,9 e a outra para 3,7, empregando-se soluções de NaOH (1M) e HCl (1M). Outra alíquota de FM foi liofilizada e empregada para a realização de análises Raman e no IV. A liofilização foi realizada no equipamento Liofilizador L101 (Liobras, São Carlos, São Paulo, Brasil), no Laboratório de Toxinologia (Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília).

3.4 Deposição dos nanocompósitos pela técnica de automontagem

Todos os nanocompósitos foram depositados pela técnica de automontagem. As caracterizações por UV-Vis, MFA e MEV foram realizadas em nanocompósitos depositados em lâminas de vidro óptico BK7 de dimensões (10mm x 25mm x 1mm) – fornecido por Opto Eletrônica S.A.

Inicialmente os substratos têm de ser limpos e funcionalizados, a fim de apresentarem cargas superficiais, de forma a possibilitar as interações entre o substrato e o material a ser depositado.

3.4.1 Preparação dos Substratos

Os substratos de vidro BK7 foram limpos com solução piranha (H_2SO_4/H_2O_2 , 3:1 v/v) altamente oxidante, a qual remove resíduos orgânicos aderidos à superfície do substrato. Após a solução piranha, os substratos são sucessivamente lavados com água deionizada ($H_2O d. i.$). Em seguida os substratos são funcionalizados com a solução RCA ($H_2O/H_2O_2/NH_4OH$, 5:1:1 v/v). Esta solução altera quimicamente a superfície do substrato, tornando-o negativamente carregado.

3.4.2 Deposição dos nanocompósitos pela técnica de automontagem

Dois tipos de nanoestruturas foram depositadas, ambas utilizaram a mesma suspensão coloidal de nanopartículas de óxido de ferro (cit-MAG) de carga superficial negativa, porém em pH distinto. Nos nanocompósitos de QUI, utilizou-se a suspensão coloidal com pH 6,9 e nos nanocompósitos de PVA, a solução coloidal com pH 3,7.

A deposição dos nanocompósitos de QUIT ocorreu da seguinte forma:

- (1) Imersão do substrato limpo e seco na solução catiônica de quitosana 1mg/ml, pH 3,7;
- (2) Lavagem do substrato em solução aquosa com pH igual ao da solução de quitosana;
- (3) Secagem da monocamada em jato de N_2 ;
- (4) Imersão do substrato na suspensão aniônica coloidal cit-MAG pH 6,9;

- (5) Lavagem do substrato em solução aquosa com pH igual ao da suspensão coloidal;
- (6) Secagem em jato de de N_2 .

O processo de alternância da imersão em solução catiônica e aniônica descrito acima forma uma bicamada e pode ser repetido de forma a se obter nanocompósitos com a quantidade de bicamadas desejada. No caso da deposição dos nanocompósitos de PVA previamente foram depositadas duas bicamadas de PDAC (pH 6,3) e óxido de grafeno (pH 10,3), seguida da deposição PVA (pH 6,9) e coloidal cit-Mag de pH 3,7, seguindo-se o mesmo procedimento empregado para a deposição da estrutura com QUIT.

As duas séries de NCs foram rotulados como (QUI/cit-MAG)_n, ou (PVA/cit-MAG)_n sendo n o número de bicamadas, que variou de 1 a 30 bicamadas.

3.5 Técnicas de caracterização

O desenvolvimento de nanoestruturas de alta qualidade, exige que as NPs, bem como os nanocompósitos, sejam devidamente caracterizados quanto às suas características morfológicas, propriedades da superfície ou cobertura.

3.5.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é a técnica amplamente utilizada no estudo morfológico de estruturas biológicas ou não, principalmente nos domínios do “muito pequeno”, além do limite de resolução do microscópio ótico (FEYMAN, 1960).

Por meio das imagens MET é possível determinar a morfologia, dimensão e dispersão de tamanho das nanopartículas. As dimensões das NPs esféricas são estimadas por meio de

histograma em função do diâmetro medido partícula por partícula nas imagens MET. Para melhores resultados estatísticos, a quantidade de nanopartículas medidas deve ser grande, próxima de mil. Na preparação do histograma considera-se uma distribuição de tamanho determinada por: $C \cong 1 + 3,22 \times \log(n)$, onde n é a quantidade de nanopartículas mensuradas e C é o número de intervalos de tamanho. Os dados do histograma são ajustados por função log-normal, $P(D)$, da qual se obtém o diâmetro médio ($D_{MÉD}$) e o desvio padrão (σ):

$$P(D) = \frac{1}{D\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{\ln(\frac{D}{D_{MÉD}})^2}{2\sigma^2}} \quad (3.1)$$

O equipamento utilizado para obtenção das imagens MET foi o microscópio de transmissão marca JEOL, modelo JEM-2100 (Jeol, Japão) do Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução - Universidade Federal do Goiás. A amostra do FM é preparada colocando-se uma gota deste em uma tela, com cobertura de carbono.

3.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é uma técnica muito aplicada nas ciências biológicas e de materiais, pois permite uma análise estrutural da superfície de materiais sólidos. Se o material não for condutor, a amostra deve receber uma cobertura com uma fina camada de ouro, ouro/paládio, platina, tungstênio, grafite, cobre, entre outros materiais condutores, processo conhecido como metalização, que inviabiliza a amostra para outro tipo de análise. Neste trabalho, as nanoestruturas foram metalizadas com uma fina camada de ouro e de platina, e as imagens foram obtidas em equipamento Jeol, JSM-7401F da Central Analítica do Instituto de Química, Centro Analítico de Instrumentação - Universidade de São Paulo (USP).

3.5.3 Microscopia de Força Atômica

A microscopia de força atômica (MFA) é uma modalidade de microscopia por sonda. Esta técnica permite o estudo da morfologia e estrutura de materiais. Sem preparo prévio da amostra e sem requerer a formação de vácuo durante a obtenção de imagens, MFA tornou-se uma técnica amplamente utilizada para estudo de materiais na nanoescala.

O microscópio é constituído de uma ponta extremamente fina (aproximadamente 10nm de raio), afixada próxima da extremidade de uma haste, um dispositivo de varredura espacial de alta resolução, um laser e um sistema de fotodetectores acoplado a um computador. No modo contato intermitente, ao realizar a varredura da superfície, as mudanças na oscilação da haste, causados pelas diferenças de interações existentes entre a ponta e a amostra, são medidas ponto a ponto permitindo ao computador gerar um mapeamento topográfico da superfície. As deflexões na haste são medidas por alterações na reflexão do laser incidente sobre a haste. À medida que a haste se deforma ao interagir com a amostra, o ângulo de reflexão do laser incidente na haste muda e estas alterações são captadas pelo sistema de fotodeteção e convertidas em uma imagem tridimensional da superfície da amostra (BARBOSA, 2015).

A superfície dos nanocompósitos automontados foi analisada empregando-se MFA, obtendo-se as imagens de topografia, a rugosidade e a espessura das amostras. Foram analisados os nanocompósitos listados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Relação dos nanocompósitos analisados por MFA.

Nanocompósitos PVA/CitMag	Nanocompósito QUIT/CitMag
<i>(PVA/CitMag)₅</i>	<i>(QUIT/CitMag)_{9,5}</i>
<i>(PVA/CitMag)₁₀</i>	<i>(QUIT/CitMag)₁₀</i>

3.5.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (EDL)

Essencialmente, o espalhamento dinâmico de luz correlaciona a difusão das partículas em um meio com o seu tamanho hidrodinâmico. O experimento de espalhamento de luz consiste na incidência de um feixe de luz monocromática na amostra, o feixe é espalhado e captado por um detector localizado em um ângulo θ , em relação ao feixe incidente. O espalhamento detectado, em determinado intervalo de tempo, é resultado da soma do campo elétrico espalhado por todas as partículas no volume iluminado. Essas partículas, por sua vez, possuem movimentos translacionais, rotacionais e vibracionais devido à excitação térmica, alterando a forma como o feixe é espalhado a cada momento. Encontram-se nas variações de intensidade do feixe espalhado, as informações estruturais e dinâmicas das partículas. Uma das inferências possíveis é que flutuações rápidas na intensidade apontam para partículas pequenas movimentando-se rapidamente na solução, enquanto que flutuações lentas na intensidade, podem ser um indicativo de partículas grandes difundindo-se na solução (BERNE, 2000). Pode-se correlacionar a difusão das partículas, determinada pelas flutuações na intensidade do feixe espalhado, com seu raio hidrodinâmico pela equação de Einstein-Stokes (BERNE, 2000):

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r_H} \quad (3.2)$$

Onde D é o coeficiente de difusão, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, η é a viscosidade do meio e r_H é o raio hidrodinâmico da partícula. Observa-se pela equação de Einstein-Stokes que quanto maior é o raio hidrodinâmico das partículas, menor é o coeficiente de difusão. O raio hidrodinâmico difere do raio das partículas obtidas por MET, pois o raio hidrodinâmico considera a cobertura, e a camada de solvatação interagindo com esta quando imersa na solução. (MONOPOLI, 2012 e WELCH, 2015).

O potencial zeta é um parâmetro que reflete a estabilidade, ou instabilidade, coloidal. Quando em suspensão, nanopartículas com carga superficial apresentam uma bicamada elétrica ao seu redor. Fortemente aderida à superfície da NP, encontra-se a camada de íons mais interna, de carga oposta à da NP. Já a segunda camada, mais externa, forma-se em torno da primeira e é fracamente ligada, permitindo a difusão de cargas. Este conjunto de camadas compreende a bicamada elétrica. Ao deslocar-se, a NP desloca a camada mais interna, ou camada de Stern, deslizando pela camada mais externa. O potencial zeta é a representação do potencial eletrostático medido no plano de cisalhamento da bicamada (CLOGSTON, 2011). Considera-se para coloides estáveis um valor do módulo de potencial zeta maior ou igual a 30 mV.

As análises de EDL e potencial ζ foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano Z90 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, Reino Unido), com excitação em 632,8nm, no Laboratório de Genética e Morfologia (Instituto de Ciências Biológicas, Universidade e Brasília).

3.5.5 Espectroscopia Raman

Ao incidir radiação eletromagnética em uma molécula, ela pode ser transmitida absorvida ou espalhada. O efeito Raman, teoricamente previsto por Smekal, em 1924, e experimentalmente comprovado por Raman em 1928, descreve o tipo de espalhamento inelástico, ou seja, aquele em que os fótons irradiados pela molécula possuem comprimento de onda diferente daquele dos fótons incidentes. Este é o espalhamento inelástico da luz, conhecido como espalhamento Raman. A diferença quantificada da energia entre o fóton incidente e o irradiado corresponde diretamente a alterações nos níveis vibracionais e rotacionais da molécula específicas para cada molécula (COLTHUP, 1964). Quando do espalhamento de um feixe de luz intenso monocromática por moléculas, uma pequena fração é emitida em uma

frequência diferente daquela da radiação incidente. O espalhamento inelástico será realizado por dipolos elétricos induzidos na amostra que oscilam quando da incidência da radiação eletromagnética. O espalhamento inelástico da luz, por sua vez, somente ocorrerá em moléculas que sofram mudanças na polarizabilidade, e o fóton espalhado possua frequência distinta do fóton incidente.

No espalhamento Raman, o fóton incidente interage com a molécula e distorce, ou polariza, a nuvem eletrônica ao redor do núcleo, formando um estado virtual instável. Por esse estado ser instável, tem duração muito curta e o fóton será rapidamente reemitido pela molécula. Caso o fóton espalhado pela molécula possua frequência igual ao fóton incidente, não ocorre transferência de energia entre o fóton e a molécula. Neste caso ocorre o espalhamento elástico, ou espalhamento Rayleigh. Contudo, se o fóton espalhado possuir frequência diferente do fóton incidente, ocorre transferência de energia do fóton para a molécula, ou da molécula para o fóton. Se a molécula absorver parte da energia do fóton incidente e for promovida a um estado vibracional ($v = 1$), o fóton espalhado possuirá frequência menor que o fóton incidente. A frequência do fóton espalhado será a frequência do fóton incidente menos a diferença entre os níveis $v = 0$ e $v = 1$, desta forma ocorre o chamado espalhamento Raman Stokes. No entanto, devido à energia térmica, algumas dessas moléculas já podem estar no estado vibracional ($v = 1$). Ao interagir com o fóton, este absorverá energia da molécula e a molécula retornará ao estado fundamental e o fóton será espalhado com frequência maior, ocorrendo o espalhamento Anti-Stokes (SKOOG, 2002) (Figura 3.3). Os espectros Raman são apresentados, portanto, como deslocamentos da frequência da luz incidente.

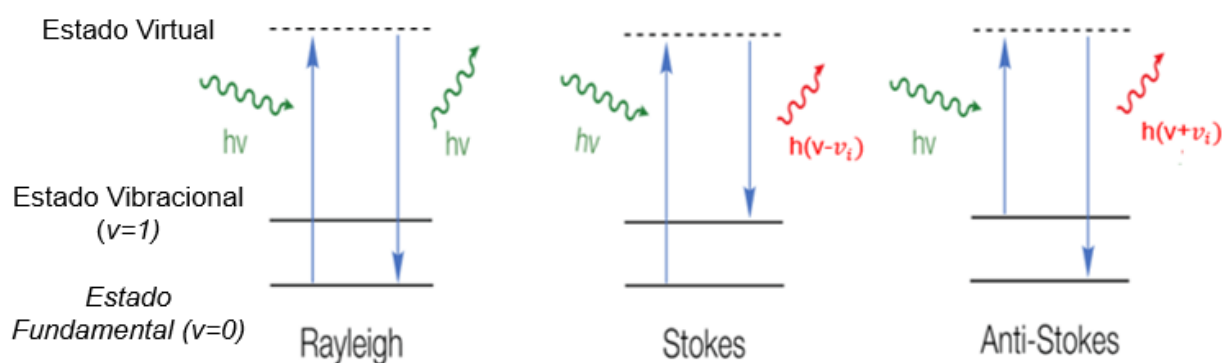


Figura 3.3. Origem dos espalhamentos Raman Stokes, e Anti-Stokes e Rayleigh.

Adaptado de Ramirez (2013).

No presente trabalho, as nanopartículas de óxidos de ferro foram analisadas em forma de pó por espectroscopia Raman, adquiridos no espectrômetro triplo T64000 com CCD, o laser utilizado foi de íon-argônio (comprimento de onda 514,5nm, intensidade incidente sobre a amostra de 0,25mW). Deste modo foi possível investigar a fase dos óxido de ferro presentes no FM sintetizado.

Segundo White (1967) e Shebanova (2003) na estrutura do tipo espinélio cúbico há 5 modos vibracionais que são Raman ativos para a magnetita, para os quais somente os íons de ferro e oxigênio do sítio tetraédrico contribuem. Os modos vibracionais para a magnetita e maguemita são apresentados na tabela 3.2, (SOLER, 2012C).

Tabela 3.2. Modos Raman atribuídos à magnetita e à maguemita, segundo referência Soler, 2012 C e Alcântara, 2007.

Material	Modo	Origem	Posição
Magnetita	A_{1g}	Estiramento simétrico Fe – O	$\approx 624cm^{-1}$
	E_g	Flexão simétrica O – Fe	$\approx 315cm^{-1}$
	T_{2g}^2	Estiramento assimétrico Fe – O	$\approx 565cm^{-1}$
	T_{2g}^1	Movimento translacional FeO_4	$\approx 179cm^{-1}$
	T_{2g}^3	Flexão assimétrica O – Fe	$\approx 445cm^{-1}$
Maguemita	A_{1g}	Estiramento das ligações em sítios octaédricos	$\approx 712cm^{-1}$
	E_g	Flexão simétrica O – Fe	$\approx 501cm^{-1}$
	T_{2g}^2	Estiramento assimétrico Fe – O	$\approx 344cm^{-1}$

3.5.6 Espectroscopia no Infravermelho

Cada molécula possui seu padrão próprio de absorção no infravermelho (IV), portanto, duas moléculas de estrutura diferente não terão o mesmo espectro. Por meio da espectroscopia no infravermelho é possível identificar os grupos funcionais presentes na molécula, e compará-las com espectros de moléculas conhecidas de forma a identificá-la ou ainda fornecer informações da estrutura da molécula.

O espectro no IV origina-se da absorção de fótons na região do infravermelho com energia igual à transição entre dois estados vibracionais da molécula no estado elementar (NAKAMOTO, 2009). Apenas moléculas que tem momento dipolo variável no tempo absorvem radiação no IV, e são IV ativas, o que não ocorre em moléculas isotrópicas, como H_2 (COLTHUP, 1964). A radiação absorvida deve ser da mesma frequência que a variação do momento dipolo (LAMPMAN, 2012). Ao absorver a radiação IV, as moléculas vibram. Os modos mais simples de vibração de uma molécula, IV ativos, são os modos de dobramento e estiramento. O estiramento altera a distância interatômica e o dobramento altera o ângulo das ligações. Em qualquer grupo de três ou mais átomos, em que pelo menos dois são idênticos, dois modos de estiramento são possíveis: o simétrico e o assimétrico. Outro ponto importante, a força de ligação e as massas dos átomos ligados afetam a absorção no IV. Pode-se então correlacionar os modos vibracionais de determinados grupos de átomos a vibrações em determinados comprimentos de onda.

A espectroscopia no IV foi utilizada para estudar a interação entre as NPs e a cobertura de citrato. As análises foram realizadas no espectrômetro Vertex 70, Bruker Corporation (Billerica, Massachusetts, EUA). As medidas de FT-IR foram realizadas com a amostra em pastilhas com KBr, medindo-se a transmitância na faixa de 350 a 4000 cm^{-1} com 64 scans e resolução de 4 cm^{-1} .

3.5.6.1 Espectroscopia no Infravermelho por refletância total atenuada (ATR)

A técnica de refletância total atenuada, ou reflexão interna, é utilizada a fim de obter-se espectros no infravermelho de materiais como sólidos de solubilidade limitada, nanocompósitos, pastas, adesivos e pós. A reflexão do feixe de radiação ocorre quando o feixe passa de um meio mais denso (cristal de ATR) para um meio menos denso (a amostra). A fração do feixe incidente que é refletida aumenta com o ângulo de incidência, e quando este excede um determinado ângulo crítico, ocorre a reflexão completa (SKOOG, 2002). Segundo Fahrenfort (1961), durante o processo de reflexão o feixe se comporta como se penetrasse por uma pequena extensão da amostra. A profundidade da penetração varia de acordo com o comprimento de onda incidente, os índices de refração dos materiais e o ângulo de incidência do feixe em relação à interface. A radiação que penetra a amostra é chamada de onda evanescente. Se a amostra absorver a radiação evanescente, haverá a atenuação do feixe nos comprimentos de onda absorvidos no infravermelho gerando o espectro, esse é o fenômeno de refletância total atenuada. As análises foram realizadas no espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier modelo Frontier da Perkin Elmer, Massachusetts, Estados Unidos. O nanocompósito QUIT/cit-MAG depositado em vidro ótico BK7 foi analisado por esta técnica, bem como a quitosana pura na forma de pó.

3.5.7 Espectroscopia no ultravioleta-visível

A espectroscopia no ultravioleta/visível (UV/Vis) é uma técnica de estudo de compostos orgânicos e inorgânicos utilizada nas mais diferentes áreas do conhecimento, como na determinação de concentração de vitaminas em suplementos, detecção da presença de DNA e proteínas em amostras biológicas. Esta técnica também pode ser utilizada para monitorar o

crescimento de nanocompósitos depositados em substratos de vidro óptico ou quartzo, correlacionando a intensidade de determinada banda de absorbância à concentração da espécie analisada. Ao analisar a banda no comprimento de onda onde a absorbância ocorre, deve-se considerar principalmente a posição e a intensidade. A posição em que ocorre a absorção no espectro corresponde ao comprimento de onda da radiação necessária para que ocorra a transição eletrônica. A expressão de intensidade de absorbância para este estudo é obtida pela lei de Lambert-Beer, que correlaciona a absorbância à concentração do material, no caso deste trabalho, das nanopartículas de óxido de ferro (LAMPMAN, 2012):

$$A = \log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right) = kcb \quad (3.3),$$

onde, A é a absorbância, I é intensidade da radiação que emerge, I_0 é a intensidade da radiação que incide na amostra, k é a constante característica do soluto, c é a concentração do soluto e b é o comprimento do caminho óptico através da amostra. Desta forma, pode-se observar que à medida que o nanocompósito era depositado e a concentração de nanopartículas aumentava, ocorria um aumento da intensidade de absorbância nos comprimentos de onda entre 400nm e 480nm, características do óxido de ferro (SCHERTMANN, 2004). O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro UV-Vis UV-2600, da marca Shimadzu Corporation (Quioto, Japão).

3.6 Estudo da citotoxicidade de nanocompósitos

Os testes de viabilidade celular são comumente utilizados para determinar os efeitos na proliferação celular e demonstrar a citotoxicidade direta de compostos quando em sistemas

biológicos *in vitro*. A escolha da linhagem celular para estudos e das condições nas quais o teste deve ser conduzido são cruciais de forma a obter-se um resultado significativo e acurado (MORAVEC, 2011). Os testes de citotoxicidade, em geral, são protocolos que comparam as células que estão vivas ou mortas ao serem expostas ao material em estudo por um tempo determinado a um grupo controle mantido sob as mesmas condições. Estes testes são muito utilizados de forma a preliminarmente prever os efeitos dos materiais *in vivo* (MORAVEC, 2011).

O teste de viabilidade celular por protocolo de MTT foi o primeiro protocolo desenvolvido para placas de 96 poços que abrange a análise simultânea de grande quantidade de amostras. Este ensaio considera o dano perpetrado pelo tratamento aplicado ao metabolismo celular de glicídeos, por meio da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A mitocôndria é a organela celular responsável pela respiração celular, caso esta não esteja funcional, a vida celular torna-se inviável. O protocolo de viabilidade quantifica por meio da reação de redução enzimática mitocondrial do reagente MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) no produto formazan (um sal de coloração arroxeadada e insolúvel). A correlação proposta é quanto maior a quantidade do produto formazan maior é a viabilidade celular e menor a citotoxicidade. (HUSSAIN, 1993 e MORAVEC, 2011).

A linhagem celular utilizada neste trabalho foi a NIH-3T3 fibroblastos de murinos, não cancerígena. Esta linhagem celular foi escolhida por ser uma linhagem de mamífero, de células aderentes possibilitando a interação com os nanocompósitos diretamente com as células. As células foram cultivadas para obter-se a quantidade suficiente para o ensaio em meio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Life USA) suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% e antibiótico (Penicilina/Estreptomicina) 1%, em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO_2 . Após crescimento, as células foram tripsinizadas e replaqueadas em 1mL em placas de 24 poços contendo as nanoestruturas. As condições do meio de cultivo e de armazenamento em

estufa foram mantidas. O ensaio foi realizado em quintuplicata, das quais três amostras foram plaqueadas com células e duas sem células, somente o meio, como controle. A relação de amostras utilizadas neste experimento está listada na tabela 3.3.

Após as 24 horas, o meio de cultivo foi descartado e acrescentou-se 700 μ L do reagente MTT, concentração 0,5mg mL⁻¹. Adicionou-se meio DMEM e a placa foi incubada nas condições anteriores por 2 horas. Após este período, a solução de MTT foi retirada das placas, e adicionou-se a todos os poços 100 μ L de DMSO. As amostras foram analisadas no espectrofotômetro Spectra Max M2, comprimento de onda 595nm, no Laboratório de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. Os dados obtidos foram processados empregando-se o teste estatístico One-way ANOVA.

Tabela 3.3. Relação dos controles (controle com lâmina e controle DMSO) e nanocompósitos (PVA_1 , $(PVA/CitMag)_{9,5}$, $(PVA/CitMag)_{10}$, $(QUIT/CitMag)_{9,5}$ e $(QUIT/CitMag)_{10}$) empregados para o teste de citotoxicidade.

Controles negativos	
DMSO	
Lâmina empregada na deposição dos nanocompósitos	
Nanocompósitos	
PVA/cit-MAG	QUIT/cit-MAG
PVA_1	$(QUIT/cit - MAG)_{9,5}$
$(PVA/cit - MAG)_{9,5}$	$(QUIT/cit - MAG)_{10}$
$(PVA/cit - MAG)_{10}$	

3.7 Dissolução dos Nanocompósitos

Os nanocompósitos das duas séries produzidas, QUI/cit-MAG e PVA/cit-MAG, foram submetidos a estudos de dissolução. Devido às diferenças de interações entre a matriz polimérica e as nanopartículas de cada um dos dois tipos, foram realizados testes de dissolução dos nanocompósitos em meio aquoso em várias condições. Buscou-se manter as condições dos testes dentro daquelas encontradas na superfície cutânea, visando uma futura aplicação tópica. Para tanto foi escolhido o ambiente em solução salina de tampão fosfato, PBS 1x, com valores

de pH iguais a 4,2, 4,9 e 5,6 (BLANK, 1939). Tendo em vista que as interações eletrostáticas participam da formação dos nanocompósitos automontados, investigou-se o comportamento dos nanocompósitos de PVA/CitMag e QUIT/CitMag também em ambientes de força iônica crescente.

Os nanocompósitos com 30 bicamadas, (QUI/cit-MAG)₃₀ e (PVA/cit-MAG)₃₀, foram imersos em soluções aquosas com concentrações de 1 a 5 mol.L⁻¹ de NaCl, pH 6,9 (HAN, 2012). Em um segundo experimento, investigou-se também o efeito de variações de pH em ambas as estruturas preparadas. Os ambientes testados foram soluções aquosas com valores de pH iguais a 3, 4, 5, 6 e 10. E ainda foram conduzidos testes em ambientes de PBS 1x com valores de pH iguais a 4,2, 4,9 e 5,6 e ainda em soluções salinas de NaCl 1M a 5M para os nanocompósitos de PVA/cit-MAG. As condições testadas encontram-se sumarizadas na tabela 3.4. Os valores de pH foram selecionados considerando-se os valores de pH cutâneo relatados na literatura (BLANK, 1939).

Em todos os testes conduzidos os dois tipos de nanocompósitos foram incubados em 5mL de solução, por até 6 horas. Em intervalos de tempo determinados os nanocompósitos foram retirados da solução, secos em jato de gás N₂ e foram obtidos espectros de UV-Vis.

Tabela 3.4. Condições de dissolução testadas para os nanocompósitos (PVA/cit-MAG)₃₀ e (QUIT/cit-MAG)₃₀.

	Solução de PBS: valor de pH	Soluções aquosas valor de pH	Soluções salinas: concentração de NaCl
PVA/cit-MAG		3	1M
	4,2	4	2M
	4,9	5	3M
	5,6	6	4M
		10	5M
QUIT/cit-MAG			1M
	4,2	3	2M
	4,9	4	3M
	5,6		4M
			5M

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Inicialmente serão apresentados os resultados obtidos a partir da caracterização do fluido magnético que foi empregado como fonte de nanopartículas de óxidos de ferro para a deposição dos nanocompósitos. Em seguida os dados do monitoramento do crescimento dos filmes, da caracterização dos nanocompósitos, bem como do ensaio de citotoxicidade e dos estudos de dissolução, serão apresentados e discutidos.

4.1 Caracterização do Fluido Magnético

Após a síntese das nanopartículas de óxidos de ferro por coprecipitação e funcionalização com ácido cítrico, o FM resultante, pH 6.9, foi caracterizado por MET, para análise da morfologia, tamanho, dispersão de tamanho, por EDL, e mobilidade eletroforética para avaliação do tamanho hidrodinâmico e determinação do potencial ζ , respectivamente. Uma alíquota do coloide foi liofilizada e o pó foi usado para obtenção dos espectros Raman e no IV. O fluido estável obtido foi denominado cit-MAG, com potencial ζ igual a -33 mV, e nanopartículas com de diâmetro hidrodinâmico de 74 nm, valores estes comparáveis aos

encontrados na literatura. (Morais, 2006 e Silva, 2003). O valor negativo do potencial ζ pode ser atribuído à presença dos grupos aniônicos $-COO^-$ das moléculas de citrato presentes na superfície das nanopartículas. É importante notar, conforme foi discutido anteriormente, que suspensões estáveis apresentam valores absolutos de potencial ζ maiores ou iguais a 30 mV, o que assegura a estabilidade do fluido sintetizado.

Observa-se na Figura 4.1 (a), imagem de MET típica das nanopartículas sintetizadas, na qual as mesmas apresentam formato predominantemente esférico. A Figura 4.1 (b) apresenta o histograma de distribuição de tamanho obtido por contagem (998 nanopartículas foram contadas) de nanopartículas obtidas em diversas micrografias. Os dados foram ajustados por meio da função log normal. O diâmetro médio (D_{TEM}) obtido foi igual a $D_{MET} = 4,75 \pm 0,04$ nm e dispersão de tamanho $\sigma = 0,28 \pm 0,01$ nm.

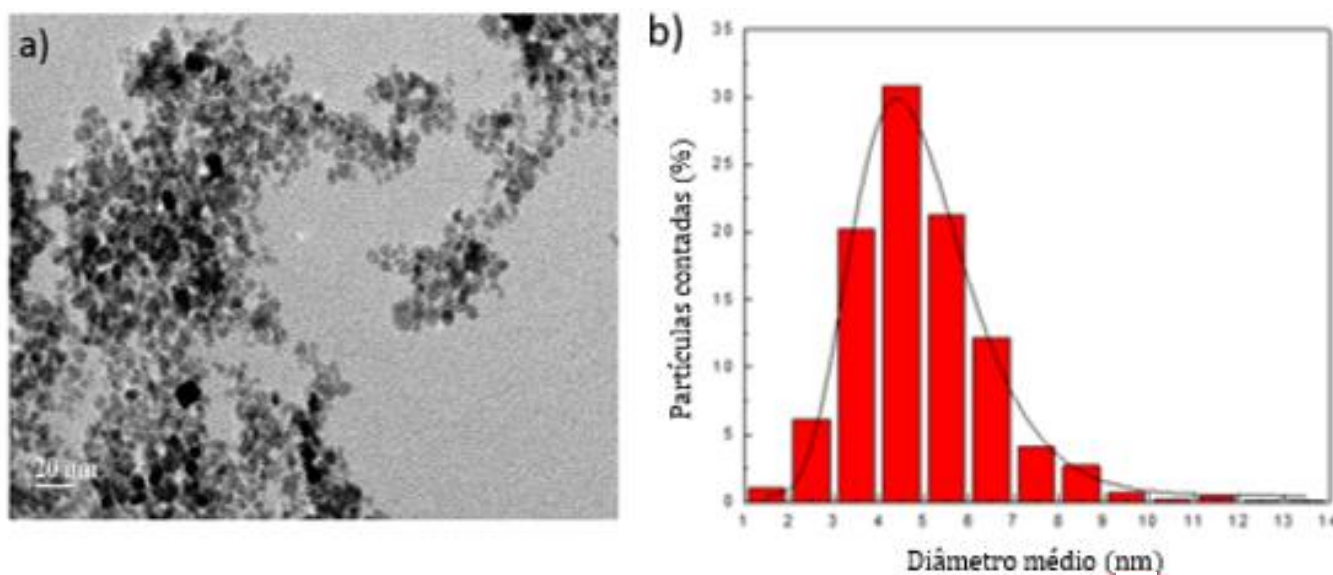


Figura.4.1 Imagem de MET típica da amostra de nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas com citrato (a); e histograma de distribuição de tamanho obtido a partir de imagens de MET (b).

A Figura 4.2 apresenta o espectro Raman típico, na faixa de 150 a 800 cm^{-1} obtido das nanopartículas de óxido de ferro cobertas por citrato, na forma de pó, sob intensidade de laser igual a 0,25mW, intensidade esta, empregada para evitar ou minimizar a degradação da amostra (SILVA, 2003 e SOLER, 2004). Observa-se na figura 4.2 a presença de modos vibracionais em 170, 332, 375, 502, 514, 672 e 719 cm^{-1} . Destes, os modos vibracionais correspondentes à magnetita, em azul, são 170, 375, 514 e 672 cm^{-1} , já os modos atribuídos à maguemita, em vermelho, são 332, 502 e 719 cm^{-1} (Soler (2012 C)). A análise do espectro Raman (Figura 4.2) indica que a amostra está levemente oxidada para maguemita, devido ao aparecimento da banda em 719 cm^{-1} , fato este que pode ter sido induzido pelo laser incidente, ou durante o processo de diálise.

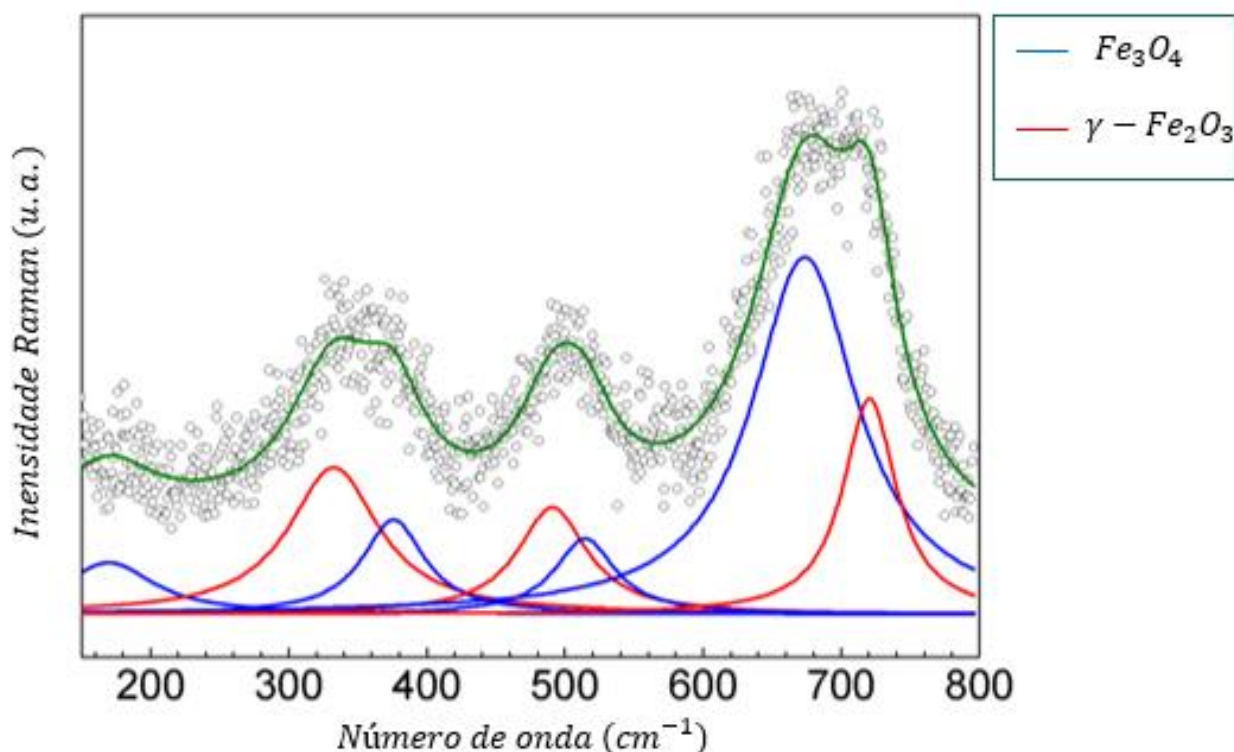


Figura 4.2 Espectro Raman típico da amostra de nanopartículas de óxido de ferro cobertas por citrato, sob intensidade do laser 0,25mW, ajustado por meio de lorentzianas.

O sólido nanoparticulado também foi caracterizado por meio da técnica de espectrometria no IF, visando investigar a presença da cobertura e a identificação das fases dos óxidos de ferro. A Figura 4.3a apresenta o espectro no infravermelho na região de 350 a 4000 cm^{-1} , onde se observa as bandas correspondentes aos óxidos de ferro, entre 400 e 600 cm^{-1} (392, 445, 585) (VIALI, 2009), uma banda intensa em 3415 cm^{-1} correspondente ao estiramento da ligação $O - H$ presente no citrato e, também, os resquícios de água na amostra. A banda característica em 1700 cm^{-1} corresponde ao estiramento simétrico da ligação $C = O$ do grupo $-COOH$ dos ácidos carboxílicos está deslocada para 1624 cm^{-1} , o que indica a presença do grupo carboxilato $-COO^-$ e segundo Racucui (2006) seria uma indicação da interação do grupo $-COO^-$ com a superfície da nanopartícula. Considerando-se a diferença ($\Delta\nu$) entre a posição da vibração assimétrica e simétrica da ligação $C = O$ do grupo $-COO^-$ A variação entre as vibrações simétrica e assimétrica do carboxilato pode-se obter um indicativo do tipo de coordenação. Para as nanopartículas sintetizadas na presença de citrato, obtém-se deslocamento de $\Delta\nu = 233cm^{-1}$ que sugere coordenação entre o carboxilato e os íons de ferro das nanopartículas do tipo monodentada (RAMIREZ-RIVERA, 2013). Na figura 4.3b, observa-se na região de 350 a 800 cm^{-1} as bandas das ligações $Fe - O$.

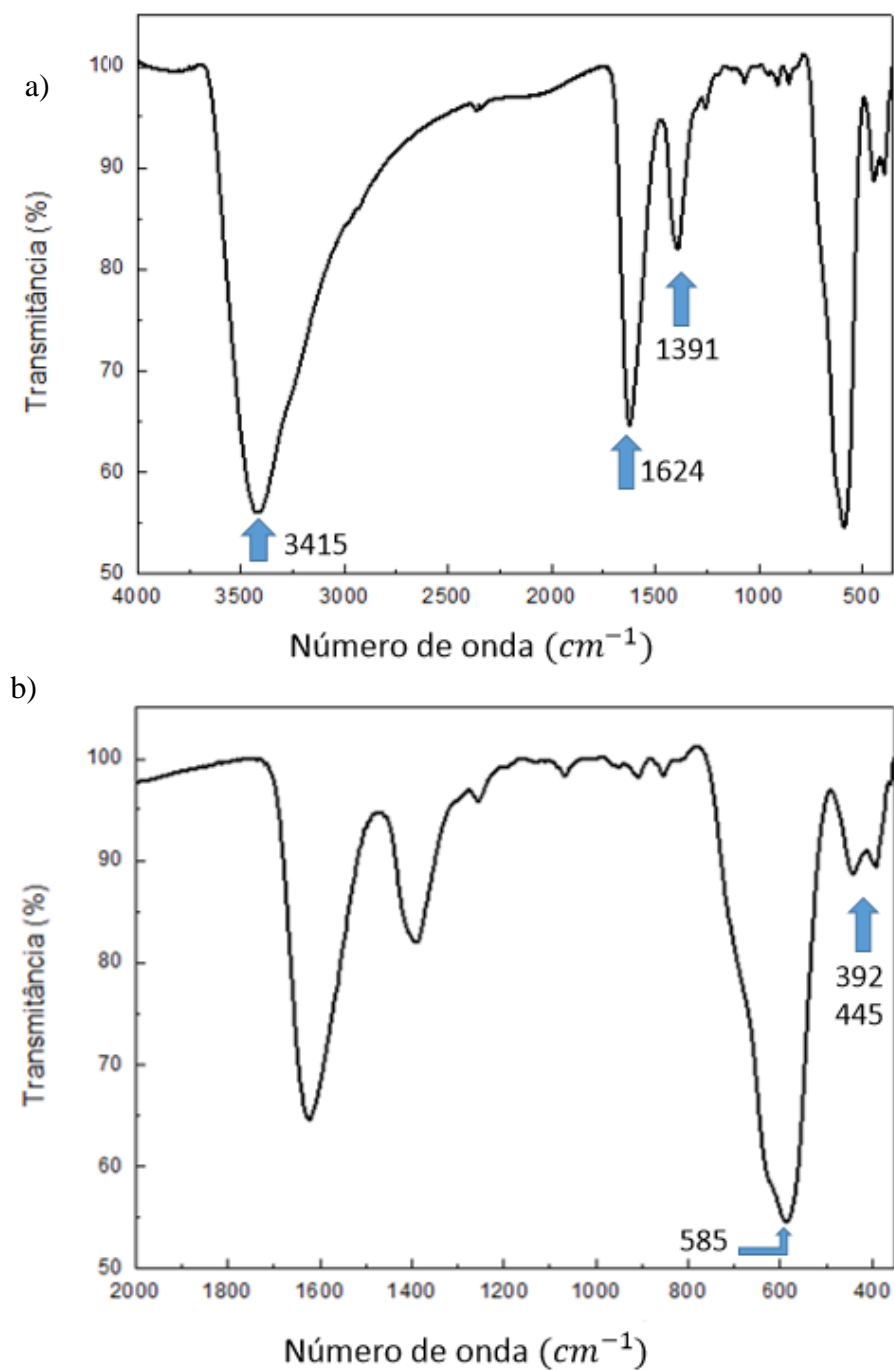


Figura 4.3 Espectro FT-IR típico da amostra de nanopartículas de óxido de ferro cobertas por citrato, em pastilha de KBr. Em (a) o espectro de 350 a 4000 cm^{-1} e em (b) espectro de 350 a 2000 cm^{-1} , região correspondentes aos óxidos de ferro.

4.2 Nanocompósitos automontados

Foram produzidas dois tipos de nanoestruturas: uma empregando o polieletrólito catiônico, quitosana (QUIT), e nanopartículas cit-MAG provenientes do FM com pH 6,9; e outra com o polímero álcool polivinílico (PVA) e o nanopartículas provenientes do FM com pH 3,7. Conforme foi mencionado, os nanocompósitos obtidos foram respectivamente denominados (QUIT/cit-MAG)_n e (PVA/cit-MAG)_n, sendo n o número de bicamadas, que variou de 1 a 30. O monitoramento do crescimento dos nanocompósitos foi realizado por meio da técnica de UV-vis, enquanto a morfologia da superfície foi estudada empregando-se as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (MFA).

4.2.1 Monitoramento de crescimento dos nanocompósitos

Os nanocompósitos preparados foram monitorados a cada bicamada depositada por meio de espectros UV-Vis na faixa de 300 à 800nm, apresentados nas Figuras 4.4 e 4.5, para as amostras (PVA/cit-MAG)_n e (QUIT/cit-MAG)_n, respectivamente, com n= 1 a 10 bicamadas para ambos os nanocompósitos. Em ambas as figuras, observa-se um leve ombro em 360nm e 480nm, característicos da absorbância UV-Vis causados pela interação da luz com os elétrons da camada de valência dos óxidos de ferro (SCHERTMANN, 1991). No gráfico inserido na Figura 4.4, estruturas (PVA/cit – MAG)_n, verifica-se um comportamento linear da absorbância em 360nm e 480nm na deposição de 10 bicamadas, indicado pelo ajuste da reta $y=0,072 +0,03x$, na absorbância em 360nm; e absorbância em 480nm, $y=0,048+0,004x$ ($r^2=0,93$).

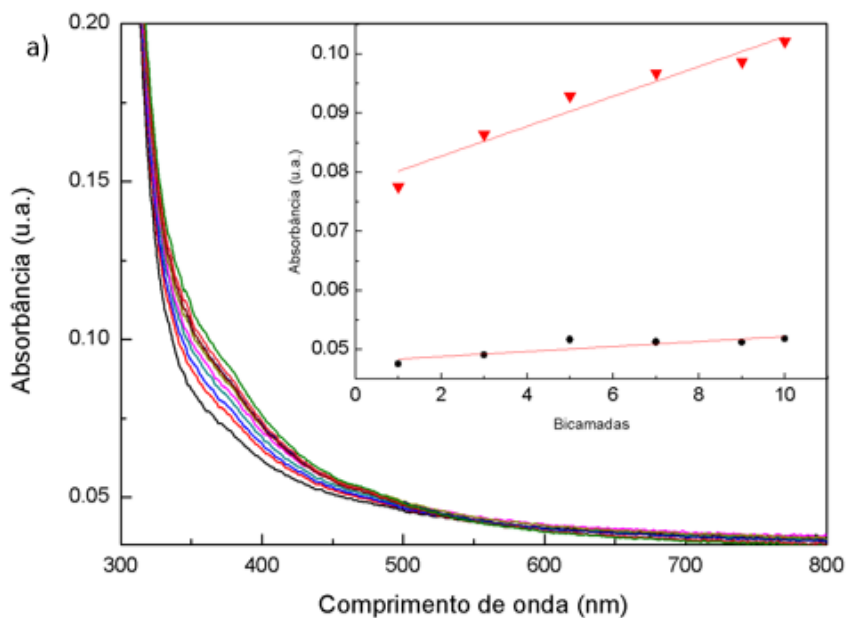


Figura 4.4. Monitoramento por espectroscopia UV-Vis do crescimento de nanocompósitos (PVA/cit-MAG)_n, de 10 bicamadas. A Figura inserida se refere aos valores obtidos da absorbância em 360nm (triângulos) e 480nm (círculos), em função do número de bicamadas.

Nos nanocompósitos de quitosana (Figura 4.5) observa-se deposição de nanopartículas de óxidos de ferro camada por camada linear, ado pelos ajustes $y=0,034+0,010x$ (360nm) e $y=0,032+0,002x$ (480nm) ($r^2=0,93$), em acordo com dados da literatura (Castilho,2014). Observa-se a absorbância dos óxidos de ferro é maior que nos nanocompósitos QUIT/cit-MAG do que nos nanocompósitos de PVA/cit-MAG.

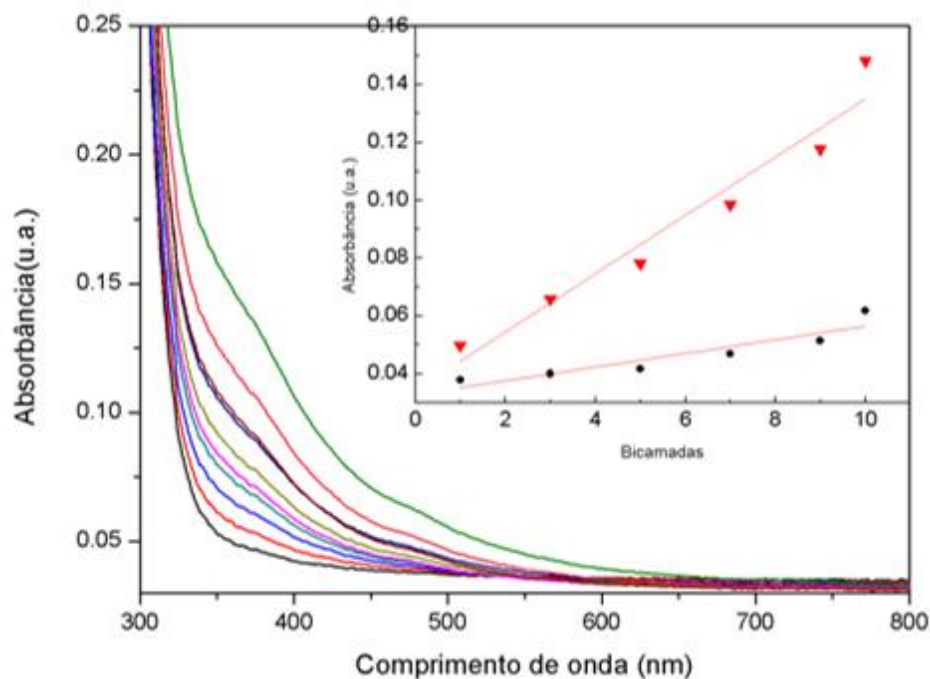


Figura 4.5. Monitoramento do crescimento de nanocompósitos (QUIT/CitMag)_n, em de 1 a 10 bicamadas,. A Figura inserida se refere aos valores obtidos da absorbância em 360nm (triângulos) e 480nm (círculos) em função do número de bicamadas.

A quitosana é um polieletrólito e possui carga positiva quando em pH 3,7, devido à presença do grupo $-NH_3^+$, enquanto que as nanopartículas cit-MAG apresentam grupos $-COO^-$ quando em pH 6,9 devido ao pK_a da molécula de ácido cítrico presente na superfície. Os nanocompósitos automontados de quitosana geralmente são depositados devido a interações eletrostáticas, entre os materiais, onde o polímero se comporta como um polycation, enquanto a nanopartícula como um polianion. Em adição, grupos $-OH$ presentes no polímero quitosana poderiam ligar-se aos grupos $-COO^-$ do citrato por meio de ligação de hidrogênio, tornando a nanoestrutura ainda mais estável (PAVINATTO, 2010). Conforme foi mencionado, o nanocompósito cresce de forma linear, depositando a cada camada quantidades similares dos constituintes do nanocompósito, formando uma estrutura homogênea, conforme indicam os estudos morfológicos.

No caso do monitoramento da deposição dos nanocompósitos (PVA/cit-MAG)_n observa-se resultado diferente daquele observado na estrutura (QUIT/cit-MAG)_n. Segundo Castilho (2014), seus resultados mostraram que ao tentar depositar os nanocompósitos (PVA/cit-MAG)_n empregando como fonte de nanopartículas um coloide com pH 6.9 a estrutura automontada apresentava crescimento irregular. Neste projeto, optou-se por acidificar o fluido magnético de forma a permitir a protonação dos grupos $-COO^-$ do citrato, em pH 3,7, verificando-se a deposição do nanocompósito. Como pode ser observado na Figura 4.4, o nanocompósito de PVA/cit-MAG a absorvência aumenta linearmente camada após camada.

4.2.2 Caracterização do nanocompósito QUIT/CitMag por espectroscopia no infravermelho por refletância total atenuada

O nanocompósito QUIT/cit-MAG foi investigado por meio da técnica refletância total atenuada (RTA) no infravermelho. A figura 4.6 mostra os espectros RTA da quitosana pura na forma pó e do nanocompósito (QUIT/cit-MAG)₃₀, com as nanopartículas formando a camada superficial, e também o espectro FTIR, previamente apresentado de cit-MAG (Fig. 4.3).

Segundo Duarte (2002), as bandas de referência para a quitosana são as de estiramento das ligações OH (3448cm^{-1}) e CH (2877cm^{-1}), NH (3269cm^{-1}) e do estiramento da ligação CO (1074 e 1025cm^{-1}) e segundo Suyatma (2004) encontram-se bandas em 1650 e 1560cm^{-1} do grupo amida. A quitosana utilizada neste trabalho foi analisada por RTA e apresenta as bandas a seguir: em 3360 , 3450 e 3290 (estiramento da ligação $N-H$ e $O-H$), 2874 (estiramento $C-H$), 1648 (estiramento da ligação $C=O$ do grupo amida), 1587 (dobramento $N-H$), 1462 (dobramento assimétrico CH_3), 1420 (deformação da ligação $O-H$ e $C-H$ do anel), 1380 (estiramento da ligação $C-N$ e deformação simétrica CH_3), 1320 (deformação da ligação $O-H$ e $C-H$ do anel), 1262 (balanço da ligação $C-H$ no anel) e 1027 (vibração da

ligação $C - O - C$), as vibrações próximas a 800 cm^{-1} correspondem ao estiramento da ligação $N - H$ fora do plano (SAMUELS, 1981; RODRIGUES, 2009).

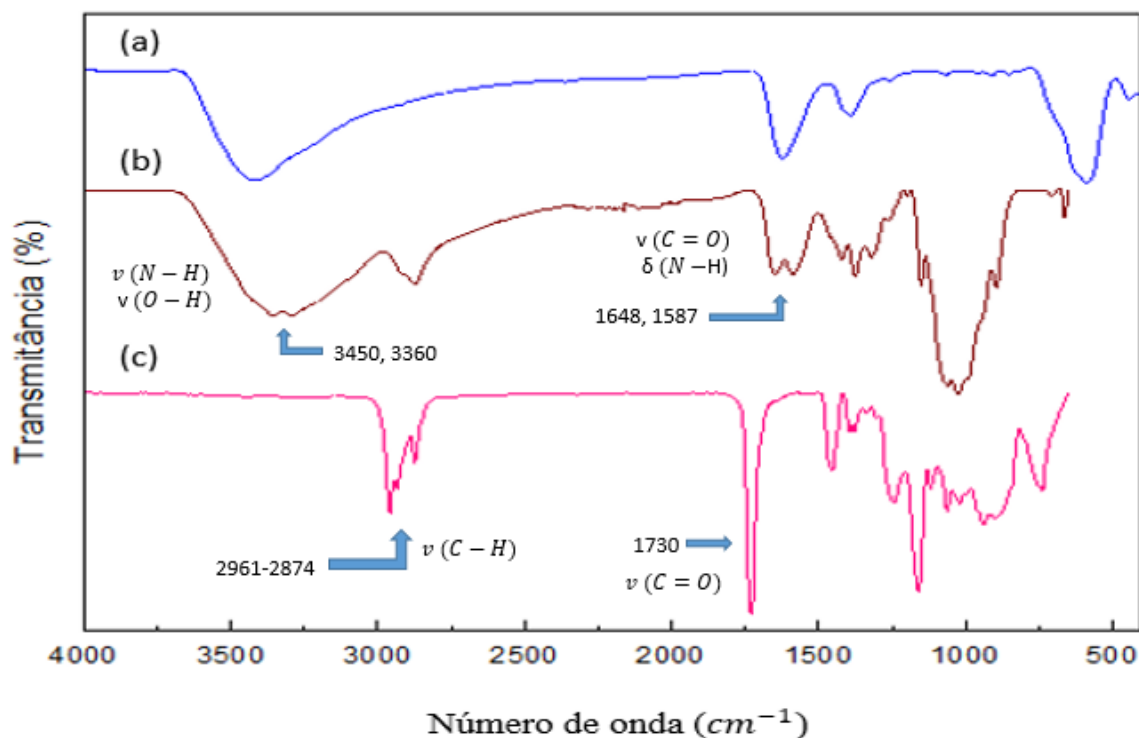


Figura 4.6. Espectro no infravermelho de cit-MAG (a) e no infravermelho por RTA da quitosana pura (b), em (c) do nanocompósito (QUIT/cit-MAG)₃₀.

A atribuição das bandas dos espectros relativos à quitosana pura e ao nanocompósito (QUIT/cit-MAG)₃₀ estão apresentadas na Figura 4.6, bem como o espectro FTIR das nanopartículas de óxido de ferro cobertas com citrato. As bandas correspondentes aos óxidos de ferro aparecem no espectro do sólido nanoparticulado em 585 cm^{-1} , no espectro do nanocompósito, no entanto, não foi possível a obtenção do espectro nesse número de onda devido ao limite de resolução do equipamento. As bandas presentes em 1623 cm^{-1} do citrato e em 1648 e 1587 cm^{-1} da quitosana, atribuídos ao estiramento da ligação $C = O$ e ao dobramento da ligação $N - H$ do grupo amida, respectivamente, estão

deslocados para 1730cm^{-1} , formando um único pico estreito e intenso. As bandas presentes na quitosana pura entre 3360 e 3290cm^{-1} e em 3415cm^{-1} em cit-MAG não estão presentes em (QUIT/cit-MAG)₃₀, respectivos aos estiramentos das ligações $O - H$ e $N - H$ do grupo amina primária. Este fato pode ser relevante para possibilitar uma análise sobre a formação do nanocompósito (QUIT/cit-MAG)₃₀. Os grupos $-OH$ do citrato da cobertura da nanopartícula poderiam interagir com o grupo amina primária presente na quitosana por meio de ligações de hidrogênio tornando a estrutura muito mais estável quando encubada em soluções com condições de variação de pH e concentração de íons do que poderia se esperar. Os resultados descritos por Shu (2001), que estudou nanocompósitos automontados de camadas de quitosana e citrato, mostraram que estes são sensíveis a variações no pH e à variação da concentração de íons, dissolvendo-se. Neste trabalho, no entanto, foram utilizadas nanopartículas cobertas com citrato que, por sua vez, estão interpenetradas na matriz polimérica. Uma das características das nanopartículas é o aumento da superfície/volume, conseqüentemente haverá maior superfície de citrato em contato com a quitosana, favorecendo o surgimento de ligações de hidrogênio entre elas, e, portanto, aumentando a estabilidade estrutural conforme observou-se nos resultados dos experimentos de dissolução que serão apresentados a seguir. As bandas encontradas nos espectros RTA das amostras de quitosana pura e nanocompósito (QUIT/cit-MAG)₃₀, e os dados de FTIR das nanopartículas de óxido de ferro cobertas com citrato estão sumarizados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Relação dos modos vibracionais observados nos espectros RTA no infravermelho obtidos da quitosana pura e do nanocompósito (QUIT/cit-MAG)₃₀ e dos espectros FTIR do sólido nanoparticulado cit-MAG, cujas atribuições foram realizadas a partir de dados da literatura (Brugnerotto, 2001; Duarte, 2002; Suyatma, 2004; Samuel, 1981 e Racucui, 2006; Rodrigues, 2009).

Espectro	Espectro	Espectro	Espectro	Espectro	Atribuições
Quitosana	Quitosana	Quitosana	de	nanocompósito	
Modos	RTA	RTA	de	nanocompósito	
vibracionais	SAMUELS	Rodrigues	CitMag	QUIT/CitMag	
RTA	1981 ¹	2009 ²	cm^{-1}	cm^{-1}	
cm^{-1}	cm^{-1}	cm^{-1}			
3450	-	-	3415	-	<i>Estiramento da ligação O – H</i>
3360	-	-	-	-	<i>Estiramento da ligação² O – H e N – H</i>
3290	-	3250	-	-	<i>Estiramento da ligação² O – H e N – H</i>
2874				2961, 2935, 2874	<i>Estiramento da ligação C – H</i>
				1730	Vibração simétrica da ligação C = O (citrato)
1648	1650	1634	1623		Amida I (C = O) ^{1,2}
					Vibração simétrica da ligação C = O (citrato)
1587	1580				Dobramento N – H ¹
	1530	1538			Amida II
					<i>dobramento ligação</i>

				$(N - H)^{1,2}$
1462	1455		1464, 1453	Dobramento assimétrico $-CH_3^1$
1420	1415			Deformação da ligação OH e CH (anel) ¹
1380	1375	1391	1395, 1379	Deformação simétrica CH_3^1 Estiramento $C - N$ Estiramento assimétrico da ligação $C - O$ citrato
1320	1320		1334, 1300	Deformação OH e CH (anel) ¹
1262	1255		1243	Balanço ligação de CH da estrutura de anel
1027	1020		1020	Vibração $C - O - C$
		585		$Fe - O$

4.2.3 Caracterização morfológica da superfície dos nanocompósitos por meio de microscopia eletrônica de varredura e microscopia de força atômica

A análise da morfologia dos nanocompósitos depositados em função da monocamada presente no topo do nanocompósito, se polímero (n=9,5) ou cit-MAG (n=10) foi realizada por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura. As figuras 4.7 (a) e (b) mostram imagens MEV de nanocompósitos de $(PVA/cit-MAG)_n$ com n= 9,5 e 10, respectivamente

depositados em substratos de vidro BK7, ampliadas 10.000 vezes. Neste aumento, observa-se na micrografia (PVA/cit-MAG)_{9,5} a presença de bastões distribuídos sobre a superfície do nanocompósito, por isso foi descartada a possibilidade de serem artefatos, porém são estruturas inconsistentes com o esperado para a superfície do polímero. Em (b), observa-se aglomerados esféricos distribuídos na superfície. Para as imagens com aumento de 50.000 vezes (Figuras 4.8 (a) e (b)), é possível observar as nanopartículas esféricas distribuídas na matriz polimérica, sem a separação de fase, em uma distribuição homogênea de nanopartículas muito similares. Em 4.8(a), também se verifica a presença dos bastões, e de aglomerados.

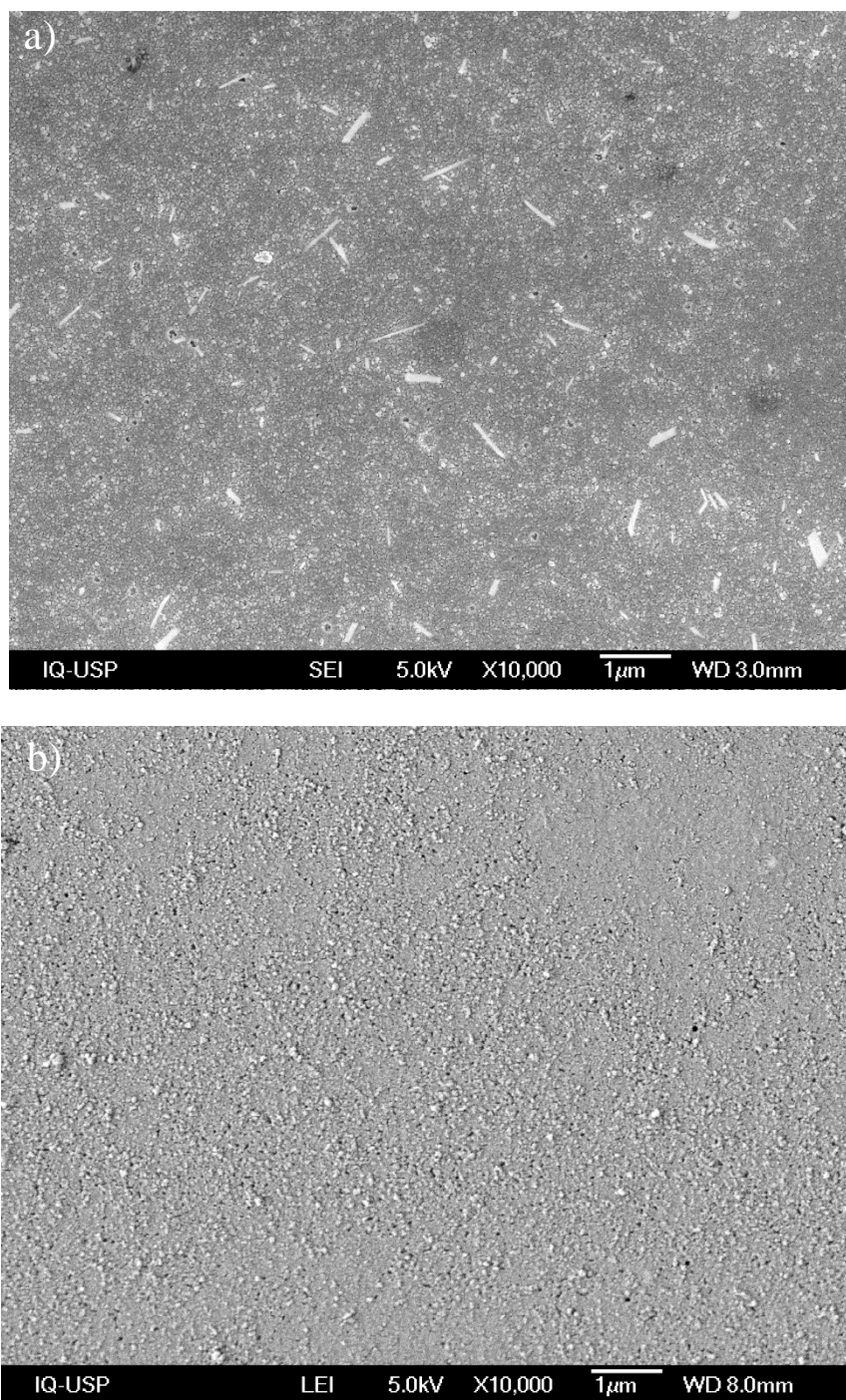


Figura 4.7. Imagens de MEV de nanocompósitos (PVA/cit-MAG) depositados em vidro BK7, ampliadas 10.000 vezes. A imagem do nanocompósito (PVA/cit-MAG) com 9,5 bicamadas, com polímero na camada superior (a) e do nanocompósito (PVA/cit-MAG) com 10 bicamadas, com nanopartículas na camada superior (b).

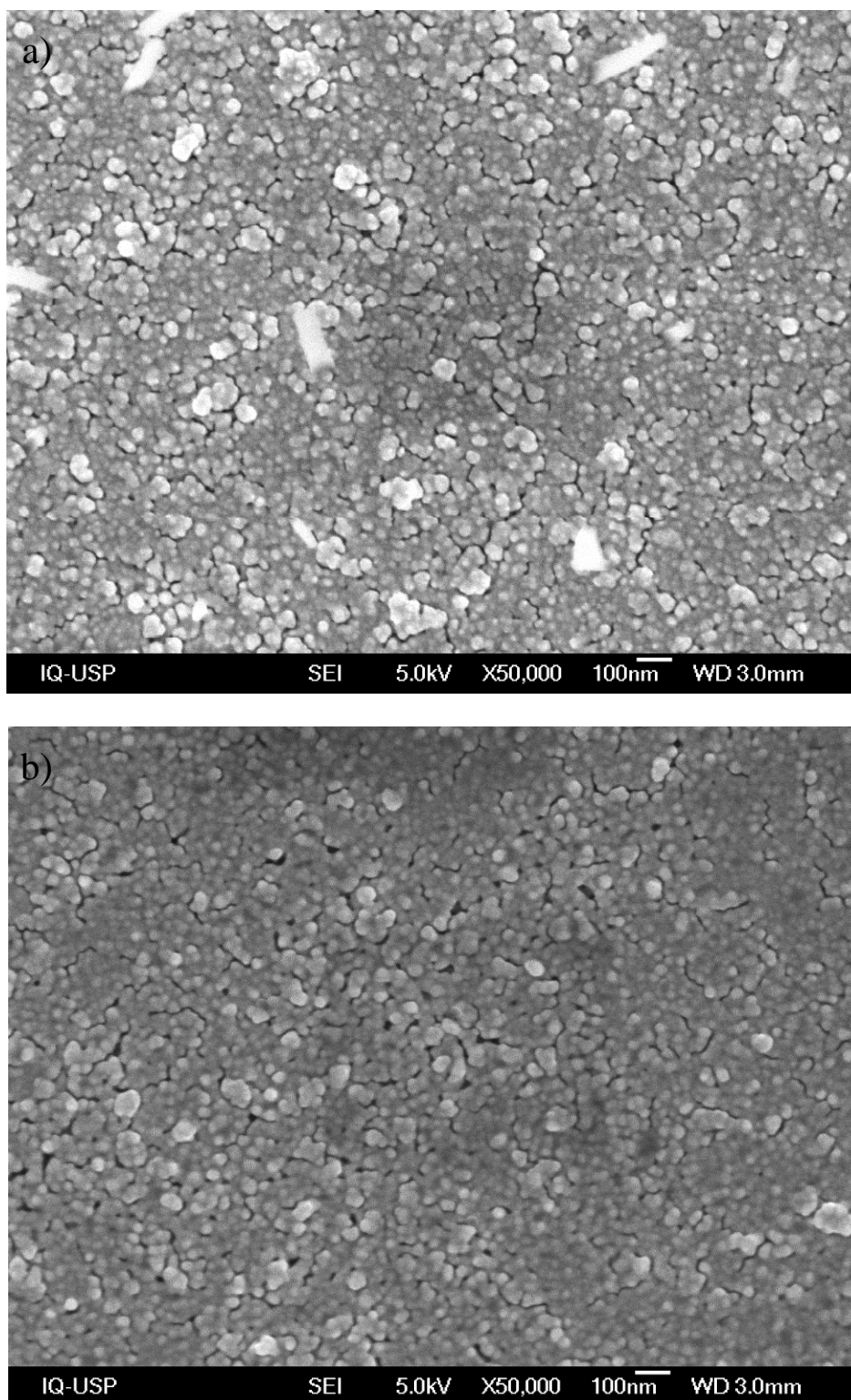


Figura 4.8. Imagens de microscopia de varredura de nanocompósitos (PVA/cit-MAG) depositados em vidro BK7 ampliadas 50.000 vezes. A imagem do nanocompósito de (PVA/cit-MAG)_{9,5} com polímero na camada superior (a) e do (PVA/cit-MAG)₁₀, com nanopartículas na camada superior de nanopartículas (b).

A topografia das estruturas também foi estudada por MFA. As estruturas investigadas foram as de $(PVA/citMAG)_n$, com $n = 5$ e 10 bicamadas, cujas imagens MFA de amplitude e de fase são observadas na Figura 4.9. Observa-se nas imagens estruturas esféricas, evidenciando a presença de aglomerados de nanopartículas em maior quantidade nos nanocompósitos de 10 bicamadas, inseridas na matriz polimérica. Verifica-se a interpenetração das nanopartículas com a matriz polimérica. Em adição, as imagens apresentadas da estrutura de 10 bicamadas aparentam maior uniformidade.

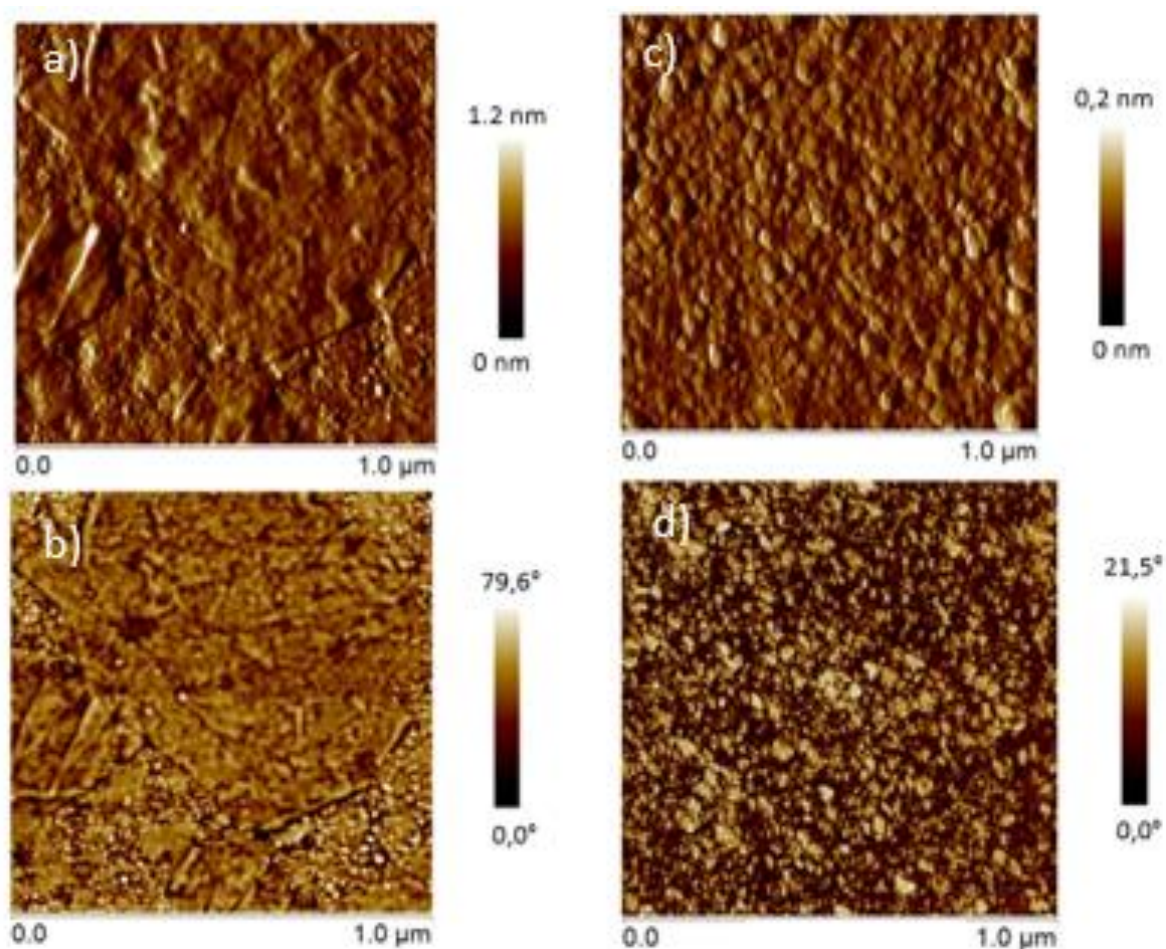


Figura 4.9. Imagens MFA de topografia (a) e (c) e fase (b) e (d) de nanocompósitos $(PVA/cit-MAG)_n$, com $n=5$ em (a) e (b) e com $n=10$ bicamadas em (c) e (d).

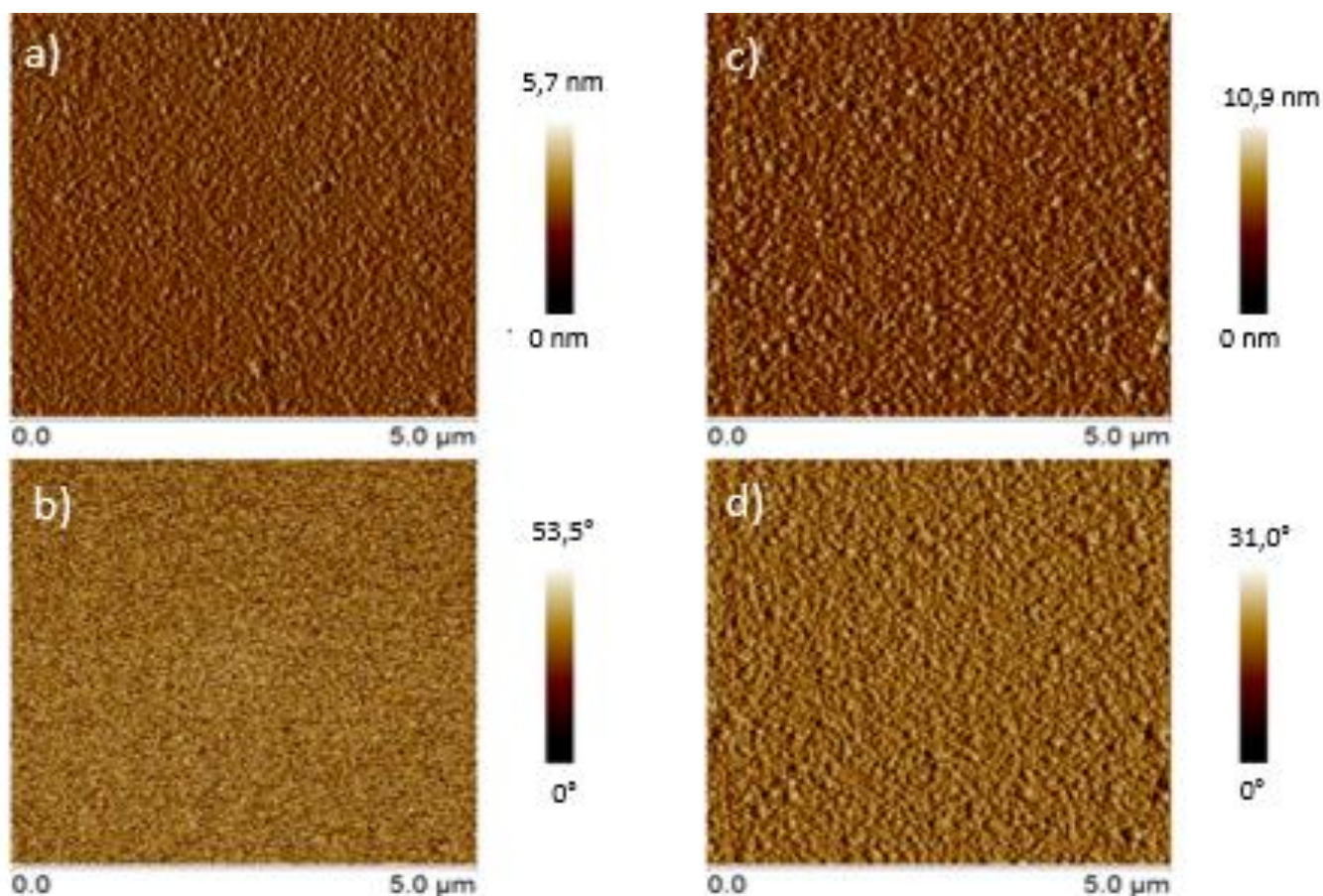


Figura 4.10. Imagens MFA de topografia (a) e fase (b) do nanocompósito (QUIT/cit-MAG)_{9,5} e de topografia (c) e fase (d) do nanocompósito (QUIT/cit-MAG)₁₀.

Os nanocompósitos QUIT/cit-MAG apresentam estruturas esféricas homogeneamente distribuídas nos nanocompósitos, com presença de alguns aglomerados, principalmente no nas amostras com 10 bicamadas. As imagens retratam a superfície dos nanocompósitos como uma cobertura densa e uniforme, como a observada em (PVA/cit-MAG)₁₀. Observa-se as estruturas esféricas uniformemente distribuídas na fase polimérica.

Nas imagens de AFM para (PVA/cit-MAG)₅ (Figura 4.9) observa-se menor quantidade de aglomerados de nanopartículas nas e maior quantidade para a amostra com maior número de bicamadas (PVA/cit-MAG)₁₀.

A espessura dos nanocompósitos PVA/cit-MAG foi determinada por análises de MFA, seguindo-se a metodologia apresentada por Lobo (1999). As espessuras estimadas em função do número de bicamadas para $(PVA/cit-MAG)_n$, com $n=1; 1,5; 3; 5$ e 10 bicamadas, são apresentados na Figura 4.11.

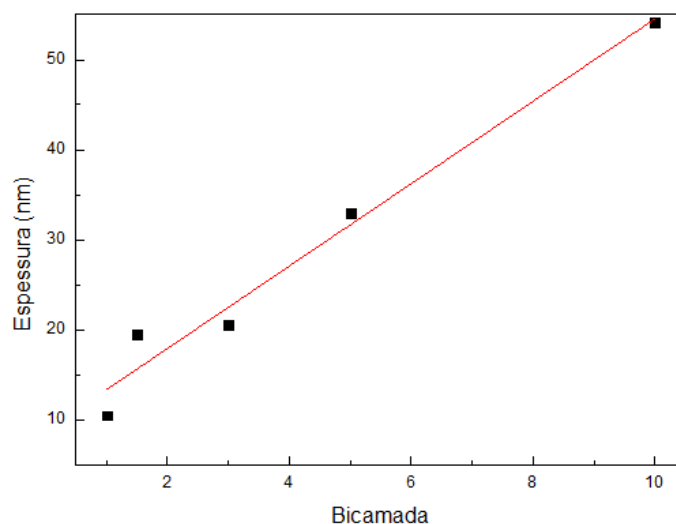


Figura 4.11 Dados de espessura em função do número de bicamadas dos nanocompósitos de $(PVA/cit - MAG)_n$, com $n = 1; 1,5; 3; 5$ e 10 , estimados por meio das imagens de MFA. O ajuste linear foi realizado, obtendo-se $y=8,77+4,58x$ ($r^2=0,97$).

As nanoestruturas PVA/cit-MAG foram depositadas por meio da técnica de automontagem, empregando como fonte de NPs o FM com pH igual a 3,7 apresentou crescimento linear para até 10 bicamadas conforme o monitoramento por espectroscopia UV-Vis, e aumento de espessura, nanocompósitos. Nesse pH a cobertura das NPs possui grupos $-OH$ disponíveis que podem interagir com o grupo $-OH$ do polímero PVA. Os nanocompósitos PVA/cit-MAG apresentam morfologia similar aos dos nanocompósitos QUIT/cit-MAG, nos quais o polímero e as nanopartículas não apresentam segregação de fase, com as nanopartículas distribuídas na fase polimérica.

4.2.4 Teste de citotoxicidade

Os testes de viabilidade celular reproduzem de forma simplificada, porém, eficaz algumas das reações ocorridas em tecidos e órgãos quando expostos a diversas substâncias. Algumas dessas reações celulares são o desenvolvimento normal/anormal, proliferação, alterações morfológicas, alterações genéticas ou até a morte célula, e por meio destas pode-se determinar a citotoxicidade do nanomaterial. Portanto, a determinação da toxicidade do material, como o aumento de mortalidade celular, é um dos primeiros passos a serem investigados visando possíveis aplicações biológicas de nanomateriais. De modo a determinar a toxicidade é necessário considerar o tipo de material a ser testado (existem evidências da toxicidade do material como um todo ou de elementos formadores deste) de que forma o material irá interagir com as células (se ficará em suspensão no meio, se as células incorporarão o material, se irão aderir à superfície), se o material é degradado em meio celular (o pH, concentração de sais, proteínas, enzimas, alterarão de alguma forma o material) e finalmente, se o tipo celular escolhido é pertinente para o estudo (o tipo celular testado é aquele com o qual o material poderá interagir) ao considerar estes pontos o teste mais apropriado pode ser conduzido.

Para este trabalho foram escolhidas as células NIH3T3, fibroblastos da espécie *Mus musculus*, células não-tumorais e aderentes, para realizar um teste de citotoxicidade empregando o protocolo MTT em nanocompósitos dos dois tipos produzidos (PVA/cit-MAG) e (QUIT/cit-MAG), com diferenças na monocamada final, formada por polímero ou por nanopartículas, no qual a célula deve aderir. A linhagem celular NIH3T3 foi escolhida devido à sua capacidade de aderir ao substrato onde é plaqueada e com ele interagir. Como controles negativos foram utilizados, em cultura de células, a substância DMSO (dimetil sulfóxido),

solvente amplamente utilizado em formulações farmacêuticas e, principalmente, na criopreservação de células devido à sua capacidade de permear pela membrana plasmática, e em baixas concentrações (menores que 1%) considerada atóxica (GALVÃO, 2014). O ambiente de cultivo celular foi mantido em pH próximo de 7, na presença de proteínas, íons, verificando-se o efeito da estrutura como um todo no teste de viabilidade celular.

O teste de viabilidade celular por protocolo de MTT considera o dano perpetrado pelo tratamento aplicado ao metabolismo celular de glicídeos, por meio da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A correlação proposta é quanto maior a redução do MTT em formazan, maior será a atividade das enzimas mitocondriais em células viáveis, mais arroxeadado será o poço onde essas células se encontram e maior será a intensidade do sinal lido no espectrofotômetro (HUSSAIN, 1993).

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando-se lamínulas de vidro para microscopia como substrato para o crescimento dos nanocompósitos. Os nanocompósitos foram preparados conforme previamente descrito, e incubados em placas de 24 poços com células humanas da linhagem NIH3T3, fibroblastos de murinos, e mantidos em estufa a 37°C por 24 horas. A Figura 4.12 apresenta os dados de viabilidade celular após a incubação com DMSO, controle positivo, tratamento com uma lamínula limpa, controle do substrato, e tratamento com as estruturas $(PVA/cit - MAG)_{10}$, $(PVA/cit - MAG)_{9,5}$, $(QUIT/cit - MAG)_{10}$, $(QUIT/cit - MAG)_{9,5}$ e PVA_1 , estrutura construída apenas com uma monocamada de PVA sobre as camadas precursoras de (PDAC/GO).. As estruturas com 10 bicamadas possuem a camada superior composta por nanopartículas de óxidos de ferro e as estruturas com 9,5 bicamadas, o polímero encontra-se na superfície. A utilização de uma linhagem celular aderente permite a interação direta com a superfície do nanocompósito, se o material não for biocompatível, as células não irão aderir quando plaqueadas com o nanocompósito e morrerão. Por outro lado, se a superfície do nanocompósito for biocompatível, as células irão aderir e se

manterão vivas. Ainda, em outro cenário, se houver algum elemento nocivo que possa ser liberado no meio celular, este irá interagir com as células e afetará a viabilidade. Verifica-se na figura 4.12 que a viabilidade se mantém elevada em todas as amostras testadas, entre 90% e 110%. Exceto para $(PVA/cit - MAG)_{9,5}$, a qual cai para aproximadamente 70%. Considerando-se o erro associado e viabilidade próxima de 80%, é um indício de atoxicidade, corroborando a biocompatibilidade da estrutura. Por meio de teste estatístico ANOVA, com $p > 0,05$, e verifica-se que as diferenças são significativas entre os tratamentos apresentados.

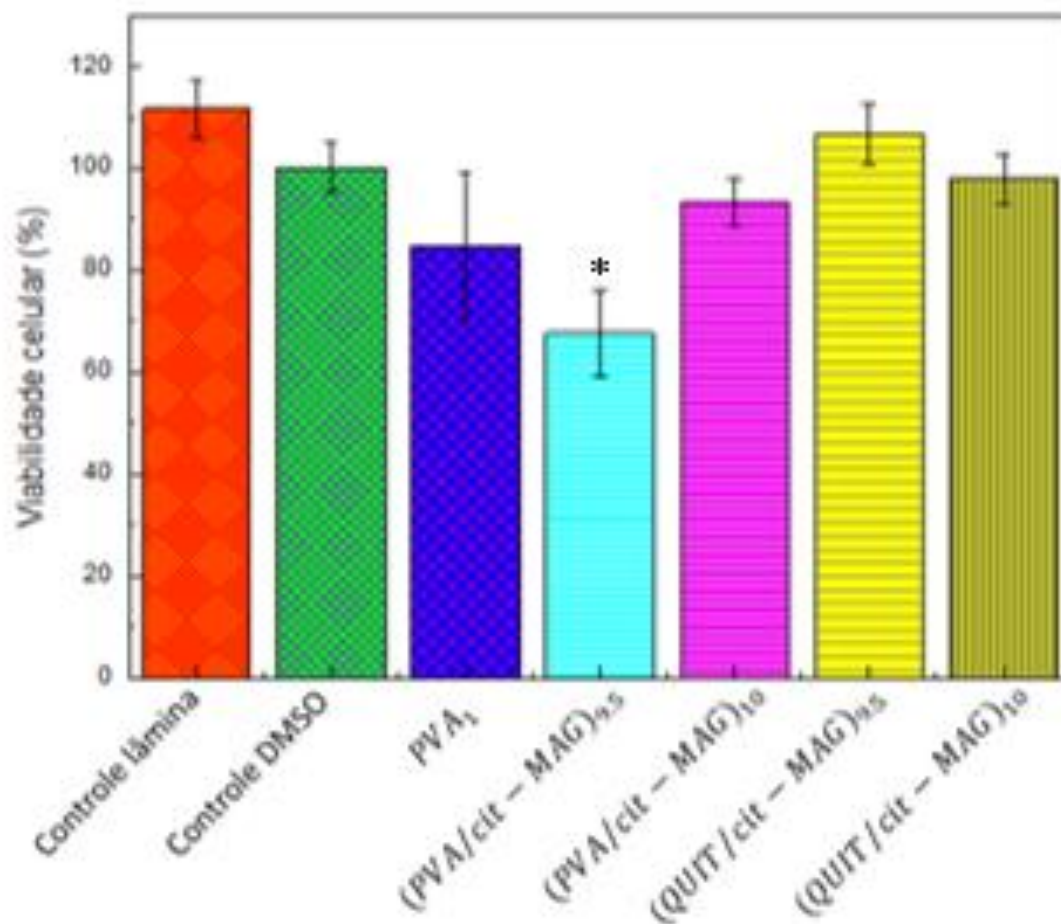


Figura 4.12. Viabilidade celular em linhagem de fibroblastos NIH3T3 após 24 horas de incubação. Da esquerda para a direita, controles negativos, grupo controle incubado com o substrato (lâmina) e com DMSO, PVA_1 : uma monocamada de PVA; $(PVA/cit-MAG)_{9,5}$, com o polímero na superfície do nanocompósito; $(PVA/cit-MAG)_{10}$, com as nanopartículas na superfície do nanocompósito; $(QUIT/cit-MAG)_{9,5}$ e $(QUIT/cit-MAG)_{10}$.

Os resultados de topografia e citotoxicidade são condizentes com os encontrados na literatura para estas estruturas (CASTILHO, 2014). Verifica-se que o nanocompósito de PVA/CitMag é formado por uma camada densa e uniforme de nanopartículas distribuídas homogeneamente na fase polimérica (ZHAO, 2010).

4.3 Estudo da dissolução dos nanocompósitos

A dissolução de nanoestruturas em resposta a condições específicas é uma de suas propriedades mais interessantes. Em condições fisiológicas (SAURER, 2009; WOOD, 2005, PICART, 2005, KIM, 2008), variações de pH neutro para ácido (SUKHISHVILI, 2000), alterações nas concentrações de íons (HAN, 2010; RAHIM, 2010), interações com luz (WANG, 2010), ou, ainda, uma combinação destas (ZELIKIN, 2002) as nanoestruturas podem dissolver-se, liberando compostos ativos no local com as condições apropriadas (WOOD, 2005; SU, 2009, KIM, 2008, PICART, 2005).

As interações entre os componentes da estrutura são responsáveis pela sensibilidade ou não a determinadas condições, por exemplo, quando imersas em soluções específicas. Por exemplo, as ligações de hidrogênio entre os materiais que compõem a estrutura são sensíveis à mudança de pH (KIM (2009)). Portanto, a seleção das condições de tratamentos determina em quais condições a estrutura pode ser aplicada para fins biológicos. A utilização dessas nanoestruturas para liberação de compostos de interesse por via transdérmica torna-se possível ao fabricar estruturas com propriedades tais como dimensões nanométricas, as quais podem penetrar pelos folículos pilosos, a biocompatibilidade, possuir interações estáveis em condições diferentes daquela do alvo tópico, porém sensíveis ao pH da pele, e, ainda, de fácil produção e custo acessível. Conjugando a técnica de automontagem, com nanopartículas de óxido de ferro cobertas por citrato e polímeros biocompatíveis com interações distintas pode-se estudar o comportamento de estruturas como os nanocompósitos de PVA/cit-MAG e QUIT/cit-MAG que preenchem a maioria dos requisitos supracitados em condições próximas daquelas da pele de pH e em concentrações crescentes de NaCl.

Segundo Blank (1939) e Schmid-Wendtner (2006), a medida do pH da pele varia de acordo com o método empregado, o sexo, a idade, o local da pele a ser testado e a condição de saúde do órgão. O pH considerado neste trabalho, seguiu a metodologia criteriosa de Blank (1939) determinados valores desejáveis de pH entre 4,0 e 7,0. Deve-se levar em consideração também a presença de íons na superfície da pele, por este motivo foram escolhidas condições de teste para os nanocompósitos em soluções de PBS, tampão salino de fosfato, e em concentrações de 1M a 5M de NaCl.

Os nanocompósitos preparados foram imersos em soluções com condições diferentes de pH e de concentração de íons, e a cada determinado período de tempo foram realizadas medidas de UV-Vis, de forma a estimar a diminuição da concentração do óxido de ferro como resultado direto da dissolução da estrutura dos nanocompósitos.

4.3.1 Estudo da dissolução de nanocompósitos (PVA/CitMag)₃₀

Os nanocompósitos de (PVA/cit-MAG)₃₀ foram imersos em solução PBS em pH 4,2, 4,9 e 5,6, durante 2 horas. Nestas condições tentou-se simular aquelas presentes em ambiente biológico, em solução salina tampão e pH da pele (BLANK, 1939). Observa-se, na figura 4.13, os valores de absorbância relativa em 360nm, que se referem ao sinal do ferro (SCHERTMANN, 1991). Os nanocompósitos (PVA/cit – MAG)₃₀ foram incubados em soluções PBS com diferentes valores de pH. Os dados de absorbância relativa foram obtidos considerando-se como 100% a absorbância no instante inicial ($t = 0$) e a absorbância medida nos tempos de incubação subsequentes como porcentagens desse valor. Nota-se que nas condições PBS em pH 4,2 (em 2a e 3a na Fig.4.13) em apenas duas horas de imersão, a intensidade da absorbância do nanocompósito diminui em torno de 25%, enquanto que nas soluções com outros valores de pH 4,9 e 5,6 não se observa alteração.

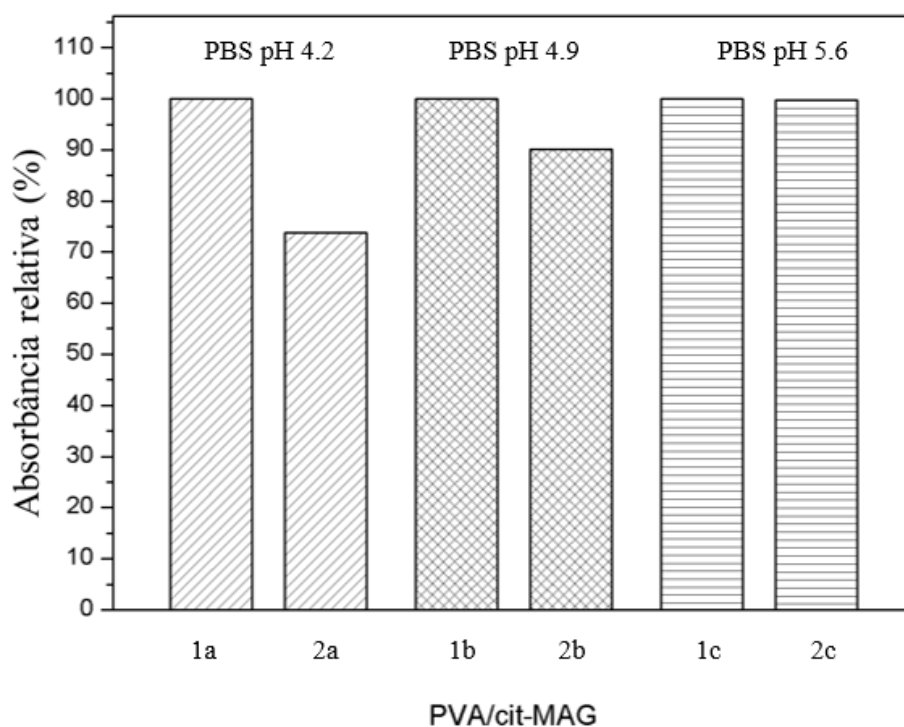


Figura 4.13. Absorbância relativa dos nanocompósitos $(PVA/cit - MAG)_{30}$ após incubação por 2 horas (120min) em soluções de PBS em pH igual a 4,2 ; 4,9, e 5,6, conforme indicação. As amostras 1a, 1b, e 1c, se referem à absorbância relativa no instante inicial, sendo considerada igual a 100%; As amostras 2a, 2b, e 2c indicam os valores obtidos para as absorbâncias relativas em 360nm após o tratamento.

Ao verificar a sensibilidade do nanocompósito PVA/cit-MAG ao pH mais ácido testado em PBS, ampliou-se o estudo para verificar a sensibilidade em uma faixa maior de pH. Um segundo experimento foi realizado com a imersão dos nanocompósitos $(PVA/cit-MAG)_{30}$ em soluções aquosas de pH: 3, 4, 5, 6 e 10 (figuras 4.14 e 4.15). Na Figura 4.14, observa-se a tendência de dissolução dos nanocompósitos após 6 horas que foram mantidos imersos em pH 4 e pH 5. A dissolução dos nanocompósitos, no entanto, foi distinta entre esses dois ambientes. Quando imersa em solução pH 4 o nanocompósito dissolve gradualmente durante as primeiras horas, enquanto que os nanocompósitos imersos em solução de pH 5 apenas na sexta hora perde

aproximadamente 50% da absorbância. A dissolução nesses dois ambientes, monitorada via UV-vis a cada hora de incubação, são apresentados na figura 4.15.

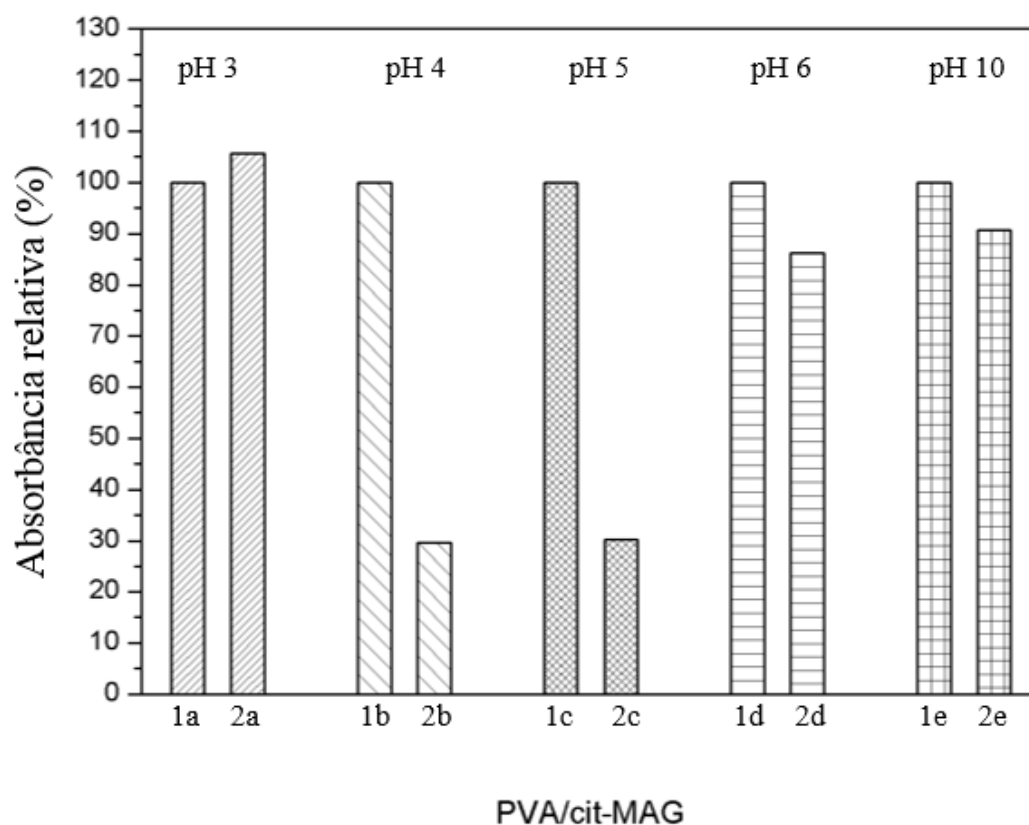


Figura 4.14. Nanocompósitos $(PVA/cit - MAG)_{30}$ após imersão por 6 horas em soluções aquosas com valores de pH igual a 3, 4, 5, 6 e 10, conforme indicação. O grupo 1 representa a absorbância relativa no instante inicial, considerada igual a 100%, o grupo 2 se refere às absorbâncias relativas em 360nm após o tratamento.

No ambiente de pH 4 na ausência do tampão salino, (Fig. 4.15) observa-se que no período das duas primeiras horas ocorre uma perda mais acentuada na absorbância do

nanocompósito, perda aproximada de 70%, maior do que aquela verificada no ambiente com PBS (Figura 4.13), quando se observou uma perda de apenas 25%.

O nanocompósito (PVA/cit-MAG)₃₀ mesmo em pH mais ácido, pH 3, não se dissolveu após a imersão por 6 horas (Fig. 4.14). Foram conduzidos testes complementares com incubação dos (PVA/cit-MAG)₃₀ em soluções aquosas com valores de pH iguais a 5, 6 e 10, cujos resultados são mostrados também na Figura 4.14. Para os nanocompósitos incubados nas soluções pH 6 e 10 não foram observadas alterações significativas após 6 horas.

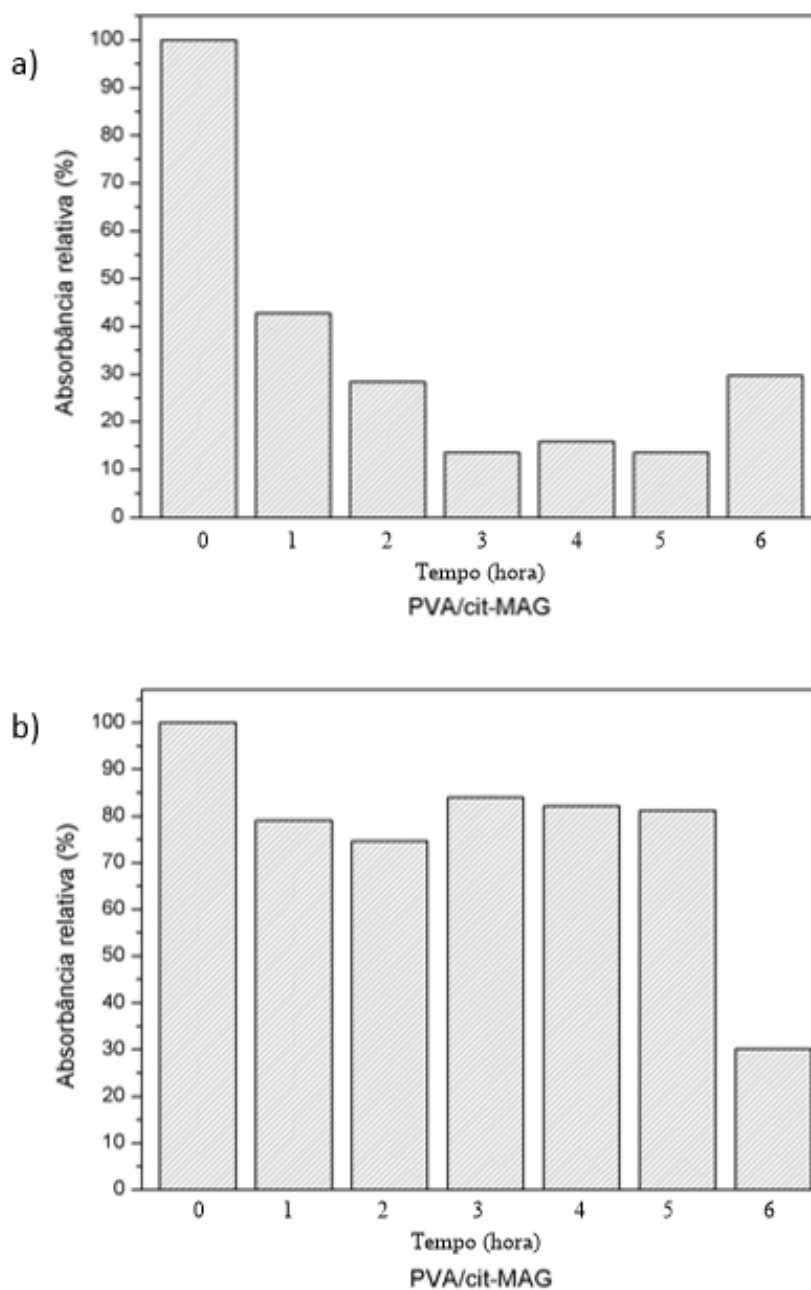


Figura 4.15. Absorbância relativa em 360nm para os nanocompósitos $(PVA/cit - MAG)_{30}$ imersos durante 6 horas em soluções aquosas com valores de pH 4 (a) e em pH 5(b).

A estabilidade dos nanocompósitos PVA/cit-MAG foi testada incubando-os em soluções com concentrações crescentes de NaCl. Como a estrutura não é formada por interações eletrostáticas, não se previa a dissolução, o que é confirmado com os resultados apresentados

na Figura 4.16 quando os nanocompósitos (PVA/cit-MAG)₃₀ foram imersos por 2 h em soluções aquosas de NaCl 1M, 2M, 3M, 4M ou 5M (Figura 4.16) e pH igual a 6,9. Observa-se que as variações de absorvância relativa são desprezíveis, concluindo-se que os íons presentes na solução não interferem nas interações que mantêm a estrutura coesa.

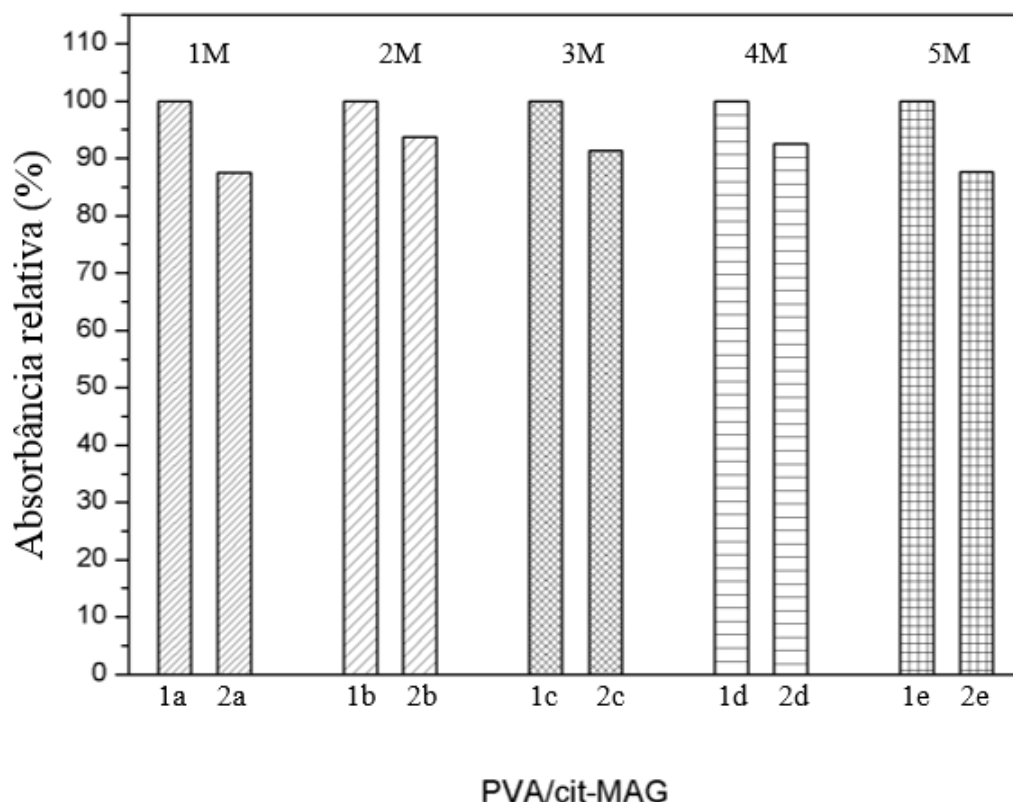


Figura 4.16. Absorvância relativa dos nanocompósitos (PVA/cit – MAG)₃₀ imersos durante 2 horas em soluções de NaCl 1M, 2M, 3M, 4M e 5M, conforme indicação, todos em pH 6,9. O grupo 1 representa a absorvância relativa no instante inicial, considerada igual a 100%, o grupo 2 se refere às absorvâncias relativas em 360nm após o tratamento.

Dentre os ambientes testados pode-se verificar que os nanocompósitos PVA/cit-MAG se dissolveram em solução aquosa com pH 4 e em PBS com pH 4,2. A dissolução da amostra observada quando imersa na solução em pH 4 sem a presença de íons é mais rápida que aquela que ocorre em solução de tampão salino (PBS), durante as duas primeiras horas. Na literatura,

verifica-se que a dissolução das estruturas ocorre nas primeiras horas e de forma gradual, porém quando imersa em solução aquosa com pH 5, a dissolução não foi gradual como a que ocorreu em pH 4 e em pH 4,2 em PBS, e sequer durante as primeiras horas (HAN, 2012, LIN, 2015, ZOU, 2014, BALL, 2005). Para as demais condições estudadas a absorvância relativa dos óxidos de ferro manteve-se inalterada.

4.3.2 Estudo da dissolução dos nanocompósitos (QUIT/cit-MAG)₃₀

Os nanocompósitos QUIT/citMAG foram incubados em soluções com variação de pH e de concentração de íons, com o objetivo de verificar a influência desses tratamentos no processo de dissolução dos mesmos.

Os nanocompósitos (QUIT/citMAG)₃₀ foram imersos em soluções de PBS com valores de pH iguais a 4,2, 4,9 e 5,6, durante 2 horas. Nestas condições tentou-se simular aquelas presentes em ambiente biológico, em solução salina tampão e pH da pele [BLANK, 1939]. Observa-se, na figura 4.17, os valores relativos de absorvância obtidas dos espectros em UV-vis em 360nm e 480nm, dos nanocompósitos (QUIT/cit – MAG)₃₀ incubados em soluções PBS em diferentes valores de pH. Os dados foram obtidos considerando-se com 100% a absorvância no instante inicial ($t = 0$) e a absorvância medida nos tempos de incubação subsequentes como porcentagens desse valor. Observa-se que as variações nos valores da absorvância relativa foram desprezíveis durante o período analisado.

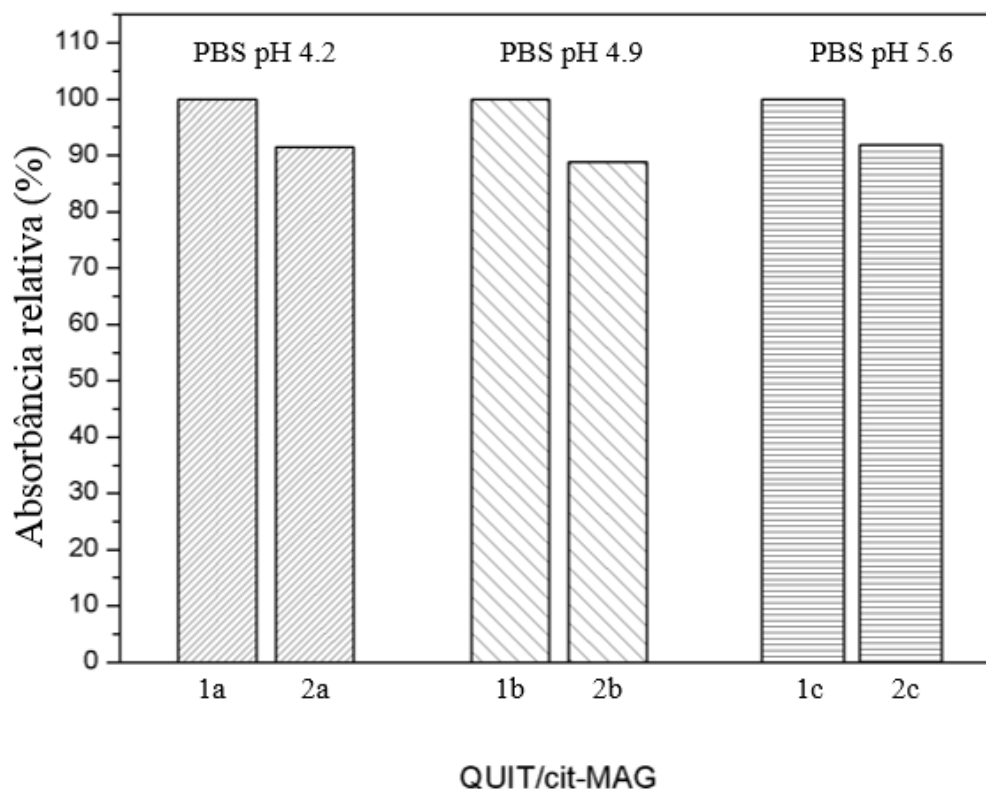


Figura 4.17 Absorbância relativa de nanocompósitos $(QUIT/cit - MAG)_{30}$ após incubação por 2 horas (120min) em soluções de PBS em pH igual a 4,2; a 4,9 e a 5,6, conforme indicação. O grupo 1 representa a absorbância relativa no instante inicial, considerada igual a 100%, o grupo 2 se refere às absorbâncias relativas em 360nm após o tratamento.

Os nanocompósitos $(QUIT/cit - MAG)_{30}$ foram imersos em soluções pH 3 e 4. Os ambientes em pH 5, 6 e 10 não foram testados. O pH 6 foi descartado, pois o fluido magnético utilizado na construção do nanocompósito encontra-se em pH 6,9, e em tal pH o nanocompósito cresce. Na figura 4.18, verifica-se que os nanocompósitos não se dissolvem durante o tempo de incubação investigado.

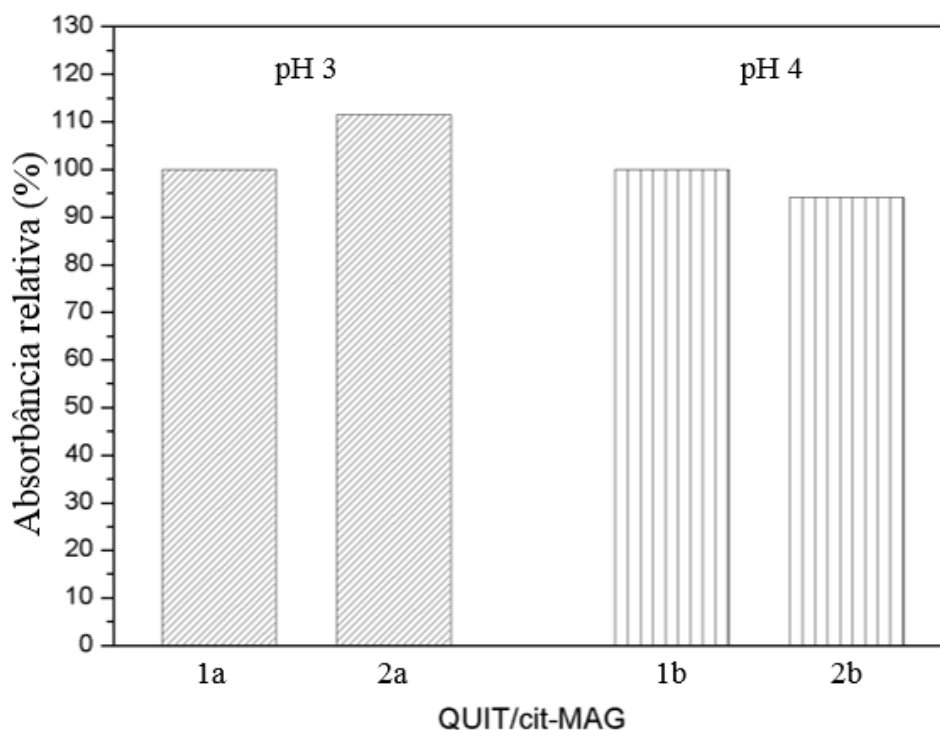


Figura 4.18. Absorbância relativa dos nanocompósitos $(QUIT/cit - MAG)_{30}$ após imersão por 6 horas em soluções aquosas com valores de pH iguais a 3 e 4, conforme indicação. O grupo 1 representa a absorbância relativa no instante inicial, considerado igual a 100%, o grupo 2 se refere às absorbâncias relativas em 360nm após o tratamento.

Prosseguiu-se com o estudo em ambientes com concentrações crescentes de NaCl (Figura 4.19), pois se esperaria que os nanocompósitos pudessem se dissolver em pelo menos um dos ambientes testados, devido à natureza eletrostática das interações dos seus componentes. Quando os nanocompósitos fossem submetidos a um ambiente com excesso de íons estes interagiriam com a sua camada mais externa e a dissolveriam, e assim, sucessivamente ocorrendo a erosão do nanocompósito, conforme foi observado em sistemas similares constituídos apenas por polieletrólitos (HAN, 2009; WOOD, 2005; VASQUÉZ, 2002; SHU, 2001). No entanto, observa-se que as variações de absorbância relativa são desprezíveis, concluindo-se que os íons presentes na solução não interferem e não desestabilizam a estrutura, como ocorreu com os nanocompósitos de $(PVA/cit - MAG)_{30}$, indicando que a hipótese de

que as interações eletrostáticas são as únicas responsáveis pela formação da estrutura, pode não ser verdadeira.

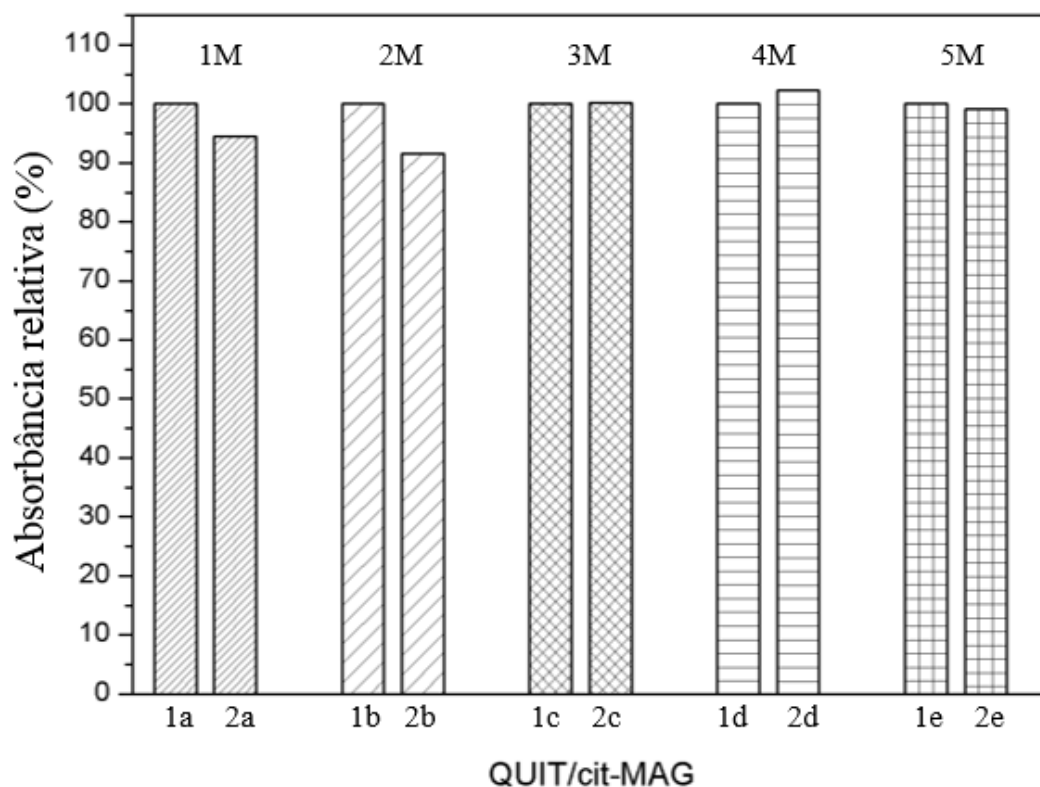


Figura 4.19. Absorbância relativa dos nanocompósitos $(QUIT/cit - MAG)_{30}$ após imersão durante 2 horas em soluções de NaCl 1M, 2M, 3M, 4M e 5M, conforme indicação, todos em pH 6,9. O grupo 1 representa a absorbância relativa no instante inicial, considerada igual a 100%, o grupo 2 se refere às absorbâncias relativas em 360nm após o tratamento.

O comportamento dos nanocompósitos $(QUIT/citMAG)_{30}$ após os tratamentos em soluções salinas de 1M a 5M, indicam que, ao contrário do que se esperaria para uma estrutura mantida unida somente por interações eletrostáticas, deve ocorrer também interação entre as camadas precedentes, interagindo de forma mais intensa e mantendo a integridade da estrutura nos meios testados. Segundo Pavinatto (2010), a quitosana também pode fazer ligações de

hidrogênio, o que poderia ocorrer nos nanocompósitos automontados, e que contribuiria para manter os seus componentes mais coesos, quando submetidos aos tratamentos realizados.

Capítulo 5

Conclusões e Perspectivas

5.1 Conclusões

No presente trabalho o fluido magnético (cit-MAG) sintetizado apresentou as seguintes características:

- Fluido magnético (cit-MAG) formado por nanopartículas de magnetita parcialmente oxidadas, funcionalizadas com citrato, com diâmetro médio de 5 nm, que apresentam comportamento superparamagnético;
- O diâmetro hidrodinâmico dos aglomerados é igual a 74 nm e potencial zeta igual a -33mV, indicando que o fluido é estável;
- As nanopartículas de óxido de ferro com diâmetro hidrodinâmico de 74nm podem penetrar a epiderme por meio dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas, cujo diâmetro médio é de 10 μ m;

Os nanocompósitos foram depositados utilizando dois tipos de biopolímeros: poli (álcool vinílico) e quitosana com nanopartículas de óxido de ferro com cobertura de citrato. Os resultados obtidos foram:

- Nanocompósitos constituídos de biopolímeros PVA e nanopartículas de óxido de ferro, PVA/cit-MAG, e QUIT/cit-MAG, foram depositados de forma homogênea camada por camada, indicando que a cada camada quantidades iguais de cada componente, polimérico ou nanoparticulado, são adsorvidos na estrutura;
- Imagens de MEV e MFA apresentam nanocompósitos com quantidades crescentes de nanopartículas aderidas nas estruturas estudadas em diferentes bicamadas. Os nanocompósitos não apresentam segregação de fase;
- Os nanocompósitos PVA/cit-MAG e QUIT/cit-MAG foram considerados atóxicos em culturas de linhagem NIH3T3, após incubação por 24h, empregando-se a metodologia MTT;
- Os nanocompósitos PVA/cit-MAG se dissolveram em soluções de PBS com pH igual a 4,2 e em solução aquosa com pH igual a 4, sendo indicados para veiculação de fármacos via transdérmica
- Os nanocompósitos QUIT/cit-MAG não se dissolveram em nenhuma das condições testadas.
- Verifica-se que os nanocompósitos QUIT/cit-MAG são mantidos coesos por devido à ocorrência de interações eletrostáticas, bem como de ligações de hidrogênio entre o polímero e a nanopartícula.

5.2.Perspectivas

Como perspectivas para a continuidade dos trabalhos, sugere-se:

- Investigar a estrutura PVA/cit-MAG como carreador de fármacos por via transdérmica alterando-se a sua composição para adição de princípios ativos de interesse, como o citrato de ródio, e estudar o seu processo de dissolução;
- Investigar a deposição de PVA/cit-MAG em substratos flexíveis para aplicações biomédicas;
- Investigar o processo de dissolução dos nanocompósitos com maior precisão por meio de um sistema que inclua, por exemplo, a microbalança de quartzo, que permitirá monitorar a massa liberada com precisão de nanogramas.

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

ALCÂNTARA, G. Nanopartículas de maguêmita complexadas com ácido oleico. xviii, 114 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Instituto de Física, 2007

ALCÂNTARA, G. Nanocompósitos poliméricos dopados com nanopartículas de ferrita de cobalto. 2011. xxiii, 185 f. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Instituto de Física, 2011.A

ALCÂNTARA, G., PATERNO, L., FONSECA, F., MORAIS, P., SOLER, M. Morphology of cobalt ferrite nanoparticle–polyelectrolyte multilayered nanocomposites. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v.323, n.10, p.1372-1377, 2011.B

ALCÂNTARA, G., PATERNO, L., AFONSO, A., FARIA, R., PEREIRA-DA-SILVA, M., MORAIS, P., SOLER, M. Adsorption of cobalt ferrite nanoparticles within layer-by-layer films: a kinetic study carried out using quartz crystal microbalance. *Physical Chemistry Chemical Physics*, V.13, n.48, p.21233-21242, 2011 C.

ALCÂNTARA, G., PATERNO, L., FONSECA, F., PEREIRA-DA-SILVA, M., MORAIS, P., SOLER, M. Layer-by-Layer Assembled Cobalt Ferrite Nanoparticles for Chemical Sensing. *Journal of Nanofluids*, v.2, n.3, p.175-183, 2013.A

ALCÂNTARA, G., PATERNO, L., FONSECA, F., PEREIRA-DA-SILVA, M., MORAIS, P., SOLER, M. Dielectric properties of cobalt ferrite nanoparticles in ultrathin

nanocomposite films. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v.15, n.45, p.19853-19861, 2013.

B.

AMARA, D., FELNER, I., NOWIK, I., MARGEL, S. Synthesis and characterization of Fe and Fe₃O₄ nanoparticles by thermal decomposition of triiron dodecacarbonyl. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.339, n.1, p. 106-110, 2009.

AQUINO, R., TOURINHO, F, ITRI, R., LARA, M., DEPEYROT, J. Size control of MnFe₂O₄ nanoparticles in electric double layered magnetic fluid synthesis. *Journal of magnetism and magnetic materials*, v.252, p.23-25, 2002.

ARUNAN, E., DESIRAJU, G. R., KLEIN, R. A., SADLEJ, J., SCHEINER, S., ALKORTA, I., CLARY, D., CRABTREE, R., DANNENBERG, J., HOBZA, P., KJAERGAARD H., LEGON, A., MENNUCCI, B., NESBITT, D. Definition of the hydrogen bond (IUPAC Recommendations 2011). *Pure and applied chemistry*, v.83, n.8, p.1637-1641, 2011.

BALL, V., HÜBSCH, E., SCHWEISS, R., VOEGEL, J. C., SCHAAF, P., KNOLL, W. Interactions between multivalent ions and exponentially growing multilayers: dissolution and exchange processes. *Langmuir*, v.21, n.18, p. 8526-8531, 2005.

BARBOSA, L. Análise de nanocompósitos poliméricos por microscopia de força atômica. 156f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016

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

BLANK, I. Measurement of pH of the Skin Surface: II. pH of the Exposed Surfaces of Adults with No Apparent Skin Lesions. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 2, n. 2, p. 75-79, 1939.

BRUGNEROTTO, J., LIZARDI, J., GOYCOOLEA, F., ARGÜELLES-MONAL, W., DESBRIERES, J., RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, v.42, n.8, p.3569-3580, 2001.

BOISTELLE, R., ASTIER, J. Crystallization mechanisms in solution. *Journal of Crystal Growth*, v.90, n.1-3, p. 14-30, 1988.

BUMGARDNER, J., WISER, R., GERARD, P., BERGIN, P., CHESTNUTT, B., MARINI, M., RAMSEY, V., ELDER, S., GILBERT, J. Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v.14, n.5, p.423-438, 2003.

CAREY, F. *Química Orgânica-Vol. 1*. AMGH Editora, 7 ed., 2009.

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

Chamritski, I., Burns, G. Infrared-and Raman-active phonons of magnetite, maghemite, and hematite: a computer simulation and spectroscopic study. *The Journal of Physical Chemistry B*, v.109, n.11, p.4965-4968, 2005.

CHIN, A., YAACOB, I. Synthesis and characterization of magnetic iron oxide nanoparticles via w/o microemulsion and Massart's procedure. *Journal of materials processing technology*, v.191, n.1, p. 235-237, 2007.

CHOI, H., CHOI, S., ZHOU, R., KUNG, H., CHEN, I. Iron oxide nanoparticles as magnetic resonance contrast agent for tumor imaging via folate receptor-targeted delivery 1. *Academic radiology*, vol.11, n.9, p. 996-1004, 2004.

CLOGSTON, J., PATRI, A. Zeta potential measurement. In: *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*, MCNEIL, S. Ed. Humana press, 2011.

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

CORNELL, R, SCHWERTMANN, U. The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses. John Wiley & Sons, 2^a edição, Alemanha, 2003.

COSTA-JÚNIOR, E., BARBOSA-STANCIOLI, E., MANSUR, A., VASCONCELOS, W., MANSUR, H. Preparation and characterization of chitosan/poly (vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. Carbohydrate Polymers, vol. 76, n. 3, p. 472-481, 2009.

DA SILVA, S., MELO, T., SOLER, M., LIMA, E., DA SILVA, M., MORAIS, P. Stability of citrate-coated magnetite and cobalt-ferrite nanoparticles under laser irradiation: a Raman spectroscopy investigation. IEEE transactions on magnetics, vol. 39, n. 5, p. 2645-2647, 2003.

DASH, M., CHIELLINI, F., OTTENBRITE, R. M., CHIELLINI, E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. Progress in polymer science, vol. 36, n.8, p.981-1014, 2011.

DE FARIA, D., VENÂNCIO SILVA, S., DE OLIVEIRA, M. Raman microspectroscopy of some iron oxides and oxyhydroxides. Journal of Raman spectroscopy, v. 28, n. 11, p. 873-878, 1997.

DE SALES, F., CRUZ, J., DA SILVA, S., SOLER, M., MORAIS, P., DA SILVA, M., LEITE, J. Carrier kinetics in quantum dots through continuous wave photoluminescence modeling: A systematic study on a sample with surface dot density gradient. Journal of applied physics, v.94, n.3, p.1787-1794, 2003.

DE SALES, F., DA SILVA, S., CRUZ, J., MONTE, A., SOLER, M., MORAIS, P., QUIVY, A. Indications of amplified spontaneous emission in the energy transfer between InAs self-assembled quantum dots. Physical Review B, v.70, n.23, p.235318, 2004.

DECHER, G., HONG, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process, 1 consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces. In: Makromolekulare Chemie. Macromolecular Symposia. Hüthig & Wepf Verlag, p. 321-327, 1991.

DEMERLIS, C., SCHONEKER, D. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). Food and Chemical Toxicology, v. 41, n. 3, p. 319-326, 2003.

DHURAI, B., SARASWATHY, N., MAHESWARAN, R., SETHUPATHI, P., VANITHA, P., VIGNESHWARAN, S., RAMESHBABU, V. Electrospinning of curcumin loaded chitosan/poly (lactic acid) nanofilm and evaluation of its medicinal characteristics. Frontiers of Materials Science, v.7, n.4, p.350-361, 2013.

DUARTE, M., FERREIRA, M., MARVAO, M., ROCHA, J. An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. International Journal of Biological Macromolecules, v.31, n.1, p.1-8, 2002.

EISBERG, R., RESNICK, R. Quantum Physics of atoms, molecule, solids, nuclei, and particles. Ed. John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1974.

ENNAS, G., MUSINU, A., PICCALUGA, G., ZEDDA, D., GATTESCHI, D., SANGREGORIO, C., STRANGER, J., CONCAS, G., SPANO, G. Characterization of iron oxide nanoparticles in an Fe₂O₃-SiO₂ composite prepared by a sol-gel method. Chemistry of Materials, v.10, n.2, p. 495-502, 1998.

FAHRENFORT, J. Attenuated total reflection: A new principle for the production of useful infra-red reflection spectra of organic compounds. Spectrochimica Acta, v. 17, n. 7, p. 698-709, 1961.

FEYNMAN, R. There's plenty of room at the bottom. Engineering and science, v. 23, n. 5, p. 22-

GALVÃO, J., DAVIS, B., TILLEY, M., NORMANDO, E., DUCHEN, M., CORDEIRO, M. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB Journal*, v. 28, n. 3, p. 1317-1330, 2014.

GOICOECHEA, J., ZAMARREÑO, C., MATIAS, I., ARREGUI, F. Optical fiber pH sensors based on layer-by-layer electrostatic self-assembled Neutral Red. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v.132, n.1, p.305-311, 2008.

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

GROSS, M., SALES, M., SOLER, M., PEREIRA-DA-SILVA, M., DA SILVA, M., PATERNO, L. Reduced graphene oxide multilayers for gas and liquid phases chemical sensing. *Rsc Advances*, V.4, n.34, p.17917-17924, 2014.

GRZELCZAK, M., VERMANT, J., FURST, E., LIZ-MARZÁN, L. Directed self-assembly of nanoparticles. *ACS nano*, v.4, n.7, p.3591-3605, 2010.

GUO, Z., ZHANG, D., WEI, S., WANG, Z., KARKI, A. B., LI, Y., BERNAZZANI, P., YOUNG, D., GOMES, J., COCKE, D., HO, T. Effects of iron oxide nanoparticles on polyvinyl alcohol: interfacial layer and bulk nanocomposites thin film. *Journal of Nanoparticle Research*, v.12, n.7, p. 2415-2426, 2010.

HAN, L., MAO, Z., WULIYASU, H., WU, J., GONG, X., YANG, Y., GAO, C. Modulating the structure and properties of poly(sodium 4-styrenesulfonate)/Poly(diallyldimethylammonium chloride) multilayers with concentrated salt solutions. *Langmuir*, v. 28, p. 193-199, 2012.

HAYNIE, D., PALATH, N., LIU, Y., LI, B., PARGAONKAR, N. Biomimetic nanostructured materials: inherent reversible stabilization of polypeptide microcapsules. *Langmuir*, v.21, n.3, p.1136-1138, 2005.

HIDBER, P., GRAULE, T., GAUCKLER, L. Citric acid—a dispersant for aqueous alumina suspensions. *Journal of the American Ceramic Society*, v. 79, n. 7, p. 1857-1867, 1996.

HIRANO, S., SEINO, H., AKIYAMA, Y., NONAKA, I. Chitosan: a biocompatible material for oral and intravenous administrations. In *Progress in biomedical polymers*, p. 283-290. Ed. Springer, Estados Unidos, 1990.

HUSSAIN, R., NOURI, A., OLIVER, R. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. *Journal of immunological methods*, v. 160, n. 1, p. 89-96, 1993.

HYON, S., CHA, W., IKADA, Y., KITA, M., OGURA, Y., HONDA, Y. Poly (vinylalcohol) hydrogels as soft contact lens material. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v.5, n.5, p.397-406, 1994.

ILER, R. K. Multilayers of colloidal particles. *Journal of colloid and interface science*, v. 21, n. 6, p. 569-594, 1966.

JACINTHO, G., BROLO, A., CORIO, P., SUAREZ, P., RUBIM, J. Structural investigation of MFe_2O_4 (M= Fe, Co) magnetic fluids. *The Journal of Physical Chemistry C*, v.113, n.18, p.7684-7691, 2009.

JAIN, T., MORALES, M., SAHOO, S., LESLIE-PELECKY, D., LABHASETWAR, V. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents. *Molecular pharmaceutics*, v.2, n.3, p.194-205, 2005.

JING, Z., WU, S. Synthesis, characterization and magnetic properties of γ -Fe₂O₃ nanoparticles via a non-aqueous medium. *Journal of Solid State Chemistry*, v. 177, n. 4, p. 1213-1218, 2004.

KANG, Y., RISBUD, S., RABOLT, J., STROEVE, P. Synthesis and characterization of nanometer-size Fe₃O₄ and γ -Fe₂O₃ particles. *Chemistry of Materials*, v.8, n.9, p.2209-2211, 1996.

KAUSHIK, A., KHAN, R., SOLANKI, P., PANDEY, P., ALAM, J., AHMAD, S., MALHOTRA, B. Iron oxide nanoparticles–chitosan composite based glucose biosensor. *Biosensors and bioelectronics*, v.24, n.4, p.676-683, 2008.

KAUSHIK, A., SOLANKI, P., ANSARI, A., SUMANA, G., AHMAD, S., MALHOTRA, B. Iron oxide-chitosan nanobiocomposite for urea sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v.138, n.2, p.572-580, 2009.

KHALAFALLA, S.; REIMERS, G. Magnetofluids and their manufacture. U.S. Patent n. 3,764,540, 9 out. 1973.

KIM, B., PARK, S., HAMMOND, P. Hydrogen-bonding layer-by-layer-assembled biodegradable polymeric micelles as drug delivery vehicles from surfaces. *Acs Nano*, v. 2, n. 2, p. 386-392, 2008.

KUMAR, M. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.

LAMPMAN, G., PAVIA, D., KRIZ, G., VYVYAN, J. *Introdução a espectroscopia*. Editora Cengage Learning, São Paulo, 2012.

LAURENT, S., FORGE, D., PORT, M., ROCH, A., ROBIC, C., VANDER ELST, L., MULLER, R. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical reviews*, v. 108, n. 6, p. 2064-2110, 2008.

LAURENT, S., DUTZ, S., HÄFELI, U. O., MAHMOUDI, M. Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Advances in colloid and interface science*, v.166, n.1, p.8-23, 2011.

LEE, D., HONG, T., KANG, D., LEE, J., HEO, M., KIM, J., KIM, B., Shin, H. Highly controllable transparent and conducting thin films using layer-by-layer assembly of

oppositely charged reduced graphene oxides. *Journal of Materials Chemistry*, vol 21, n. 10, p 3438-3442, 2011.

LEE, J., TOMA, H., ARAKI, K., ROCHA, R. *Química inorgânica não tão concisa*. Edgard Blucher, 1999.

LETTI, C. *Estudo de nanocompósitos formados por partículas de óxidos de ferro e polímeros por meio da espectroscopia Raman*. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Instituto de Física, 2013.

Li, Y., Feng, L., Shi, X., Wang, X., Yang, Y., Kai, Y., Lui, T., Yang, G., Liu, Z. *Surface Coating-Dependent Cytotoxicity and Degradation of Graphene Derivatives: Towards the Design of Non-Toxic, Degradable Nano-Graphene*. *Small*, v.10, n.8, p.1544-1554, 2014.

LI, H., PANG, S., WU, S., FENG, X., MÜLLEN, K., BUBECK, C. *Layer-by-layer assembly and UV photoreduction of graphene–polyoxometalate composite films for electronics*. *Journal of the American Chemical Society*, v.133, n.24, p.9423-9429, 2011.

Liao, K., Lin, Y., Macosko, C., Haynes, C. *Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts*. *ACS applied materials & interfaces*, v.3, n.7, p.2607-2615, 2011.

LIN, X., CHOI, D., & HONG, J. *Insulin particles as building blocks for controlled insulin release multilayer nano-films*. *Materials Science and Engineering: C*, vol 54, p. 239-244, 2015.

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

LYNN, D. *Peeling Back the Layers: Controlled Erosion and Triggered Disassembly of Multilayered Polyelectrolyte Thin Films*. *Advanced Materials*, v.19, p 4118–4130, 2007.

MAHMOUDI, M., SANT, S., WANG, B., LAURENT, S., SEN, T. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. *Advanced drug delivery reviews*, v.63, n.1, p.24-46, 2011.

MANSUR, H., ORÉFICE, R., MANSUR, A. Characterization of poly (vinyl alcohol)/poly (ethylene glycol) hydrogels and PVA-derived hybrids by small-angle X-ray scattering and FTIR spectroscopy. *Polymer*, vol. 45, n. 21, p. 7193-7202, 2004.

MASSART, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE transactions on magnetics*, v. 17, n. 2, p. 1247-1248, 1981.

MEDEIROS, E., PATERNO, L., MATTOSO, L. Nanotecnologia. In: *Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*. DURAN, N., MATTOSO, L., MORAIS, P. Editora Artliber, São Paulo, 1º ed, 2012.

MELO, T., DA SILVA, S., SOLER, M., LIMA, E., MORAIS, P. Investigation of surface passivation process on magnetic nanoparticles by Raman spectroscopy. *Surface science*, v.600, n.18, p.3642-3645, 2006.

MONOPOLI, M., ÅBERG, C., SALVATI, A., DAWSON, K. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature nanotechnology*, v.7, n.12, p. 779-786, 2012.

MORAIS, P., DA SILVA, S., SOLER, M., BUSKE, N. Raman investigation of uncoated and coated magnetic fluids. *The Journal of Physical Chemistry A*, v.104, n.13, p.2894-2896, 2000.

MORAIS, P., DA SILVA, S., SOLER, M., BUSKE, N. Raman spectroscopy in magnetic fluids. *Biomolecular engineering*, v.17, n.2, p.41-49, 2001.

MORAIS, P., SANTOS, R, PIMENTA, A., AZEVEDO, R., LIMA, E. Preparation and characterization of ultra-stable biocompatible magnetic fluids using citrate-coated cobalt ferrite nanoparticles. *Thin solid films*, v. 515, n. 1, p. 266-270, 2006.

MORAIS, P., GARG, V., OLIVEIRA, A., SILVA, L., AZEVEDO, R., SILVA, A., LIMA, E. Synthesis and characterization of size-controlled cobalt-ferrite-based ionic ferrofluids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v.225, n.1, p. 37-40, 2001.

MORAVEC, R., NILES, A. Cytotoxicity Testing: Measuring Viable Cells, Dead Cells, and Detecting Mechanism of Cell Death. In: STODDART, M. *Mammalian cell viability: Methods and protocols*. Editora Human Press, 2011.

MUZZARELLI, R. Biomedical exploitation of chitin and chitosan via mechano-chemical disassembly, electrospinning, dissolution in imidazolium ionic liquids, and supercritical drying. *Marine Drugs*, v. 9, n. 9, p. 1510-1533, 2011.

NAKAMOTO, K. *Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds, Part A*. Ed. Wiley, 6 ed., 2009.

NETZER, Lucy; ISCOVICI, Radu; SAGIV, Jacob. Adsorbed monolayers versus Langmuir-Blodgett monolayers—Why and how? I: From monolayer to multilayer, by adsorption. *Thin Solid Films*, v. 99, n. 1, p. 235-241, 1983.

NEUMANN, R., BAHIANA, M., PATERNO, L., SOLER, M., SINNECKER, J., WEN, J., MORAIS, P. Morphology and magnetism of multifunctional nanostructured γ -Fe₂O₃ films: Simulation and experiments. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, V.347, p.26-32, 2013.

NEUBERGER, T., SCHÖPF, B., HOFMANN, H., HOFMANN, M., & VON RECHENBERG, B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v.293, n.1, p.483-496, 2005.

NUNES, E., LIMA, E., SOLER, M., SILVA, F., AZEVEDO, R., MORAIS, P. Evidence of iron (III) reduction in γ -Fe₂O₃ nanoparticles due to meso-2, 3-dimercaptosuccinic acid functionalization. *Materials Research Express*, v.1, n.1, 016107, 2014.

PANKHURST, Q., CONNOLLY, J., JONES, S., DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*, v.36, n.13, R167, 2003.

PAPPELL, S. Low viscosity magnetic fluids obtained by the colloidal suspension of magnetic nanoparticles. US Patent 3.215.572, 1965.

PATERNO, L., MATTOSO, L., OLIVEIRA JR, O. Nanocompósitos poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações. *Química Nova*, v. 24, n. 2, p. 228-235, 2001.

PATERNO, L., FONSECA, F., ALCANTARA, G., SOLER, M., MORAIS, P., SINNECKER, J., NOVAK, M., LIMA, E., LEITE, F., MATTOSO, L. Fabrication and characterization of nanostructured conducting polymer films containing magnetic nanoparticles. *Thin Solid Films*, v.517, n.5, p.1753-1758, 2009 (A).

PATERNO, L., SOLER, M., FONSECA, F., SINNECKER, J., SINNECKER, E., LIMA, E., MORAIS, P. Layer-by-layer assembly of bifunctional nanofilms: Surface-functionalized maghemite hosted in polyaniline. *The Journal of Physical Chemistry C*, v.113, n.13, p.5087-5095, 2009 (B).

PATERNO, L., SOLER, M., FONSECA, F., SINNECKER, J., SINNECKER, E., LIMA, E., MORAIS, P. Magnetic nanocomposites fabricated via the layer-by-layer approach. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, V.10, n.4, P.2679-2685, 2010.

PATERNO, L., MEDEIROS, E., MATTOSO, L. Fabricação de nanocompósitos nanoestruturados com a técnica de automontagem. In: *Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*. DURAN, N., MATTOSO, L., MORAIS, P. Editora Artliber, São Paulo, 1º ed, 2012.

PATERNO, L., SINNECKER, E., SOLER, M., SINNECKER, J., NOVAK, M., MORAIS, P. Tuning of magnetic dipolar interactions of maghemite nanoparticles embedded in

polyelectrolyte layer-by-layer films. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, v.12, n.8, p.6672-6678, 2012.

PATERNO, L.; SOLER, M. Layer-by-layer enabled nanomaterials for chemical sensing and energy conversion. *JOM*, v. 65, n. 6, p. 709-719, 2013.

PATROCINIO, A.; PATERNO, L.; IHA, NY M. Layer-by-layer TiO₂ films as efficient blocking layers in dye-sensitized solar cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 205, n. 1, p. 23-27, 2009.

PAVINATTO, F., CASELI, L., OLIVEIRA JR, O. Chitosan in nanostructured thin films. *Biomacromolecules*, v.11, n. 8, p. 1897-1908, 2010.

PEREGRINO, P., SALES, M., DA SILVA, M., SOLER, M., DA SILVA, L., MOREIRA, S., PATERNO, L. Thermal and electrical properties of starch-graphene oxide nanocomposites improved by photochemical treatment. *Carbohydrate polymers*, V.106, p.305-311, 2014.

PICART, C., SCHNEIDER, A., ETIENNE, O., MUTTERER, J., SCHAAF, P., EGLES, C., VOEGEL, J. Controlled degradability of polysaccharide multilayer films in vitro and in vivo. *Advanced Functional Materials*, v, 15, n.11, p. 1771-1780, 2005.

PRAKASH, A., MCCORMICK, A. V., ZACHARIAH, M. R. Aero-sol-gel synthesis of nanoporous iron-oxide particles: a potential oxidizer for nanoenergetic materials. *Chemistry of materials*, v.16, n.8, p. 1466-1471, 2004.

PY-DANIEL, K., NAMBAN, J., DE ANDRADE, L., DE SOUZA, P., PATERNO, L., AZEVEDO, R., SOLER, M. Highly efficient photodynamic therapy colloidal system based on chloroaluminum phthalocyanine/pluronic micelles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.103, p.23-31, 2016.

QIAO, R., YANG, C., GAO, M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: from preparations to in vivo MRI applications. *Journal of Materials Chemistry*, v. 19, n. 35, p. 6274-6293, 2009.

RABEA, E., BADAWEY, M., STEVENS, C., SMAGGHE, G., STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, v.4, n.6, p.1457-1465, 2003.

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

RAHMAN, M., AISIRI, A., JAMAL, A., FAISAL, M., KHAN, S. Iron oxide nanoparticles. INTECH Open Access Publisher, 2011.

RAHIM, M., CHOI, W., LEE, H., JEON, I. Ionic surfactant-triggered renewal of the structures and properties of polyelectrolyte multilayer films. *Langmuir*, v.26, n.7, p. 4680-4686, 2010.

RAMÍREZ RIVERA, Luis Miguel. Síntese de complexos nanoestruturados formados por óxidos de ferro e sulfato de condroitina. 2013. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, 2013

RAO, Y. F., CHEN, W., LIANG, X. G., HUANG, Y. Z., MIAO, J., LIU, L., LOU, Y., ZHANG, X., WANG, B., TANG, R., CHEN, Z., LU, X. Epirubicin-Loaded Superparamagnetic Iron-Oxide Nanoparticles for Transdermal Delivery: Cancer Therapy by Circumventing the Skin Barrier, *Small*, v.11, n.2, p.239-247, 2015.

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

RODRIGUES, L., LEITE, H., YOSHIDA, M., SALIBA, J., JUNIOR, A., FARACO, A. In vitro release and characterization of chitosan films as dexamethasone carrier. *International journal of pharmaceutics*, v.368, n.1, p.1-6, 2009.

SAMUELS, R. Solid state characterization of the structure of chitosan films. *Journal of polymer science: polymer physics edition*, v. 19, n. 7, p. 1081-1105, 1981.

SANTOS, J., SOUZA, J., LETTI, C., SOLER, M., MORAIS, P., PEREIRA-DA-SILVA, M., PATERNO, L. Iron Oxide Nanostructured Electrodes for Detection of Copper (II) Ions. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, vol. 14, n. 9, p. 6614-6623, 2014.

SAURER, E., JEWELL, C., KUCHENREUTHER, J., LYNN, D. Assembly of erodible, DNA-containing thin films on the surfaces of polymer microparticles: toward a layer-by-layer approach to the delivery of DNA to antigen-presenting cells. *Acta biomaterialia*, v. 5, n. 3, p. 913-924, 2009.

SCHMID-WENDTNER, M., KORTING, H. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. *Skin pharmacology and physiology*, v.19, n.6, p. 296-302, 2006.

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

SEISYAN, R. Nanolithography in microelectronics: A review. *Technical Physics*, v.56, n.8, p.1061-1073, 2011.

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

SHIM, M., SHI KAM, N., CHEN, R., LI, Y., DAI, H. Functionalization of carbon nanotubes for biocompatibility and biomolecular recognition. *Nano Letters*, v.2, n.4, p.285-288, 2002.

SHRIVER, D., ATKINS, P. *Química Inorgânica*. Editora Bookman, 4 ed., 2008.

SHU, X., ZHU, K., SONG, W. Novel pH-sensitive citrate cross-linked chitosan film for drug controlled release. *International journal of pharmaceutics*, v. 212, n. 1, p. 19-28, 2001.

SKOOG, D., HOLLER, F., NIEMAN, T. *Princípios de análise instrumental*. 5. ed., Editora Bookman São Paulo, 2002.

SKURTYS, O., ACEVEDO, C., PEDRESCHI, F., ENRIONE, J., OSORIO, F., AGUILERA, J. *Food hydrocolloid edible films and coatings*. *Food Hydrocolloids: Characteristics, Properties*, Nova Science Publishers, Inc, 2010.

SOLER, M., ALCANTARA, G., SOARES, F., VIALI, W., SARTORATTO, P., FERNANDEZ, J., MORAIS, P. Study of molecular surface coating on the stability of maghemite nanoparticles. *Surface Science*, v.601, n.18, p.3921-3925, 2007.A

SOLER, M., LIMA, E., DA SILVA, S., MELO, T., PIMENTA, A., SINNECKER, J., MORAIS, P. Aging investigation of cobalt ferrite nanoparticles in low pH magnetic fluid. *Langmuir*, v.23, n.19, p.9611-9617, 2007.B

SOLER, M., LIMA, E., MORAIS, P. Superparamagnetic Iron Oxides. In *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. H. S. NALWA. American Scientific Publishers, v. 23, n. 532, p. 513-532, 2011. A

SOLER, M., LIMA, E., NUNES, E., SILVA, F., OLIVEIRA, A., AZEVEDO, R., MORAIS, P. Spectroscopic study of maghemite nanoparticles surface-grafted with DMSA. *The Journal of Physical Chemistry A*, v.115, n.6, p.1003-1008, 2011.B

SOLER, M., MELO, T., DA SILVA, S. LIMA, E., PIMENTA, A., GARG, V., MORAIS, P. Structural stability study of cobalt ferrite-based nanoparticle using micro Raman spectroscopy. *Journal of magnetism and magnetic materials*, v. 272, p. 2357-2358, 2004.

SOLER, M., PATERNO, L., MORAIS, P. Layer-by-layer assembly of magnetic nanostructures. *Journal of Nanofluids*, V.1, n.2, p.101-119, 2012.A

SOLER M., PATERNO, L. Nanomateriais Magnéticos. In: Nanociência e Nanotecnologia: Princípios e Aplicações, Ed. Elsevier, vol. 1, Ed. LEITE, F., FERREIRA, M., OLIVEIRA JR, O. São Paulo, 2014.

SOLER, M., PATERNO, L., SINNECKER, J., WEN, J., SINNECKER, E., NEUMANN, R., MORAIS, P. Assembly of γ -Fe₂O₃/polyaniline nanofilms with tuned dipolar interaction. Journal of Nanoparticle Research, vol 14, n. 3, p 1-10, 2012.B

SOLER, M., QU, F. Raman Spectroscopy of Iron Oxide Nanoparticles. In: Raman Spectroscopy for Nanomaterials Characterization. Springer Berlin Heidelberg, p. 379-416, 2012 C.

SOUMETZ, F.; PASTORINO, L.; RUGGIERO, C. Development of a piezoelectric immunosensor for matrix metalloproteinase-1 detection. In: 2009 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE, 2009. p. 2775-2778.

SU, X., KIM, B., KIM, S., HAMMOND, P., IRVINE, D. Layer-by-layer-assembled multilayer films for transcutaneous drug and vaccine delivery. Acs Nano, vol 3, n.11, p. 3719-3729, 2009.

SUKHISHVILI, S.; GRANICK, S. Layered, erasable, ultrathin polymer films. Journal of the American Chemical Society, v. 122, n. 39, p. 9550-9551, 2000.

SUYATMA, N. E., COPINET, A., TIGHZERT, L., COMA, V. Mechanical and barrier properties of biodegradable films made from chitosan and poly (lactic acid) blends. Journal of Polymers and the Environment, v.12, n.1, p.1-6, 2004.

TEEGARDEN, D. Polymer chemistry: introduction to an indispensable science. NSTA Press, Arlington, 2004.

TOCCI, M., BLOEMER, M., SCALORA, M., DOWLING, J., BOWDEN, C. Thin-film nonlinear optical diode. Applied physics letters, v.66, n.18, p.2324-2326, 1995.

VÁSQUEZ, E., DEWITT, D., HAMMOND, P., LYNN, D. Construction of hydrolytically-degradable thin films via layer-by-layer deposition of degradable polyelectrolytes. *Journal of America Chemical Society*, vol. 124, p. 13992-13993, 2002.

VIALI, W., ALCANTARA, G., SARTORATTO, P., SOLER, M., MOSINIEWICZ-SZABLEWSKA, E., ANDRZEJEWSKI, B., MORAIS, P. Investigation of the molecular surface coating on the stability of insulating magnetic oils. *The Journal of Physical Chemistry C*, v.114, n.1, p.179-188, 2009.

WANG, Y., HAN, P., WU, G., XU, H., WANG, Z., ZHANG, X. Selectively erasable multilayer thin film by photoinduced disassembly. *Langmuir*, v. 26, n. 12, p. 9736-9741, 2010.

WELCH, D., WOEHL, T., PARK, C., FALLER, R., EVANS, J., BROWNING, N. Understanding the Role of Solvation Forces on the Preferential Attachment of Nanoparticles in Liquid. *ACS nano*, v.10, n.1, p.181-187, 2015.

WHITE, W.; DEANGELIS, B. Interpretation of the vibrational spectra of spinels. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Spectroscopy*, v. 23, n. 4, p. 985-995, 1967.

WILLARD, M., KURIHARA, L., CARPENTER, E., CALVIN, S., HARRIS, V. Chemically prepared magnetic nanoparticles. *International Materials Reviews*, v.49, n.3-4, p.125-170, 2004.

WOOD, K., BOEDICKER, J., LYNN, D., HAMMOND, P. Tunable drug release from hydrolytically degradable layer-by-layer thin films. *Langmuir*, v.21, p. 1603-1609, 2005.

XU, J., YANG, H., FU, W., DU, K., SUI, Y., CHEN, J., ZHENG, Y., MINGHUI, L., ZOU, G. Preparation and magnetic properties of magnetite nanoparticles by sol-gel method. *Journal of Magnetism and magnetic Materials*, v.309, n.2, p. 307-311, 2007.

YOUNG, R, LOVELL, P. Introduction to polymers. CRC press, 2011.

ZELIKIN, A., LYNN, D., FARHADI, J., MARTIN, I., SHASTRI, V., LANGER, R. Erodible conducting polymers for potential biomedical applications. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 41, n.1, p. 141-144, 2002.

ZHANG, G., LIAO, Y., BAKER, I. Surface engineering of core/shell iron/iron oxide nanoparticles from microemulsions for hyperthermia. *Materials Science and Engineering: C*, v.30, n.1, p. 92-97, 2010.

ZHAO, X., ZHANG, Q., HAO, Y., LI, Y., FANG, Y., CHEN, D. Alternate multilayer films of poly (vinyl alcohol) and exfoliated graphene oxide fabricated via a facial layer-by-layer assembly. *Macromolecules*, v. 43, n. 22, p. 9411-9416, 2010.

ZOU, Y., XIE, L., CARROLL, S., MUNIZ, M., GIBSON, H., WEI, W. LIU, H., MAO, G. Layer-by-layer films with bioreducible and nonbioreducible polycations for sequential DNA release. *Biomacromolecules*, v.15, n.1