

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

**Nanopartículas de γ -Fe₂O₃ revestidas com
bicamada de ácido láurico: funcionalização
com acetato, propionato, butirato e succinato
de ródio(II) e com albumina de soro bovino**

Matheus Oliveira da Silva

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade de Brasília
como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em
Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aparecido Ribeiro de Souza

Brasília 2017

Agradecimentos

Sou muito grato a Deus por ter finalizado um trabalho tão árduo e ao mesmo tempo interessante e empolgante.

À minha família, meus pais Wesley e Eunice e meus irmãos Israel e Thiago e sua esposa Bruna por sempre estarem ao meu lado. Não esquecerei o suporte e compreensão durante todo esse tempo em que estive me dedicando exclusivamente ao desenvolvimento desta tese. Sem este apoio seria muito mais difícil concluir.

Ao professor Dr. Aparecido Ribeiro de Souza por ter realizado um trabalho de orientação de excelência em que aprendi muito em todas as etapas no desenvolvimento de uma pesquisa.

A professora Dr.^a Emília Celma de Oliveira pelas conversas que possibilitaram o desenvolvimento de grande parte deste trabalho. Sua contribuição foi fundamental na condução deste trabalho.

Ao professor Dr. Paulo Sérgio de Souza pelo auxílio e suporte na utilização do espectrofotômetro de absorção atômica na análise de ródio durante praticamente todo o período do desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás (UFG) por disponibilizar espaço e equipamentos para realização da grande maioria dos experimentos que compõe esta tese.

Aos técnicos do Instituto de Química da UFG que auxiliaram nos experimentos de análise termogravimétrica.

Ao laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta resolução (LabMic) por ter realizado as análises de microscopia eletrônica de transmissão.

Aos colegas no laboratório de iniciação científica, mestrandos e doutorandos pelas discussões sobre dúvidas que surgiam durante análise de resultados e principalmente pela amizade.

Aos professores Dr.^a Sônia Nair Bao, Dr.^a Marcella Lemos Brettas Carneiro e a Ma. Joseílma Luciana Neves Siqueira pela realização dos ensaios biológicos e pelas discussões acerca dos resultados obtidos para as amostras sintetizadas. Aos professores Dr. João Paulo Figueroa, Dr. Sebastião William da Silva e Dr.^a Maria Aparecida Godoy Soler pela disposição sempre quando solicitados.

Ao angiologista Yosio Nagato por ter descoberto um complicação vascular que perdurava por 6 anos e por ter realizado o procedimento cirúrgico que restaurou a saúde em minhas pernas permitindo que eu pudesse caminhar novamente sem dores.

À CAPES pela bolsa sem a qual não seria possível realizar um trabalho com tanta dedicação.

Foram muitos os amigos que me incentivaram a não desistir mesmo nas horas mais difíceis e complicadas, por isso expresse aqui minha profunda gratidão.

SUMÁRIO

<u>LISTA DE FIGURAS</u>	<u>V</u>
<u>LISTA DE TABELAS.....</u>	<u>VIII</u>
<u>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</u>	<u>IX</u>
<u>RESUMO</u>	<u>XII</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>XIII</u>
<u>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO</u>	<u>1</u>
1.1 Visão geral e justificativa.....	2
1.2 Objetivos gerais	6
1.3 Objetivos específicos.....	6
<u>CAPÍTULO 2 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</u>	<u>8</u>
2.1 Síntese dos carboxilatos de ródio(II).....	9
2.1.1 Acetato de ródio(II), (AR).....	11
2.1.2 Butirato de ródio(II), (BR)	11
2.1.3 Propionato de ródio(II), (PR)	11
2.1.4 Succinato de ródio(II), (SR)	12
2.2 Síntese da dispersão coloidal de nanopartículas de maguemita, (MGH).....	12
2.3 Revestimento das nanopartículas de maguemita com bicamada de ácido láurico, (MGH-LL).....	13
2.4 Estudo de adsorção	15
2.5 Preparação de dispersões coloidais de maguemita revestidas com bicamada de ácido láurico funcionalizadas com complexos de ródio(II).....	16
2.6 Preparação de dispersão coloidal de maguemita revestida com bicamada de ácido láurico funcionalizada com succinato de ródio(II) e albumina de soro bovino (MGH-LL/SR/BSA e MGH-LL/BSA/SR).....	18
2.7 Cinética de liberação dos complexos de ródio(II) em meio de cultura	19
2.8 Ensaio de citotoxicidade	20
2.9 Caracterização química e física	21
2.9.1 Análise termogravimétrica	21
2.9.2 Espectroscopia na região do infravermelho	21
2.9.3 Espectroscopia eletrônica de ultravioleta e visível	22

2.9.4	Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução	22
2.9.5	Análise do teor de ferro	22
2.9.6	Espectroscopia de absorção atômica (AAS)	23
2.9.7	Magnetometria de amostra vibrante	23
2.9.8	Difratometria de Raios X	23
2.9.9	Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta	23
<u>CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>		<u>25</u>
3.1	Difração de Raios X	26
3.2	Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução	29
3.3	Magnetometria de amostra vibrante	34
3.4	Estudo de adsorção	37
3.5	Espectroscopia na região do infravermelho	45
3.6	Análise termogravimétrica	49
3.7	Estabilidade coloidal	55
3.8	Cinética de liberação	62
3.9	Ensaio de citotoxicidade	68
<u>CAPÍTULO 4 – CONCLUSÃO</u>		<u>71</u>
4.1	Considerações finais	72
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>		<u>75</u>
<u>CAPÍTULO 5 – ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS</u>		<u>84</u>
5.1	Trabalhos apresentados	85
5.2	Artigos publicados em cooperação	85
<u>CAPÍTULO 6 – ARTIGO</u>		<u>86</u>
<u>ANEXO A</u>		<u>99</u>
<u>ANEXO B</u>		<u>99</u>
<u>ANEXO C</u>		<u>100</u>
<u>ANEXO D</u>		<u>100</u>
<u>ANEXO E</u>		<u>101</u>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1.** Representações para a) fórmula estrutural dos carboxilatos de ródio(II) com os quatro ligantes alquilas (R) perpendiculares entre si e dois ligantes axiais (L) no eixo de ligação Rh-Rh. Nanopartículas de MGH revestidas com b) monocamada de LA, e c) bicamada de LA.2
- Figura 2.1.** Esquema do procedimento de síntese para os complexos a) AR, PR e BR e b) SR.10
- Figura 2.2.** Esquema do procedimento empregado na síntese das NP de MGT e posterior oxidação à MGH.13
- Figura 2.3.** Esquema do procedimento empregado no revestimento de uma dispersão coloidal MGH com monocamada de LA (MGH-LL) e posteriormente bicamada de LA (MGH-LL).14
- Figura 3.1.** Difractogramas para nanopartículas de MGH (linha preta) e MGH-LL (linha vermelha). Os índices de Miller são indicados para cada pico de difração os quais foram atribuídos comparando-se com os picos observados na carta catalográfica para γ -Fe₂O₃ (JCPDF nº 39-1346). A região amorfa demarcada por um círculo indica a presença do ácido láurico.26
- Figura 3.2.** Micrografia obtida por HRTEM mostrando os planos cristalinos de uma nanopartícula MGH-LL/SR.29
- Figura 3.3.** Micrografias obtidas por HRTEM para nanopartículas de MGH-LL a) e b); MGH-LL/BR, c) e d); e MGH-LL/SR, e) e f).30
- Figura 3.4.** Micrografias obtidas por HRTEM para MGH-LL/SR/BSA. As setas na ampliação da figura á direita mostram o BSA formando uma estrutura que engloba as nanopartículas.31
- Figura 3.5.** Histogramas resultantes da contagem de nanopartículas e ajuste a uma função log-normal para a) MGH-LL, b) MGH-LL/BR, c) MGH-LL/SR e d) MGH-LL/SR/BSA, obtidos pela contagem manual de 152, 118, 151 e 87 nanopartículas, respectivamente.33
- Figura 3.6.** Curvas de magnetização a temperatura ambiente obtidas por VSM para amostras de MGH, MGH-LL, MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/SR, MGH-LL/BR e MGH-LL/SR/BSA. Na figura a) são representados a magnetização para uma variação de campo magnético de -18000 a 18000 Oe, com ampliação no canto superior esquerdo em que o campo magnético situa-se na faixa de -0,01 a 0,01 Oe; e b) ampliação do primeiro quadrante, de 0 a 18000 Oe.35
- Figura 3.7.** Isotermas de adsorção para os complexos de ródio(II) adsorvidos em MGH-LL expressa em mmol dos complexos por mol do óxido de ferro (Q_{ads}) em função da concentração de equilíbrio (C_{eq}) em μ mol/L: MGH-LL/AR, MGH-LL/PR,

MGH-LL/BR e MGH-LL/SR. No canto superior direito é mostrado uma ampliação das isotermas na região de baixa concentração dos adsorvatos.....38

Figura 3.8. Taxas de adsorção (%) em função da quantidade dos adsorvatos adicionados (R_{adc}), expressa em mmol de complexo de ródio(II) por mol do óxido de ferro, obtidas para MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR e MGH-LL/SR.39

Figura 3.9. a) Representações para AR, PR e BR, destacando o aumento do caráter hidrofóbico dos complexos de ródio(II) devido o aumento da cadeia carbônica, e b) para SR destacando os quatro grupos carboxílicos na forma ácida, e após ser neutralizado com solução NaOH.....40

Figura 3.10. Representação da hipótese proposta para explicação das elevadas taxas de adsorção de SR em MGH-LL segundo a qual ocorre quimissorção entre o complexo de ródio(II) e a superfície de MGH. a) Na primeira possibilidade o SR desfaz agregados de NP revestidos com bicamada de LA, enquanto na segunda possibilidade b) ocorre substituição de LA por SR apenas na monocamada havendo formação de uma bicamada híbrida de LA/SR.....42

Figura 3.11. Representação da terceira hipótese segundo a qual haveria substituição de LA por SR apenas naquelas moléculas fisissorvidas à monocamada.43

Figura 3.12. Isotermas linearizadas de Freundlich para adsorção dos complexos de ródio(II) em MGH-LL: a) MGH-LL/AR, b) MGH-LL/PR, c) MGH-LL/BR e d) MGH-LL/SR.44

Figura 3.13. a) Sobreposição dos espectros de infravermelho obtidos para MGH e MGH-LL. Os grupos funcionais responsáveis pelas vibrações são identificados próximos as bandas. b) Sobreposição dos espectros de infravermelho normalizados para MGH-LL, MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR e MGH-LL/SR. É destacado no gráfico as regiões de estiramentos assimétrico, $\nu_a(\text{OCO})$, e simétrico, $\nu_s(\text{OCO})$..46

Figura 3.14. Sobreposição dos espectros de infravermelho para a) MGH-LL/BR com MGH-LL e BR; b) MGH-LL/SR com MGH-LL e SR. O espectro para SR não apresenta a banda relativa ao estiramento do grupo carboxila $\nu(\text{C=O})$ em 1722 cm^{-1} em decorrência de ter sido neutralizado com solução de NaOH até o ponto de equivalência. Sobreposição dos espectros de infravermelho normalizados para MGH-LL/SR/BSA com MGH-LL, MGH-LL/SR e BSA com as principais bandas que caracterizam o SR e BSA destacadas nas regiões de c) 3000 a 2750 cm^{-1} e d) 1850 a 1250 cm^{-1}48

Figura 3.15. Curvas termogravimétricas obtidas para MGH, MGH-L, MGH-LL, MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR, MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA.50

Figura 3.16. Curvas termogravimétricas (linha vermelha) e suas derivadas (DTG) (linha preta) obtidas para a) MGH-LL, b) MGH-L, c) MGH-LL/AR, d) MGH-LL/PR, e) MGH-LL/BR e f) MGH-LL/SR.53

- Figura 3.17.** Curva termogravimétrica para MGH-LL/SR/BSA (linha vermelha) e sua derivada (DTG) (linha preta).....54
- Figura 3.18.** Diâmetro hidrodinâmico (D_H) para as dispersões coloidais MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR e MGH-LL/SR realizadas durante quatorze dias. As amostras foram diluídas a uma $[Fe] = 5,88 \text{ mmol/L}$59
- Figura 3.19.** Medidas de diâmetro hidrodinâmico (D_H) para as dispersões coloidais MGH-LL diluídas em NaCl (0,45 – 0,00045%) realizadas durante quatorze dias.60
- Figura 3.20.** a) Diâmetro hidrodinâmico e b) índice de polidispersão para MGH-LL, MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA medidos durante o experimento de cinética de liberação de SR em DMEM num período de aproximadamente seis dias.61
- Figura 3.21.** Curvas de cinética de liberação para a) MGH-LL/SR* DMEM , MGH-LL/SR/BSA* DMEM e MGH-LL/BSA/SR* DMEM , e b) MGH-LL/AR* DMEM , MGH-LL/PR* DMEM e MGH-LL/BR* DMEM diluídos em DMEM.62
- Figura 3.22.** Representação para a estrutura MGH-LL/SR/BSA durante a cinética de liberação de SR em DMEM.66
- Figura 3.23.** Efeito citotóxico das dispersões coloidais MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR, MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA em células de carcinoma mamário (MCF-7) após a) 24 e b) 48 horas, e em células fibroblastos de polpa dentária humana após c) 24 e d) 48 horas. As dispersões coloidais MGH-LL e MGH-LL/BSA foram utilizadas como grupos controle em MCF-7 após e) 24 e f) 48 horas. As concentrações dos complexos de ródio(II) empregadas foram 5, 10 e 20 μmolL^{-1} que equivalem a $[Fe]$ nos grupos controle de 0,65, 1,3 e 2,6 mmolL^{-1} , respectivamente. Citotoxicidade de SR em células MCF-7 após g) 24 e h) 48 horas. Os asteriscos e círculos pretos indicam diferenças estatisticamente significativas determinadas pelo teste entre a porcentagem da viabilidade celular e do grupo controle, sendo * $p < 0,0001$, ** $p < 0,0005$, *** $p < 0,001$, • $p < 0,005$, •• $p < 0,005$69

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Reagentes utilizados.....	9
Tabela 2.2. Número de mol (n_{mol}), volume (V) e concentração inicial (Ci) dos adsorvatos AR (2,42 mmol L ⁻¹ , pH = 7,23), PR (1,86 mmol L ⁻¹ , pH = 7,1), BR (1,21 mmol L ⁻¹ , pH = 5,84) e SR (2,15 mmol L ⁻¹ , pH = 8,2) adicionados em 0,5 mL do adsorvente MGH-LL ([Fe] = 0,19 mol L ⁻¹ , pH = 7,2). A razão de adsorção (R_{adc}) está expressa em mmol de complexo de ródio(II) por mol de γ -Fe ₂ O ₃	17
Tabela 2.3. Condição de funcionalização das dispersões coloidais MGH-LL com os carboxilatos de ródio(II): AR (MGH-LL/AR), PR (MGH-LL/PR), BR (MGH-LL/BR) e SR (MGH-LL/SR).	18
Tabela 2.4. Condições de preparo das amostras funcionalizadas em DMEM na cinética de liberação dos carboxilatos de ródio(II).....	19
Tabela 3.1. Valores de diâmetro médio (D_0) e índice de polidispersão (σ) obtidos pelo ajuste dos dados de contagem de nanopartículas a uma função log-normal; concentração de ferro ([Fe]) das dispersões coloidais, massa (m_{NP}) e volume (V_{NP}) das nanopartículas; concentração (C_{NP}) e área superficial (A_{NP}) de nanopartículas por volume para MGH-LL, MGH-LL/BR, MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA. Todos os valores foram estimados a partir do D_0 calculado.	32
Tabela 3.2. Valores de magnetização de saturação (M_S) obtidos para as amostras MGH, MGH-LL, MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR, MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA.	36
Tabela 3.3. Média das taxas de adsorção para todos os valores de complexos de ródio(II) adicionados, e parâmetros obtidos após ajuste dos dados das isotermas aos modelos de Langmuir e Freundlich, para os sistemas MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR e MGH-LL/SR.	39
Tabela 3.4. Valores das perdas de massa (Δm) totais obtidos na faixa de temperatura considerada (ΔT) e picos das derivadas das curvas termogravimétricas (DTG).	52
Tabela 3.5. Diâmetro hidrodinâmico (D_H), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ζ) com desvio padrão (SD), medidos para as dispersões coloidais MGH recoberta com bicamada de LA (MGH-LL), e MGH-LL funcionalizadas com AR (MGH-LL/AR) PR (MGH-LL/PR), BR (MGH-LL/BR), SR (MGH-LL/SR) e MGH-LL/SR funcionalizado com BSA (MGH-LL/SR/BSA). As medidas foram realizadas em água, solução salina NaCl 0,45% e em meio de cultura DMEM a uma [Fe] = 5,88 mmol/L.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AAS** – *ingl.* Atomic absorption spectroscopy (espectroscopia de absorção atômica)
- AR** – acetato de ródio(II)
- BR** – butirato de ródio(II)
- BSA** – *ingl.* Bovine serum albumin (albumina de soro bovino)
- C=O** – grupo funcional carbonila
- C_{eq}** – concentração de equilíbrio calculada para o adsorvato não adsorvido após término do experimento de adsorção
- COO⁻** – grupo funcional carboxilato
- COOH** – grupo funcional carboxila
- D** – coeficiente de difusão translacional
- D₀** – diâmetro médio da nanopartículas calculado a partir do ajuste dos dados da contagem de nanopartículas a uma função log-normal
- D_H** – Diâmetro hidrodinâmico
- DLS** – *ingl.* Dynamic Light scattering (espalhamento de luz dinâmico)
- DMEM** – *ingl.* Dulbecco's Modified Eagle's Medium (solução de meio de cultura)
- DTG** – *ingl.* Derivative thermogravimetric (derivada da curva termogravimétrica)
- D_{XRD}** – diâmetro médio das nanopartículas calculado por difratometria de Raios-X
- FDA** – *ingl.* Food and Drug Administration (administração de alimentos e fármacos)
- Fe₃O₄** – fase magnetita para o óxido de ferro
- FTIR** – *ingl.* Fourier transform infrared spectroscopy (espectroscopia de infravermelho com transformada de fourrier)
- FWHM** – *ing.* Full width at half maximum (largura a meia altura de um pico no difratograma)
- H** – Campo magnético expresso em Oe
- HRTEM** – *ingl.* High resolution transmission electron microscopy (microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução)
- K** – capacidade do adsorvente obtido após ajuste de dados das isotermas de adsorção ao modelo de Freundlich
- K_B** – constante de Boltzmann
- LA** – ácido láurico
- MGH** – maguemita

MGH-LL – nanopartícula de maguemita revestidas com bicamada de ácido láurico

MGH-LL/AR – nanopartículas de maguemita revestidas com bicamada de ácido láurico funcionalizada com acetato de ródio(II)

MGH-LL/AR*^{DMEM} – nanopartículas de maguemita revestidas com bicamada de ácido láurico funcionalizada com acetato de ródio(II) diluídos em DMEM.

MGH-LL/BR – nanopartículas de maguemita revestidas com bicamada de ácido láurico funcionalizada com butirato de ródio(II)

MGH-LL/BR*^{DMEM} – nanopartículas de maguemita revestidas com bicamada de ácido láurico funcionalizada com butirato de ródio(II) diluídos em DMEM

MGH-LL/BSA/SR – nanopartículas de maguemita revestidas com bicamada de ácido láurico funcionalizadas primeiramente com albumina de soro bovino e depois succinato de ródio(II)

MGH-LL/BSA/SR*^{DMEM} – nanopartículas de maguemita revestidas com bicamada de ácido láurico funcionalizadas primeiramente com albumina de soro bovino e depois succinato de ródio(II) diluídos em DMEM

MGH-LL/PR – nanopartícula de maguemita revestidas com bicamada de ácido láurico funcionalizada com propionato de ródio(II)

MGH-LL/PR*^{DMEM} – nanopartículas de maguemita revestidas com bicamada de ácido láurico funcionalizada com propionato de ródio(II) diluídos em DMEM

MGH-LL/SR – nanopartículas de maguemita revestidas com bicamada de ácido láurico funcionalizada com succinato de ródio(II)

MGH-LL/SR*^{DMEM} – nanopartículas de maguemita revestidas com bicamada de ácido láurico funcionalizada com succinato de ródio(II) diluídos em DMEM

MGH-LL/SR/BSA – nanopartículas de maguemita revestidas com bicamada de ácido láurico funcionalizadas primeiramente com succinato de ródio(II) e depois albumina de soro bovino

MGH-LL/SR/BSA*^{DMEM} – nanopartículas de maguemita revestidas com bicamada de ácido láurico funcionalizadas primeiramente com succinato de ródio(II) e depois com albumina de soro bovino diluídos em DMEM

MGT – magnetita

m_{NP} – massa média de uma nanopartículas

M_S – magnetização de saturação

n – intensidade de adsorção obtida após ajuste de dados das isotermas de adsorção ao modelo de Freundlich

NP – Nanopartículas

Oh – sítios octaédricos para uma célula unitária de maguemita

PDI – *ingl.* Polydispersity index (índice de polidispersão)

PR – propionato de ródio(II)

Q_{ads} – razão de adsorção entre adsorvato e adsorvente calculada após término do experimento de adsorção

R² – coeficiente de ajuste linear obtido após ajuste dos dados a uma regressão linear

R_{adc} – razão de adsorção entre adsorvato e adsorvente calculada para um experimento de adsorção e no preparo de amostras funcionalizadas

SPIO – *ingl.* Superparamagnetic iron oxide (óxido de ferro superparamagnético)

SR – succinato de ródio(II)

T – temperatura absoluta

Td – sítios tetraédricos para uma célula unitária de maguemita

TGA – *ingl.* Thermogravimetric analysis (análise termogravimétrica)

U_E – mobilidade eletroforética,

ν_a – frequência de estiramento assimétrico

V_{NP} – volume médio de uma nanopartícula

ν_s – frequência de estiramento simétrico

VSM – *ingl.* Vibrating sample magnetometry (magnetometria de amostra vibrante)

W – índice de polidispersão obtido a partir do ajuste dos dados da contagem de nanopartículas a uma função log-normal

XRD – *ingl.* X-ray diffraction (difratometria de Raios-X)

β – diferença entre a largura a meia para o pico mais intenso em um difratograma entre a amostra e padrão

γ-Fe₂O₃ – fase maguemita para o óxido de ferro

δ – frequência de deformação angular

Δm – Perda de massa obtida a partir da análise de uma curva termogravimétrica

ε_d – constante dielétrica

ζ – Potencial zeta

η – viscosidade

RESUMO

Neste trabalho foram descritos a síntese dos carboxilatos de ródio(II): acetato, propionato, butirato e succinato de ródio(II), e de uma dispersão coloidal de nanopartículas de maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) a qual foi revestida com uma bicamada de ácido láurico. Amostras destas dispersões coloidais foram funcionalizadas com os carboxilatos de ródio(II). Duas dispersões coloidais de nanopartículas de maguemita recobertas com bicamada de ácido láurico foram funcionalizadas com succinato de ródio(II) e albumina de soro bovino (BSA) diferenciando-se quanto à sequência de adição do complexo de ródio(II) e da proteína. As nanopartículas foram caracterizadas por difração de raios-X (XRD) onde se verificou a predominância de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ como fase cristalina, e seus diâmetros médios calculados foram 10,21 e 9,50 nm para maguemita e maguemita recoberta com ácido láurico, respectivamente. As imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (HRTEM) apresentaram nanopartículas com contornos irregulares e formatos aproximadamente esféricos e diâmetros médios calculados próximos daqueles obtidos por XRD. As curvas de magnetização obtidas por Magnetometria de Amostra Vibrante (VSM) mostraram comportamento superparamagnético para todas as amostras, mesmo após as etapas de recobrimento e funcionalização. As isotermas de adsorção mostraram fisissorção com taxas de adsorção distintas em cada sistema atribuídos ao crescente caráter hidrofóbico dos compostos. Os espectros de infravermelho (FTIR) mostraram bandas características da maguemita, ácido láurico, butirato e succinato de ródio(II) e BSA. As curvas termogravimétricas mostraram valores crescentes de perda de massa totais em função do recobrimento e dos teores adsorvidos na funcionalização. A estabilidade coloidal avaliada por meio de medidas de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta nos meios água, NaCl 0,45% e DMEM mostrou que as dispersões coloidais com succinato de ródio(II) e com BSA foram as mais estáveis. A cinética de liberação em DMEM apresentou liberação acima de 80% para todos os complexos de ródio(II). As atividades citotóxicas das dispersões coloidais foram avaliadas em células de carcinoma MCF-7 e fibroblastos, em 24 e 48 horas. A dispersão coloidal com butirato de ródio(II) apresentou a maior citotoxicidade, e as dispersões coloidais com succinato de ródio(II) e com BSA apresentaram as menores citotoxicidades. Foi observado aumento do potencial citotóxico do succinato de ródio(II) quando associado às dispersões coloidais comparado à solução do complexo de ródio(II) livre. Assim, a dispersão coloidal de nanopartículas de maguemita recoberta com bicamada de ácido láurico demonstrou excelentes características como plataforma de liberação controlada para os carboxilatos de ródio(II) representando uma alternativa promissora para minimizar as toxicidades destes compostos.

Palavras-chave: superparamagnetismo, carboxilatos de ródio(II), anticâncer, maguemita, ácido láurico, albumina de soro bovino e MCF-7.

ABSTRACT

In this work it was described the synthesis of rhodium(II) carboxylates: acetate, propionate, butyrate and rhodium(II) succinate and maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) nanoparticles colloidal dispersion which was coated with lauric acid bilayer. Samples of these colloidal dispersions were functionalized with rhodium(II) carboxylates. Two lauric acid bilayer coated-maghemite nanoparticles colloidal dispersions were functionalized with rhodium(II) succinate and bovine serum albumin (BSA) differentiating into the rhodium(II) complex and protein addition sequence. Nanoparticles were characterized by X Ray Diffraction (XRD) where the predominance of the $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ as crystalline phase was confirmed and their average diameters calculated were 10,21 and 9,50 nm for maghemite and lauric acid coated-maghemite, respectively. The images obtained by Transmission Electronic Microscopy (HRTEM) presented nanoparticles with irregular contours and approximately spherical shapes and the average diameters calculated were close to those obtained by XRD. The magnetization curves obtained by Vibrating Sample Magnetometer (VSM) showed superparamagnetic behavior for all samples, even after the steps of coating and functionalization. The adsorption isotherms showed physisorption with different adsorption rates in each system attributed to the increasing hydrophobic character of the compounds. The infrared spectra (FTIR) showed characteristic bands of maghemite, lauric acid, butyrate and rhodium(II) succinate and BSA. The thermogravimetric curves showed increasing values of total mass loss as a function of the coating and the contents adsorbed in the functionalization. The colloidal stability evaluated by hydrodynamic diameter and zeta potential in the water, 0.45% NaCl and DMEM media showed that the colloidal dispersions with rhodium(II) succinate and BSA were the most stable. Release kinetics in DMEM showed release above 80% for all rhodium(II) complexes. The cytotoxic activities of the colloidal dispersions were evaluated in MCF-7 and fibroblast carcinoma cells at 24 and 48 hours. The colloidal dispersion with rhodium(II) butyrate showed the highest cytotoxicity, and the colloidal dispersions with rhodium(II) succinate and BSA showed the lowest cytotoxicity. It was observed an increase in the cytotoxic potential of rhodium(II) succinate when associated with colloidal dispersions compared to the free rhodium(II) complex solution. Thus, the colloidal dispersion of lauric acid bilayer coated-maghemite nanoparticles colloidal dispersion showed excellent characteristics as controlled release platform for the rhodium(II) carboxylates representing a promising alternative to decrease the toxicities of these compounds.

Keywords: superparamagnetism, rhodium(II) carboxylates, anticancer, maghemite, lauric acid, bovine serum albumin and MCF-7.

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1 Visão geral e justificativa

Os carboxilatos de ródio(II), $[\text{Rh}_2(\text{RCOO})_4]$ (onde R = grupo alquila), fazem parte da segunda geração de compostos antitumorais de metais de transição do grupo da platina (BURGOS; OKIL; SINISTERRA, 2012). Possuem uma estrutura do tipo gaiola (figura 1.1a), com quatro ligantes perpendiculares entre si, que se coordenam aos átomos de ródio através dos grupos carboxilatos, podendo ter ou não dois ligantes na posição axial, situados no eixo da ligação Rh-Rh (BOYAR; ROBINSON, 1983).

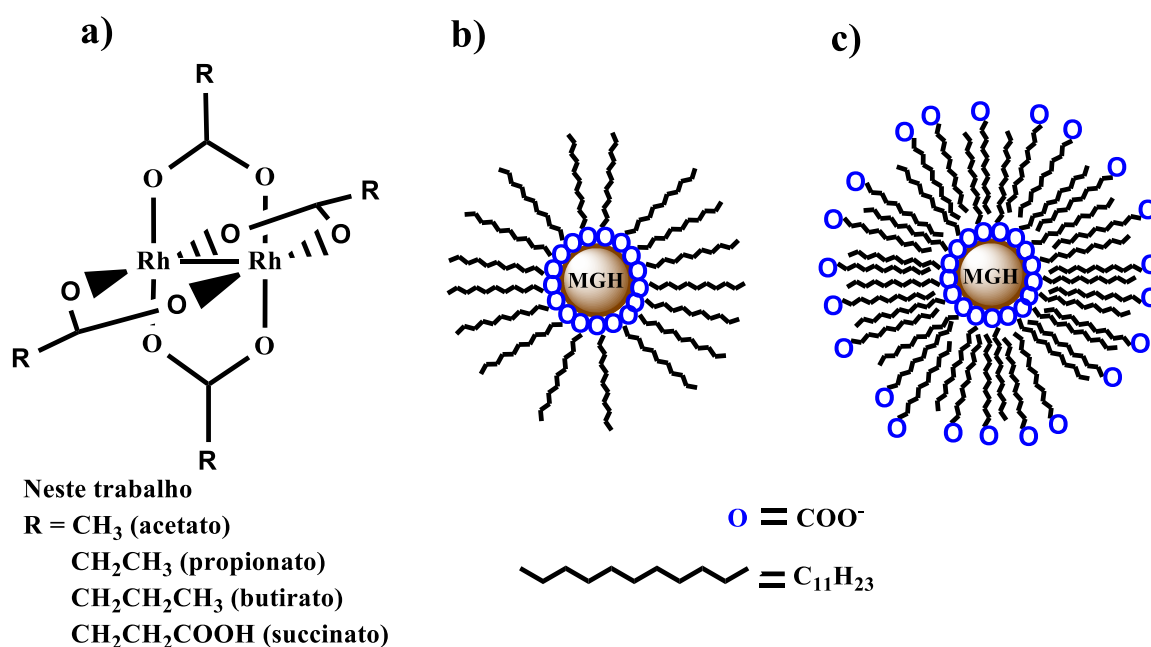


Figura 1.1. Representações para a) fórmula estrutural dos carboxilatos de ródio(II) com os quatro ligantes alquilas (R) perpendiculares entre si e dois ligantes axiais (L) no eixo de ligação Rh-Rh. Nanopartículas de MGH revestidas com b) monocamada de LA, e c) bicamada de LA.

Desde sua descoberta os carboxilatos de ródio(II) mostraram pronunciada atividade antitumoral apesar de possuírem elevada toxicidade a qual se tornou um grande obstáculo em sua utilização. Os primeiros estudos realizados mostraram que, para os complexos da série acetato, propionato e butirato de ródio(II), quanto mais lipossolúvel o complexo maior sua atividade antitumoral e maior sua citotoxicidade (HOWARD, *et al.* 1977). Nos últimos anos o foco do nosso grupo de pesquisa tem sido melhorar as características destes compostos a fim de se contornar os obstáculos relativos a essa grande toxicidade. Como exemplos disto

podemos citar a associação do citrato de ródio(II), mais hidrossolúvel, com uma dispersão coloidal de nanopartículas (NP) de maguemita (MGH) cuja formulação apresentou melhor citotoxicidade contra células de carcinoma de mama MCF-7 e 4T1 quando comparado ao complexo livre (CARNEIRO, *et al.* 2011, 2013).

Os resultados excelentes obtidos para a formulação do citrato de ródio(II) motivaram-nos a continuar investindo em compostos mais hidrossolúveis. Assim, sintetizamos o succinato de ródio(II) que surge como promissor agente antitumoral já que se assemelha tanto ao butirato de ródio(II), com respeito ao tamanho da cadeia carbônica, quanto ao citrato de ródio(II), devido aos grupos carboxílicos nas extremidades das cadeias. Seus grupos carboxílicos livres aumentam seu caráter hidrofílico, sua solubilidade aquosa e cria possibilidades de coordenação com outras moléculas (SILVA, 2012).

Atualmente, o grande impacto da nanobiotecnologia tem sido o tratamento de diversos tipos de doenças com destaque para aquelas relacionadas ao câncer. Eficácia terapêutica e diagnóstico melhorados são garantidos pelo estudo/emprego de formulações a partir de NP. Como exemplos de sistemas nanoestruturados destinados a esse propósito podemos citar os lipossomas, NP lipídicas e poliméricas, nanocristais (DIMER, *et al.* 2013), NP inorgânicas (ERATHODIYIL; YING, 2011), NP de albumina (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012) e NP superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIO) (MAHMOUDI, *et al.* 2011).

Diante dos desafios concernentes ao emprego dos carboxilatos de ródio(II) que temos investido, as SPIO e a albumina de soro bovino (BSA) representam uma boa alternativa para se melhorar seu índice terapêutico. Atualmente, a albumina tem sido o foco da atenção da comunidade científica (ELZOGHBY; SAMY; ELGINDY, 2012). Seu sucesso é facilmente explicado pelas vantagens que oferece: biodegradabilidade, falta de toxicidade e imunogenicidade; fácil de purificar, quando metabolizado “*in vivo*” produz compostos inócuos, absorção preferencial em tecidos tumorais e inflamados; possui solubilidade aquosa e ampla aceitação na indústria farmacêutica (KRATZ, 2008).

Além disto, devido ao seu tamanho e a disponibilidade de sítios de ligação é capaz de interagir e/ou carrear com uma vasta quantidade de entidades químicas: íons metálicos (cálcio, cobre, zinco), fármacos (antibióticos, anti-inflamatórios, anticoagulantes e anestésicos) e complexos metálicos (cisplatina e auranofina)

(ELSADEK; KRATZ, 2012). Por isso, a albumina é considerada um carreador versátil para o direcionamento de fármacos. A interação da albumina com carboxilatos de rádio(II) foi estudada por Espósito e cooperadores (2000) assim como sua atividade antitumoral.

Já com respeito aos tipos de SPIO encontrados na literatura optamos por trabalhar com o óxido de ferro MGH obtido a partir da magnetita (MGT). Suas vantagens são devidas principalmente a sua estabilidade química, facilidade da rota sintética, baixo custo dos reagentes, biocompatibilidade e a possibilidade de funcionalização de sua superfície com uma grande quantidade de agentes terapêuticos, desde moléculas pequenas, como ácidos carboxílicos, até entidades biológicas como aminoácidos, proteínas e anticorpos (LAURENT, *et al.* 2008).

A elevada razão área/volume associado com o comportamento de superparamagnetismo é o grande responsável pela sua vasta aplicabilidade (SOLER, *et al.* 2012). Das aplicações em biomedicina merecem destaque sua utilização como agente de contraste em ressonância magnética nuclear, magnetohipertermia e como plataforma de liberação controlada e direcionada de agentes terapêuticos (CHAUDHURI; PARIÁ, 2012).

Tanto MGT quanto MGH possuem uma tendência natural para se aglomerarem espontaneamente ou quando submetidas a um campo magnético externo, em meio biológico, já que possuem dimensões nanométricas e elevada energia livre de superfície. A estratégia para se contornar esse problema, e também atribuir aplicabilidade às NP, é modificar suas propriedades de superfície. Isto é alcançado através do revestimento de sua superfície que pode ser realizado durante ou após a síntese das mesmas, com vários tipos de moléculas biocompatíveis e biodegradáveis. Este revestimento promove *i*) estabilidade coloidal, que ocorre em virtude de mecanismos de estabilização por repulsão estérica e eletrostática, *ii*) aumento do caráter hidrofílico, *iii*) aumento do tempo na corrente sanguínea e *iv*) fornece condições para encapsulamento e/ou adsorção de agentes terapêuticos (DIAS, *et al.* 2011).

Neste trabalho, o ácido láurico (cadeia carbônica com 12 carbonos) (LA) foi escolhido como material de revestimento da superfície de NP de MGH por apresentar as seguintes vantagens: *i*) biocompatibilidade das NP revestidas

(PRADHAN, *et al.* 2007), *ii*) aprovação para uso farmacêutico e na indústria de alimentos (KINDERLERER, 1994), *iii*) facilidade da síntese das NP revestidas e *iv*) por apresentar sítios para posterior associação com fármacos hidrofóbicos (SILVA, 2008).

O revestimento da superfície de MGH com uma bicamada de LA ocorre em duas etapas, sua representação está na figura 1.1c. Inicialmente as NP são revestidas com uma monocamada do surfactante através de quimissorção. Nesta reação química os grupos carboxilatos do LA se ligam aos átomos de ferro na superfície das NP atribuindo-lhes caráter hidrofóbico (figura 1.1b). Na próxima etapa, a outra camada do surfactante é adicionada, via fisissorção, ocorrendo interpenetração entre suas cadeias carbônicas formando uma bicamada de LA que circunda as NP. Assim, as NP de MGH revestidas com esta cobertura orgânica possuem uma região hidrofóbica, próximo às cadeias carbônicas, e outra região hidrofílica que está situada próximo aos grupos carboxilatos na porção terminal da cobertura (YANG, *et al.* 2010).

Já foi demonstrado o potencial destas dispersões de NP recobertas com LA de incorporar em sua estrutura fármacos como a mitoxantrona (TIETZE, *et al.* 2013; HORNUNG, *et al.* 2016), cloridrato de tetraciclina (LI, *et al.* 2016), anfotericina B (SALDANHA, 2012) e pluronic (JOEL, 2008). Como resultado, conseguiu-se um sistema com liberação controlada com eficácia terapêutica melhorada do fármaco.

Outros sistemas semelhantes são encontrados na literatura, como descrito por Dilnawaz e colaboradores (2010) que revestiram a superfície de NP de MGT com glicerol monooleato, um lipídeo sintético aprovado pelo FDA¹, e incorporaram paclitaxel no mesmo. O sistema mostrou alta concentração do fármaco e toxicidade em células MCF-7. Estratégia similar foi também adotada por Rutnakornpituk e colaboradores (2009). Neste caso, a indometacina (anti-inflamatório muito tóxico com severos efeitos colaterais) foi encapsulada em NP de MGT revestida com uma

¹ FDA é uma sigla para Food and Drug Administration. Departamento de saúde e serviços humanos dos Estados Unidos. É responsável pela proteção da saúde pública assegurando a segurança, eficácia e qualidade de medicamentos de uso humano e veterinário, vacinas e outros produtos biológicos e dispositivos médicos. FDA também é responsável pela segurança da maioria dos suplementos alimentares e dietéticos, cosméticos e produtos que emitem radiação.

bicamada composta por ácido oleico, como primeira camada, e polietilenoglicol, como segunda camada.

Todos estes exemplos nos motivaram a investir na dispersão coloidal de MGH revestida com bicamada de LA como plataforma para encapsulamento/adsorção com os carboxilatos de ródio(II) que temos trabalhado. Além disto, os grupos carboxilatos livres da segunda camada do surfactante fornecem condições de se estabelecer ligações com proteínas e outras moléculas (LI, *et al.* 2012; TRAN; VO; TRAN, 2015).

Por tudo o que foi dito, a associação dos carboxilatos de ródio(II) em uma dispersão coloidal de MGH revestidas com bicamada de LA representam uma alternativa promissora para se potencializar os efeitos antitumorais destes fármacos. O sistema nanoestruturado pode ser usado como plataforma de liberação direcionada dos complexos acetato, propionato, butirato e succinato de ródio(II). O conjugado formado a partir da dispersão coloidal com superfície modificada funcionalizado com os carboxilatos de ródio(II) representa assim uma potencial alternativa no tratamento do câncer. Por fim, pretendeu-se melhorar o perfil farmacocinético criando um sistema altamente biodegradável, biocompatível, atóxico e imunogênico através da interação deste conjugado com BSA.

1.2 Objetivos gerais

Este trabalho tem por objetivo geral a associação de carboxilatos de ródio(II) com uma dispersão coloidal de nanopartículas de maguemita revestidas com uma bicamada de ácido láurico e posteriormente com albumina de soro bovino.

1.3 Objetivos específicos

- Preparar uma dispersão coloidal de nanopartículas de maguemita revestidas com bicamada de ácido láurico e funcionalizar com os complexos acetato, propionato, butirato e succinato de ródio(II).
- Realizar estudos de adsorção dos compostos de ródio nas dispersões de maguemita revestidas com bicamada de ácido láurico.
- Adsorver BSA à dispersão funcionalizada com succinato de ródio(II).

- Caracterizar as dispersões funcionalizadas.
- Avaliar a estabilidade coloidal das dispersões funcionalizadas.
- Avaliar o potencial citotóxico dos coloides produzidos em células de carcinoma mamário MCF-7 e fibroblastos em cultura.

CAPÍTULO 2 – PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Todos os reagentes empregados neste trabalho foram adquiridos comercialmente sem prévia purificação e encontram-se listados na tabela 2.1.

Tabela 2.1. Reagentes utilizados.

Reagentes	Marca	Pureza
Ácido butírico	VETEC	P.A
Ácido propiônico	VETEC	P.A
Ácido láurico	VETEC	P.A
Albumina de soro bovino	Acros Organics	P.A
Acetato de sódio	VETEC	99%
Ácido acético glacial	Synth	P.A. ACS
Ácido clorídrico	VETEC	P.A
Ácido succínico	Baker Analysed Reagent	99,80%
Ácido trifluoracético	Sigma Aldrich	99%
Cloreto de ferro(II) tetrahidratado	Acros	99%
Cloreto de ferro(III) hexahidratado	VETEC	97 - 102%
Cloreto de sódio anidro	Isofar	99%
Cloreto de ródio(III) trihidratado	Omicore	40%
DMEM ²	Sigma Aldrich	
DMSO	Sigma Aldrich	>99%
Diclorometano	Ecibra	P.A.
Etanol absoluto	NUCLEA	P.A. ACS
Éter de petróleo	Chemco	P.A.
Éter etílico	Chemco	P.A.
Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]	Thermo Fisher Scientific	
Hidróxido de sódio	IMPEX	P.A.
Metanol	Chemco	P.A. ACS
Sulfato de sódio anidro	Merck	99%

2.1 Síntese dos carboxilatos de ródio(II)

A síntese dos complexos acetato de ródio(II), (AR), propionato de ródio(II), (PR), e butirato de ródio(II) (BR), foi realizada utilizando o sal sódico do ácido carboxílico correspondente. Assim, os ácidos propiônico e butírico foram neutralizados com solução de NaOH em proporções estequiométricas (CHILDERS; STRUTHERS, 1955). Na preparação do succinato de ródio(II) (SR) utilizou-se o ácido carboxílico neutro.

² A especificação do frasco é D5648. Possui L-glutamina, vermelho de fenol, piruvato de sódio e alta concentração de glicose.

Na síntese dos complexos de ródio(II) foi utilizado o sólido cloreto de ródio triidratado ($\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). Assim, foram pipetados 7,5 mL da solução de $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 38% em um béquer de vidro de 40 mL e colocado em estufa a 80°C até que se verificou evaporação completa do líquido, totalizando 12 horas. O sólido obtido $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (6,45 g; 24 mmol) foi armazenado em dessecador. A figura 2.1 mostra um esquema com as etapas de síntese e purificação para os compostos AR, PR, BR e SR.

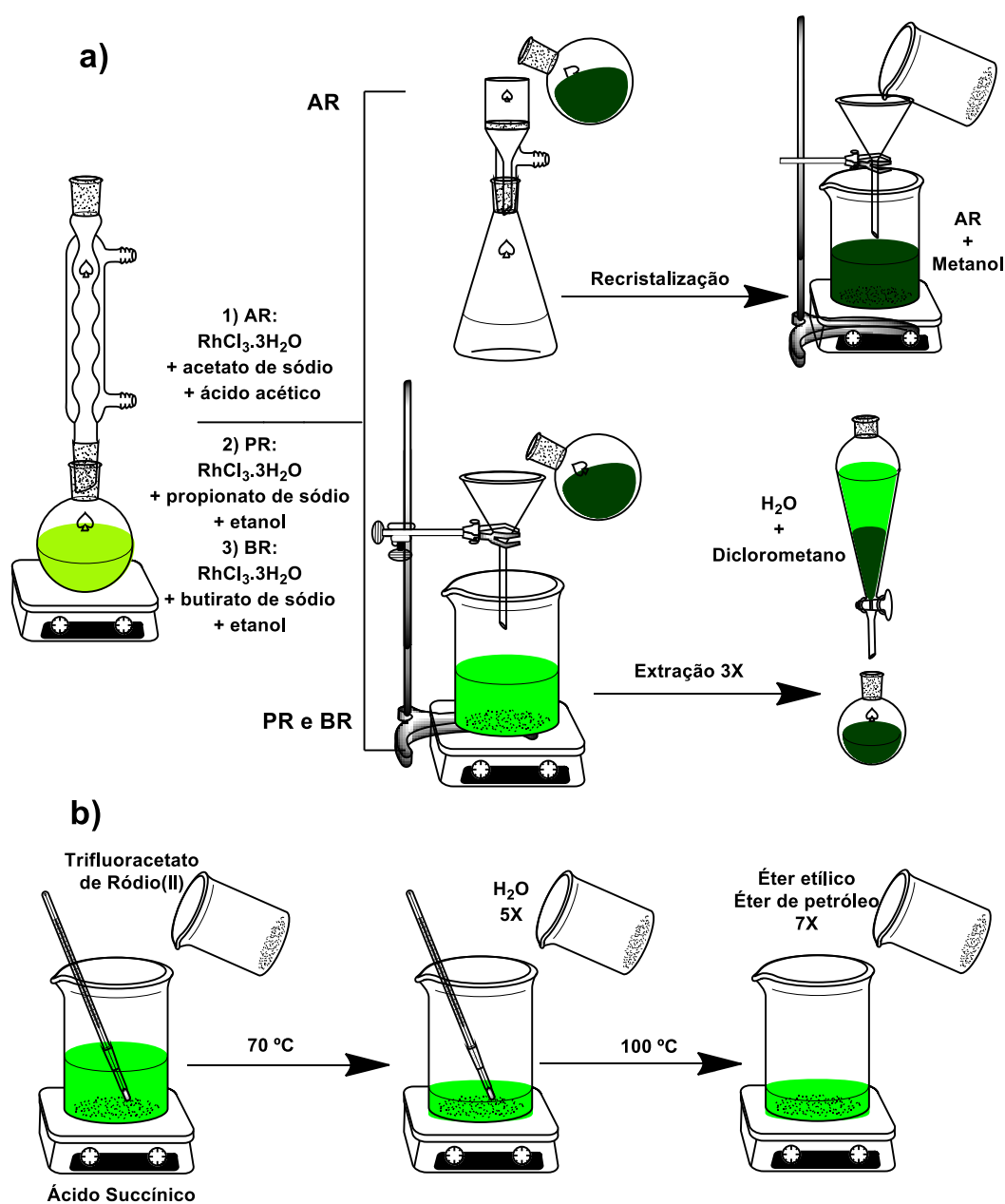


Figura 2.1. Esquema do procedimento de síntese para os complexos a) AR, PR e BR e b) SR.

2.1.1 Acetato de ródio(II), (AR)

A uma massa de $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (4,3 g, 16 mmol) foram adicionados 80 mL de etanol com agitação manual até completa dissolução do sal. Esta solução foi misturada com outra solução de acetato de sódio (4,9 g, 60 mmol) dissolvida em 80 mL de ácido acético glacial. O sistema foi aquecido sob refluxo por 2 horas sob agitação magnética. A formação do complexo pôde ser evidenciada pela coloração do meio a qual mudou de vermelho-vinho para verde escuro e a formação de um precipitado. A mistura foi filtrada em um funil de placa porosa N° 4 e recristalizado utilizando metanol. O solvente foi aquecido até redução de 2/3 do volume, resfriado à temperatura ambiente e o béquer colocado no freezer por 12 horas. Os cristais verdes foram coletados, lavados 3 vezes com metanol gelado e secos na estufa a 80°C por 16 horas. Rendimento: 1,1 g (2,5 mmol), 31,3%.

2.1.2 Butirato de ródio(II), (BR)

A uma massa de $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (541 mg, 2,1 mmol) foram adicionados 125 mL de etanol seguido da adição de butirato de sódio (991 mg, 9,0 mol). O sistema foi aquecido sob refluxo por 4 horas sob agitação magnética, até que se observou mudança na coloração, de vermelho-vinho para verde escuro. Após isto, a solução foi resfriada à temperatura ambiente, filtrada em papel de filtro e novamente aquecida até redução de 2/3 do volume. A seguir, procedeu-se com a extração do complexo utilizando uma mistura de diclorometano e água (33:67). A fase aquosa, menos densa, foi lavada 3 vezes com diclorometano. Na_2SO_4 foi adicionado à fase orgânica, a qual foi filtrada em papel de filtro. A solução obtida foi evaporada a pressão reduzida até secura. O sólido obtido foi seco em estufa a 70°C por 17 horas. Rendimento: 0,31 mg (0,56 mmol), 53,3%.

2.1.3 Propionato de ródio(II), (PR)

Uma massa de $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (1 g, 3,8 mol) foi dissolvida em cerca de 300 mL de etanol seguido da adição de propionato de sódio (1,48 g, 15,0 mol). O restante do procedimento foi o mesmo empregado na síntese do BR. Rendimento: 0,48 g (0,96 mmol), 50,5%.

2.1.4 Succinato de ródio(II), (SR)

O SR foi sintetizado a partir do precursor trifluoracetato de ródio(II) o qual foi sintetizado a partir do AR conforme relatado por Bear, Kitchens e Willcott (1971). Uma solução de 15 mL de trifluoracetato de ródio(II) (251 mg, 0,38 mmol) foram adicionadas em pequenas porções sobre 20 mL de uma solução de ácido succínico (0,63 g, 5,3 mmol) aquecida à 70°C. Depois que toda solução de trifluoracetato de ródio(II) foi adicionada, a temperatura foi elevada à 100°C para evaporação da água até próximo da *secura*. Alíquotas de 5 mL de água foram adicionadas e evaporadas sendo esta etapa repetida por cinco vezes. A massa pastosa obtida foi dissolvida em éter etílico seguido da adição de éter de petróleo até que se observasse a turvação do meio. Esse processo foi repetido por sete vezes até que o composto se apresentasse como um sólido finamente dividido. Por fim, o sólido foi lavado três vezes com éter etílico sendo logo em seguida colocado no dessecador. Rendimento: 136,6 mg (0,21 mmol), 55,3%. Devido à baixa solubilidade aquosa do complexo em sua forma ácida foi neutralizado com uma solução de NaOH 0,01 mol L⁻¹ até o ponto de equivalência, em torno de pH = 8,2. Assim, a solução de succinato de ródio(II) de sódio (Na₄[Rh₂(C₄H₅O₄)₄]) foi utilizada nos próximos experimentos.

2.2 Síntese da dispersão coloidal de nanopartículas de maguemita, (MGH)

Na síntese das NP de MGH foi empregado o método clássico e amplamente utilizado da coprecipitação em meio alcalino dos íons Fe²⁺ e Fe³⁺ (KANG, *et al.* 1996). Um esquema desta síntese está ilustrado na figura 2.2. As soluções de ferro foram preparadas separadamente segundo a proporção de 1:2 para Fe²⁺: Fe³⁺. Duas soluções aquosas de 100 mL, FeCl₂.4H₂O (3,73 g, 19 mmol) e FeCl₃.6H₂O (10,13 g, 37 mmol), foram misturadas e o volume completado para 250 mL em balão volumétrico. 0,5 mL de ácido clorídrico 37% foi adicionado para evitar hidrólise e oxidação dos íons Fe²⁺. Esta solução foi colocada em um funil de adição e gotejada a 200 mL de uma solução de NaOH 0,75 mol L⁻¹ sob agitação magnética a 1200 rpm. Um precipitado preto magnético característico de MGT formou-se instantaneamente. Após o término da adição, a agitação continuou por mais 30 minutos. O sólido foi separado do sobrenadante utilizando um ímã e as NP foram lavadas 6 vezes com água deionizada para retirada de íons cloreto. A água de

lavagem foi testada com solução de AgNO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para acompanhar a completa retirada dos íons cloreto.

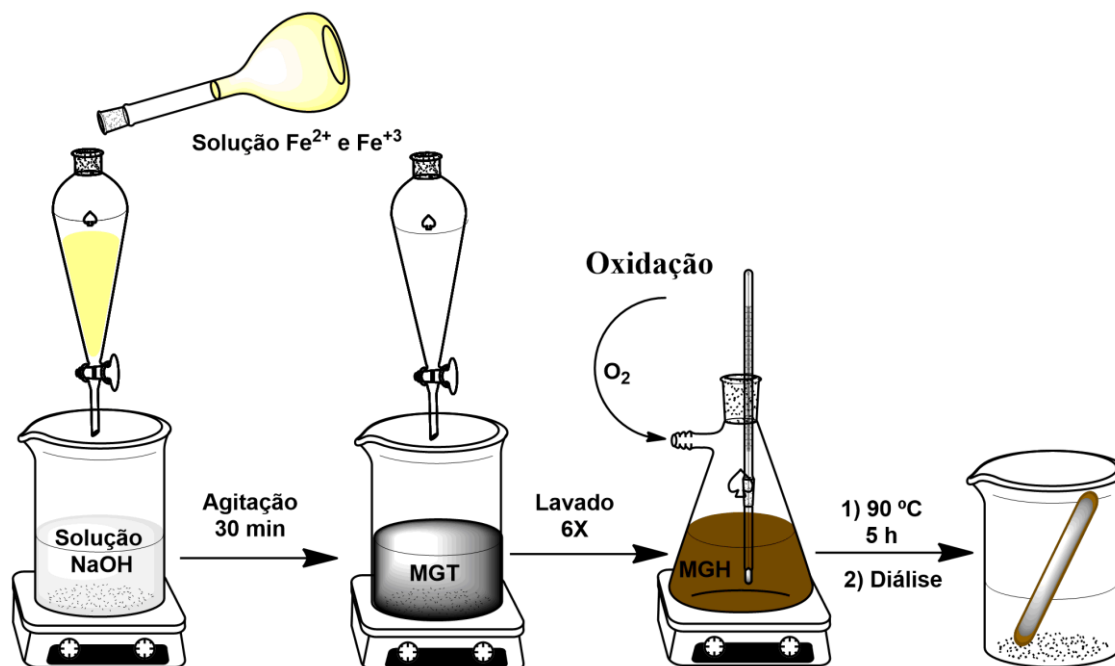


Figura 2.2. Esquema do procedimento empregado na síntese das NP de MGT e posterior oxidação à MGH.

A oxidação da MGT para MGH foi realizada conforme descrito por Sun e colaboradores (2004). As NP foram transferidas para um kitassato, dispersas em 250 mL de água, e o pH ajustado para 3,5 com ácido clorídrico 37%. A dispersão coloidal de MGT foi submetida à agitação magnética e aquecimento. Quando a temperatura atingiu 90°C , oxigênio foi borbulhado à dispersão coloidal por um período de 5 horas havendo mudança na coloração, de preto para marrom avermelhado. Alíquotas de água foram adicionadas para evitar secura. Por fim, a dispersão coloidal de MGH foi resfriada a temperatura ambiente, dialisada (cut-off: 12000 – 16000, porosidade de 25 \AA) por 24 horas, para remoção de contraíons, e sonicada por 10 minutos.

2.3 Revestimento das nanopartículas de maguemita com bicamada de ácido láurico, (MGH-LL)

O revestimento da MGH com bicamada de LA foi realizado conforme procedimento descrito na literatura com algumas modificações (FU; DRAVID;

JOHNSON, 2001). A reação ocorre em duas etapas sucessivas em uma proporção molar de 4:1 para $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ³ e LA em cada etapa (ou 0,31 g/g para LA/ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Na primeira etapa, as NP são revestidas com uma monocamada de LA (MGH-L), e na segunda etapa, a bicamada de LA é formada após adição de mais uma alíquota do surfactante (MGH-LL). Um esquema das etapas desta reação está ilustrado na figura 2.3.

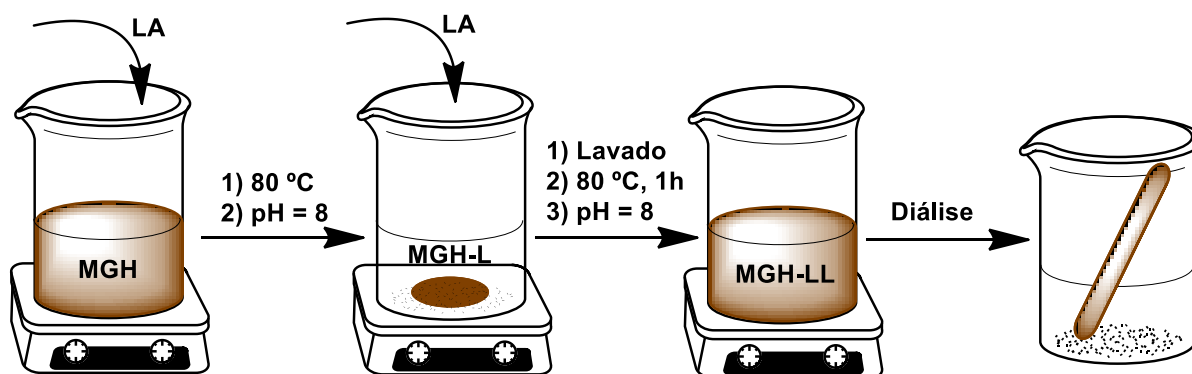


Figura 2.3. Esquema do procedimento empregado no revestimento de uma dispersão coloidal MGH com monocamada de LA (MGH-L) e posteriormente bicamada de LA (MGH-LL).

Em um béquer de 100 mL foram adicionados 60 mL da dispersão coloidal MGH ($[\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3] = 0,3 \text{ mol L}^{-1}$, pH = 4) seguido da adição de 60 mL de água deionizada. O sistema foi submetido à aquecimento e agitação mecânica a 700 rpm. Quando a temperatura atingiu 60°C, LA (736 mg, 1,1 mmol) foi adicionado em pequenas porções, com auxílio de espátula. Elevou-se a temperatura para 80°C e o pH foi ajustado para 8 com solução de NaOH 0,01 mol L⁻¹ havendo rápida sedimentação indicando a formação da monocamada de laurato. As NP foram lavadas 5 vezes com água deionizada para retirada do excesso de LA. A fim de se verificar a formação da monocamada uma alíquota de MGH-L foi dispersa em hexano havendo formação imediata de dispersão coloidal. Na segunda etapa foi empregado o mesmo procedimento que na etapa anterior, excetuando-se o ajuste

³ A concentração de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ na dispersão coloidal foi obtida a partir da [Fe] considerando que 1 mol de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ corresponde a 2 mol de Fe.

contínuo do pH. A solução de NaOH foi adicionada sempre de modo a manter o pH em torno de 8, havendo necessidade de constante reajuste até que as NP se dispersassem completamente no meio aquoso, evidenciando assim a formação da bicamada de LA. Após estabilização do pH e peptização das NP, o sistema permaneceu em agitação a 80°C por 1 hora. Depois desse tempo o sistema foi resfriado até temperatura ambiente, a dispersão coloidal filtrada em papel de filtro e dialisada (cut-off: 12000 – 16000, porosidade de 25 Å) em água deionizada por 2 dias para remoção de contraíons e excesso de laurato. A presença de laurato na água utilizada na diálise foi verificada com a adição de algumas gotas de solução de HCl 0,1 mol L⁻¹, que faz a solução ficar turva havendo formação de um precipitado branco característico de LA. Dois lotes de amostra MGH-LL foram preparados para os experimentos de adsorção e funcionalização.

2.4 Estudo de adsorção

O estudo de adsorção foi realizado utilizando a dispersão coloidal MGH-LL ([Fe] = 0,19 mol L⁻¹, pH = 7,2) e as soluções dos complexos AR (2,42 mmol L⁻¹, pH = 7,23), PR (1,86 mmol L⁻¹, pH = 7,1), BR (1,21 mmol L⁻¹, pH = 5,84) e SR (2,15 mmol L⁻¹, pH = 8,2). Para cada sistema foram utilizados 8 tubos de ensaio nos quais foram colocados 0,5 mL (47,5 mol de γ -Fe₂O₃) da dispersão coloidal MGH-LL seguido da adição das alíquotas das soluções dos complexos AR, PR, BR e SR produzindo os lotes de amostras MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR e MGH-LL/SR, respectivamente, de modo a satisfazer a razão de adsorção (R_{adc}), expressa em mmol de complexo por mol do óxido de ferro (tabela 2.2). O volume final adotado para os sistemas MGH-LL/AR, MGH-LL/PR e MGH-LL/SR foi determinado pela soma do volume da dispersão coloidal com as alíquotas das soluções referente a maior concentração dos complexos de ródio(II) alcançada, ou seja, aquela alíquota da solução referente ao $R_{adc} = 60$. Assim, exclusivamente para esta condição não foram adicionados alíquotas de água. Para as demais condições, $R_{adc} = 4 - 30$, após adição das alíquotas das soluções o volume foi completado com água para 1672 μ L, 2026 μ L e 1820 μ L para MGH-LL/AR, MGH-LL/PR e MGH-LL/SR, respectivamente. Para o sistema MGH-LL/BR foi adotado um volume final de 2500 μ L, sendo necessário completar o volume com água em toda faixa de R_{adc} trabalhada, e na condição de $R_{adc} = 60$ foram utilizados apenas 400 μ L (38 μ mol de γ -Fe₂O₃) da

dispersão coloidal MGH-LL. As amostras foram colocadas em um banho termostático sob agitação a 25°C por 24 horas. Depois disto, o meio de dispersão foi separado das NP em uma célula de ultrafiltração (5 KDa, 25 mm) a uma pressão de 50 kgf/m², e, as NP foram lavadas com água a qual foi acrescentada ao meio de dispersão já coletado. O experimento foi feito em duplicata e a taxa de adsorção dos complexos de ródio(II) foi obtida por meio do balanço de massa através da determinação da concentração de ródio⁴ na fase de dispersão coletada. As isotermas de adsorção foram construídas colocando a quantidade de complexo adsorvido (Q_{ads}), expresso em mmol de complexo por mol de γ -Fe₂O₃, em função da concentração de equilíbrio (C_{eq}) que corresponde à concentração dos complexos não adsorvidos ao adsorvente.

2.5 Preparação de dispersões coloidais de maguemita revestidas com bicamada de ácido láurico funcionalizadas com complexos de ródio(II)

As dispersões coloidais de MGH-LL funcionalizadas com complexos de ródio(II) foram preparadas tomando-se como base a isoterma de adsorção obtida, utilizando $R_{adc} = 20$. Assim, alíquotas das soluções de AR, PR e BR foram adicionadas em 5 mL de uma dispersão coloidal MHG-LL ($[Fe] = 41,6 \text{ mmol L}^{-1}$, pH = 7,2) preparada para este experimento, de acordo com a tabela 2.3. No preparo da dispersão coloidal com a solução de SR, foram utilizados 15 mL da mesma dispersão coloidal MHG-LL. As amostras ficaram sob agitação por tombamento a 100 rpm por 24 horas. A seguir as amostras foram lavadas numa célula de ultrafiltração⁵ (5 KDa, 25 mm) a uma pressão de 50 kgf/m² e depois filtradas em papel de filtro para remoção de NP sedimentadas. Alíquotas das amostras foram retiradas para análise dos teores de ferro e ródio.

⁴ Por meio da $[Rh]$ é obtida a concentração de cada complexo considerando-se que 2 mol de ródio correspondem a 1 mol do carboxilato de ródio(II): $[Rh_2(RCOO)_4] \rightarrow 2 Rh$

⁵ Inicialmente, as dispersões coloidais funcionalizadas foram dialisadas para remoção de excesso dos complexos de ródio(II) não adsorvidos. Contudo, por motivos não esclarecidos, as dispersões se desestabilizavam muito durante a diálise sendo esse método descartado. Por isso, optou-se pela ultrafiltração mesmo havendo perdas de NP durante a lavagem.

Tabela 2.2. Número de mol (n_{mol}), volume (V) e concentração inicial (Ci) dos adsorvatos AR (2,42 mmol L⁻¹, pH = 7,23), PR (1,86 mmol L⁻¹, pH = 7,1), BR (1,21 mmol L⁻¹, pH = 5,84) e SR (2,15 mmol L⁻¹, pH = 8,2) adicionados em 0,5 mL do adsorvente MGH-LL ([Fe] = 0,19 mol L⁻¹, pH = 7,2). A razão de adsorção (R_{adc}) está expressa em mmol de complexo de ródio(II) por mol de γ -Fe₂O₃.

R_{adc}	$n_{mol} / 10^{-9} \text{ mol}$	MGH-LL/AR		MGH-LL/PR		MGH-LL/BR		MGH-LL/SR	
		^a Ci /		^a Ci /		^a Ci /		^a Ci /	
		V / 10 ⁻⁶ L	10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	V / 10 ⁻⁶ L	10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	V / 10 ⁻⁶ L	10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	V / 10 ⁻⁶ L	10 ⁻⁶ mol L ⁻¹
4	188,8	78	113	102	94	156	76	88	104
6	283,1	117	169	153	140	235	114	132	156
8	377,5	156	116	203	186	313	151	176	208
10	472	195	282	254	233	391	189	220	260
16	757,5	313	453	407	374	625	303	352	416
20	946,2	391	566	509	467	782	378	440	520
30	1418,1	586	848	763	700	1173	568	660	780
60	2836,2 ^b 2270	1172	1696	1526	1401	^b 1876	997	1320	1559

^a Ci é a concentração de cada complexo de ródio(II) depois de completado o volume para o valor fixo estipulado em cada sistema.

^b Unicamente para esta condição foi utilizado 400 μ L (38 μ mol de γ -Fe₂O₃) da dispersão coloidal MGH-LL para MGH-LL/BR.

Tabela 2.3. Condição de funcionalização das dispersões coloidais MGH-LL com os carboxilatos de ródio(II): AR (MGH-LL/AR), PR (MGH-LL/PR), BR (MGH-LL/BR) e SR (MGH-LL/SR).

Amostras	^a C _S / 10 ⁻³ mol	^a V _S / 10 ⁻⁶ L	^b Ci / 10 ⁻³ mol	^c C _(γ-Fe₂O₃) / 10 ⁻³ mol	^d pH
MGH-LL/AR	2,54	820	0,36	17,9	6,83
MGH-LL/PR	2,03	1025	0,35	17,3	6,80
MGH-LL/BR	1,21	1720	0,31	15,5	6,81
MGH-LL/SR	1,62	3840	0,33	16,6	7,50

^a C_S e V_S são as concentrações e volumes, respectivamente, das soluções dos complexos AR, PR, BR e SR adicionados à dispersão coloidal MGH-LL.

^b Ci é a concentração inicial do complexo de ródio(II) no sistema logo após adição das alíquotas das soluções.

^c C_(γ-Fe₂O₃) é a concentração inicial do óxido de ferro após adição das alíquotas das soluções.

^d pH da dispersão coloidal após ser lavada.

2.6 Preparação de dispersão coloidal de maguema revestida com bicamada de ácido láurico funcionalizada com succinato de ródio(II) e albumina de soro bovino (MGH-LL/SR/BSA e MGH-LL/BSA/SR)

Para o experimento de funcionalização com BSA a amostra MGH-LL/SR foi escolhida por apresentar bom perfil de adsorção e por possuir grupos carboxilatos disponíveis para interação com os sítios do BSA. A razão de adsorção escolhida foi de 1 mmol de BSA por mol de γ-Fe₂O₃ (PENG; HIDAJAT; UDDIN, 2004) e 20 mmol de SR por mol de γ-Fe₂O₃. Assim, 1 mL de uma solução de BSA 0,071 mmol L⁻¹ recém preparada foi adicionada a 5 mL da amostra MGH-LL/SR ([Fe] = 28,4 mmol L⁻¹, [SR] = 0,24 mol L⁻¹) preparada na seção 2.5. O sistema ficou sob agitação por tombamento a 100 rpm por 1 hora. Em seguida, a amostra foi lavada numa célula de ultrafiltração (100 KDa, 25 mm), a uma pressão de 50 kgf/m², e o líquido coletado em balões volumétricos para análise do teor de BSA. A dispersão coloidal resultante funcionalizada com BSA (MGH-LL/SR/BSA) foi então filtrada em papel de filtro para remoção de NP sedimentadas.

Um segundo lote de amostra foi preparado, nas mesmas condições de MGH-LL/SR/BSA, utilizando 6,6 mL de uma solução de BSA 0,022 mmol L⁻¹, 7 mL da amostra MGH-LL ([Fe] = 41,6 mmol L⁻¹) e 1800 μL de uma solução SR 1,62 mmol L⁻¹. A única diferença foi a ordem de adição de SR e BSA a qual foi invertida: primeiro foi adicionado BSA, e depois SR (MGH-LL/BSA/SR). Este lote de amostra foi reservado para o experimento de cinética de liberação.

2.7 Cinética de liberação dos complexos de ródio(II) em meio de cultura

A cinética de liberação dos complexos de ródio(II) foi realizado utilizando membrana de diálise (cut-off: 12000 – 16000, porosidade de 25 Å), meio de cultura DMEM e água deionizada, e realizados em duplicata apenas para os sistemas MGH-LL/AR, MGH-LL/PR e MGH-LL/BR. Todas as dispersões coloidais foram preparadas um dia antes do experimento para garantir que os complexos de ródio(II) fossem liberados em grande extensão no meio de cultura. Inicialmente foi feito um teste preliminar apenas com as dispersões coloidais MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA num período de cinco dias sendo observada uma liberação bastante lenta para SR. Para os demais sistemas o tempo adotado foi de 24 horas.

Tabela 2.4. Condições de preparo das amostras funcionalizadas em DMEM na cinética de liberação dos carboxilatos de ródio(II).

Amostra	^a [CR] / $\mu\text{mol L}^{-1}$	^b V_{CR} / mL	^c V_{al} / μL	^d [CR ^{DMEM}] / $\mu\text{mol L}^{-1}$
MGH-LL/AR	161	2	800	80,5
MGH-LL/PR	186	2	800	93,0
MGH-LL/BR	101	1,5	700	44,0
MGH-LL/SR	109	2	500	54,5
MGH-LL/SR/BSA	82	2	500	41,0
MGH-LL/BSA/SR	104	2	500	52,0

^a [CR] = concentração de carboxilato de ródio(II) na dispersão coloidal funcionalizada utilizada.

^b V_{CR} = volume das dispersões coloidais funcionalizadas adicionadas em 2 mL de DMEM.

^c V_{al} = alíquotas das misturas retiradas após os intervalos programados.

^d [CR^{DMEM}] = concentrações inicial dos carboxilatos de ródio(II) logo após diluição em DMEM.

A tabela 2.4 mostra as condições em que foi conduzido o experimento. Volumes das dispersões coloidais recém-preparadas MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR, MGH-LL/SR, MGH-LL/SR/BSA e MGH-LL/BSA/SR foram misturados com 2 mL de DMEM e colocados em membrana de diálise produzindo as amostras MGH-LL/AR*^{DMEM}, MGH-LL/PR*^{DMEM}, MGH-LL/BR*^{DMEM}, MGH-LL/SR*^{DMEM}, MGH-LL/SR/BSA*^{DMEM} e MGH-LL/BSA/SR*^{DMEM}, respectivamente. Depois disto cada amostra foi colocada em um béquer com água deionizada. A liberação dos complexos de ródio(II) foi avaliada retirando-se alíquotas das misturas nos intervalos de 6, 12, 26, 50, 74 e 148 horas para MGH-LL/SR*^{DMEM}, MGH-LL/SR/BSA*^{DMEM} e MGH-LL/BSA/SR*^{DMEM}; e nos intervalos de 1, 2, 4, 6 e 24 horas para MGH-

LL/AR*^{DMEM}, MGH-LL/PR*^{DMEM} e MGH-LL/BR*^{DMEM}. Os experimentos foram realizados de modo que sempre após a retirada das alíquotas a água foi trocada para se atingir novo equilíbrio. As alíquotas retiradas foram digeridas em HClO₄ e H₂O₂ a quente para determinação do teor de ródio.

As curvas expressas em porcentagem de liberação cumulativa dos complexos de ródio(II) em função do tempo decorrido foram construídas calculando-se o número de mol de AR, PR, BR e SR nas alíquotas retiradas das dispersões coloidais diluídas em DMEM e comparando esses valores com aqueles presentes no intervalo anterior sabendo-se para isto as concentrações dos complexos de ródio(II) e os volumes cada vez que uma nova alíquota era retirada.

2.8 Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de toxicidade foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica no Instituto de Biologia (UNB) pela Ma. Joséilma Luciana Neves Siqueira. Células da linhagem MCF-7 (carcinoma mamário humano) e fibroblastos de polpa dentária humana foram cultivados em meio DMEM, suplementado com 3,7 g/L de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). Os fibroblastos foram utilizados para demonstrar a citotoxicidade dos ativos em células normais.

Para o ensaio de citotoxicidade baseado no método colorimétrico do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT), foram semeadas 5×10^3 células/poço em placa de cultura com 96 poços e mantidas durante a noite em incubadora com atmosfera úmida a 37°C e 5% de CO₂. As amostras foram tratadas em triplicata com as dispersões coloidais MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR, MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA nas concentrações de 5, 10 e 20 µM para os respectivos complexos de ródio(II), e com os grupos controles MGH-LL e MGH-LL/BSA nas concentrações de 0,65, 1,3 e 2,6 mM para a [Fe] que correspondem as mesmas concentrações de [Fe] em cada poço para os três valores de concentrações dos complexos de ródio(II) adotados, respectivamente. Uma triplicata não recebeu tratamento (controle negativo) e Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado para controle de branco.

Após 24 e 48h, o tratamento foi removido e as amostras foram incubadas com 0,5 mg/mL de MTT em meio de cultura. Depois de 2,5 horas, a solução foi substituída por 200 µL de DMSO/poço para solubilização dos cristais de formazan. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 595 nm de comprimento de onda em espectrofotômetro SpectraMax M5 da Molecular Devices com auxílio do software Axion Vision 4.7.1. A viabilidade celular relativa (%) foi calculada pela fórmula:

$$[A]_{\text{tratamento}} / [A]_{\text{controle}} \times 100,$$

onde $[A]_{\text{tratamento}}$ é a absorbância da amostra testada e $[A]_{\text{controle}}$ é a absorbância do grupo controle que continha apenas o meio de cultura. A absorbância dos grupos tratados foi normalizada com os valores do grupo controle.

2.9 Caracterização química e física

2.9.1 Análise termogravimétrica

As curvas termogravimétricas foram obtidas em um equipamento Shimadzu modelo DTG-60. Alíquotas de aproximadamente 2 mL das amostras MGH, MGH/L, MGH/LL, MGH/LL-AR, MGH/LL-PR, MGH/LL-BR e MGH/LL-SR foram colocadas na estufa a 100°C por cerca de 5 horas, as amostra MGH-LL/SR/BSA ficou por 5 horas a 50°C. Alíquotas de 6 a 15 mg das amostras foram aquecidas até 850°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, em cadinho de platina sob fluxo de nitrogênio (vazão de 50 mL/min.). No cálculo relativo às perdas de massa o software do equipamento foi utilizado.

2.9.2 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro Spectrum 400 da Perkin Elmer. Foram analisadas as amostras MGH-LL, MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR, MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA. As amostras que continham BSA foram secas em estufa a 50°C por 5 horas e as demais a 100°C por 5 horas. A técnica de transmitância foi empregada variando-se a região espectral de 4000 a 400 cm⁻¹, com 8 *scans* e resolução de 4 cm⁻¹.

2.9.3 Espectroscopia eletrônica de ultravioleta e visível

Os espectros na região do ultravioleta e visível foram obtidos em um espectrofotômetro Lambda 45 da Perkin Elmer. Foi empregado com o objetivo de quantificar BSA na solução proveniente da lavagem de MGH-LL/SR/BSA. Um solução de BSA 7600 ppm foi preparada no dia da análise e as leituras foram feitas variando-se a concentração em uma faixa de 4,2 a 416 ppm. A varredura foi feita de 230 nm a 320 nm. A regressão linear foi obtida colocando a absorbância máxima, registrada em 279 nm, em função das respectivas concentrações.

2.9.4 Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução

As micrografias foram obtidas em um microscópio eletrônico de transmissão da marca Jeol (Thermo Scientific), modelo JEM-2100, operado em 200 kV e realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) no Instituto de Física (UFG). Retirou-se 1 mL das amostras MGH-LL, MGH-LL/BR, MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA as quais foram diluídas e submetidas a ultrassom, a 20 kHz, por 10 minutos para melhor dispersão das NP. Logo depois, as amostras foram gotejadas em telas de cobre revestidas com um filme de carbono, e colocadas em dessecador por 24 horas. As imagens obtidas foram analisadas e os dados tratados utilizando o software imageJ v1.33u⁶.

2.9.5 Análise do teor de ferro

A determinação do teor de ferro das amostras foi realizada em um espectrofotômetro Lambda 45 da Perkin Elmer utilizando o método colorimétrico da o-fenantrolina (JEFFERY, *et al.* 1989). Alíquotas de 1 mL das amostras foram digeridas em HClO₄ e HCl a quente. As leituras foram feitas em 515 nm e os padrões de ferro preparados na faixa de 0,5 a 3,5 ppm. A regressão linear foi obtida colocando as absorbâncias registradas em função das respectivas concentrações.

⁶ O software ImageJ, é amplamente utilizado na contagem de nanopartículas em diversos tipos de dispersões coloidais. Disponível em <https://imagej.nih.gov/ij/>

2.9.6 Espectroscopia de absorção atômica (AAS)

O teor de ródio das amostras foi obtido em um espectrofotômetro de absorção atômica por chama Analyst 400 da Perkin Elmer utilizando a linha espectral do ródio de 343,5 nm. Alíquotas das amostras foram digeridas em HNO₃ e HClO₄ a quente. Os padrões de ródio foram preparados na faixa de 0,5 a 9,5 ppm. A regressão linear das curvas obtidas foi realizada pelo software do equipamento.

2.9.7 Magnetometria de amostra vibrante

As curvas de magnetização foram obtidas em um magnetômetro de amostra vibrante EV9 da ADE-MAGNETICS. As medidas foram feitas no Laboratório de Magnetometria e Magnetotransporte no Instituto de Física (UFG). Alíquotas das dispersões coloidais MGH, MGH-LL, MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR, MGH-LL/SR foram secas em estufa a 100 °C e para a dispersão coloidal MGH-LL/SR/BSA foi seca em estufa a 50 °C. As amostras foram analisadas utilizando um porta amostra de vidro com um bastão de vidro fixado no equipamento. As medidas foram feitas à temperatura ambiente numa faixa de -20000 a 20000 Oe com precisão de 10⁻⁶ meu.

2.9.8 Difractometria de Raios X

Os difratogramas foram obtidos pelo método do pó em um equipamento Shimadzu modelo XRD 6000 utilizando a radiação do Ka-Cu ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$), 40 KV e 30 mA. Alíquotas das dispersões coloidais MGH e MGH-LL foram secas em estufa a 100°C por 3 horas e trituradas em almofariz de ágata. A leitura foi feita em um antirreflectivo variando-se o ângulo de 10° a 80° a 2° min⁻¹.

2.9.9 Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta

As dispersões coloidais foram avaliadas quanto ao potencial zeta, utilizando medidas de mobilidade eletroforética, e quanto ao diâmetro hidrodinâmico, por meio de espalhamento de luz dinâmico (DLS), em um equipamento Zetasizer Nano ZS90, da Malvern Instruments. O potencial zeta foi calculado pela equação de Henry (equação 2.1):

$$\zeta = \frac{U_E 3\eta}{2\varepsilon_d f(Ka)} \quad (2.1)$$

Em que ζ é o potencial zeta, U_E é a mobilidade eletroforética, η é a viscosidade, ε_d é a constante dielétrica do dispersante e $f(ka)$ é a função de Henry. Foi utilizado o valor de 1,5 conforme aproximação de Smoluchowski (MALVERN, 2005).

O tamanho médio das NP nas dispersões coloidais foi calculado por meio da equação de Stokes-Einstein (equação 2.2):

$$D_H = \frac{K_B T}{3\pi\eta D} \quad (2.2)$$

em que D_H é o diâmetro hidrodinâmico, D é o coeficiente de difusão translacional, K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta e η é a viscosidade do meio de dispersão. As medidas foram realizadas em triplicatas a 25°C. Assim, as dispersões coloidais MGH, MGH-LL, MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR, MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA foram diluídas para $[Fe] = 5,88$ mmol/L em água, NaCl 0,45% e meio DMEM. A estabilidade coloidal das amostras MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA também foi avaliada durante a cinética de liberação de SR. Dessa forma, antes que as alíquotas retiradas nos intervalos programados fossem digeridas para determinação do teor de ródio no meio, foram analisadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico.

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Difração de Raios X

A difração de Raios X (XRD) foi empregada com objetivo de calcular o parâmetro de rede da célula unitária e o tamanho médio das NP sintetizadas pelo método de coprecipitação, bem como realizar sua caracterização quanto ao tipo de fase cristalina. Os difratogramas registram a intensidade da radiação difratada em função dos ângulos de Bragg (CULLITY, 1978).

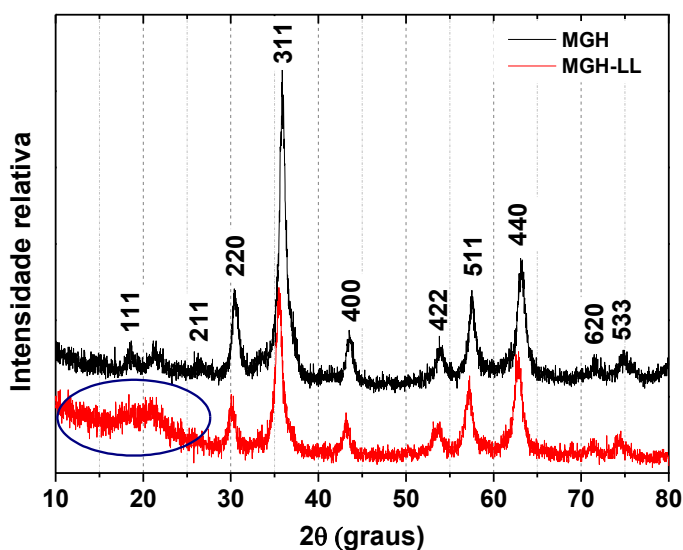
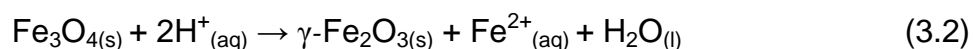
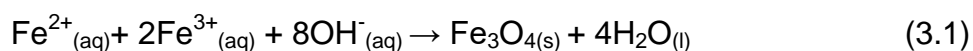


Figura 3.1. Difratogramas para nanopartículas de MGH (linha preta) e MGH-LL (linha vermelha). Os índices de Miller são indicados para cada pico de difração os quais foram atribuídos comparando-se com os picos observados na carta catalográfica para $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (JCPDF nº 39-1346). A região amorfa demarcada por um círculo indica a presença do ácido láurico.

Na figura 3.1 são apresentados os difratogramas para as NP de MGH e MGH-LL. Os picos de difração observados nos difratogramas foram analisados comparando com os dados registrados na carta catalográfica para Fe_2O_3 , nº 39-1346, no software do equipamento. Foram identificados os índices de Miller respectivos a cada ângulo de difração: (111), (211), (220), (311), (400), (422), (511), (440), (620) e (533). Os dados são consistentes com uma estrutura cúbica do tipo espinélio invertido que é bem característica para este tipo de óxido de ferro.

Os óxidos de ferro MGH ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e MGT (Fe_3O_4) possuem uma estrutura cristalina cúbica do tipo espinélio invertido, e por isso seus difratogramas são muito semelhantes. A diferença reside na posição dos picos de difração o quais aparecem

ligeiramente deslocados para valores de 2θ maiores para a MGT. As células unitárias de ambos contêm oito unidades de fórmulas moleculares, mas diferem quanto à presença de íons Fe^{2+} e vacâncias na estrutura cristalina. A MGT, obtida em proporções estequiométricas (equação 3.1), possui os cátions Fe^{+2} e Fe^{+3} distribuídos em sítios tetraédricos (Td) e octaédricos (Oh). Mas, após a oxidação (equação 3.2) predominam apenas os cátions trivalentes e vacâncias oriundas da migração dos íons Fe^{+2} , mantendo o balanço de carga na estrutura cristalina. Assim, cada célula unitária de MGH possui 32 ânions O^{2-} , $2\frac{1}{3}$ sítios vacantes e $21\frac{1}{3}$ cátions Fe^{3+} dos quais oito ocupam sítios Td e os demais estão distribuídos nos sítios Oh. Deste modo MGT e MGH são representadas pelas fórmulas moleculares $([\text{Fe}_8^{3+}]_{\text{Td}}[\text{Fe}_8^{3+}\text{Fe}_8^{2+}]_{\text{Oh}}\text{O}_{32})$ e $([\text{Fe}_8^{3+}]_{\text{Td}}[\text{Fe}_{13,3}^{3+}\square_{2,67}]_{\text{Oh}}\text{O}_{32})$, respectivamente, sendo que “ \square ” representa as vacâncias. (CORNELL; SCHWETMANN, 2003; LAURENT, *et al.* 2008).



O difratograma para as NP após o recobrimento da superfície com LA também mostra o mesmo padrão de difração. As diferenças notadas foram: o deslocamento dos picos de difração para ângulos 2θ ligeiramente menores, diminuição da intensidade relativa, alargamentos dos picos e a ausência dos picos relativos aos índices de Miller (111) e (211) situados em ângulos baixos (delimitados por um círculo na figura 3.1). Isto é indício da presença do LA na superfície das NP (LAN, *et al.* 2007). Comparando-se os dois difratogramas é possível constatar que a estrutura cristalina da MGH não foi alterada após revestimento com bicamada de LA.

O diâmetro médio das NP foi obtido por meio da equação de Sherrer (equação 3.3), em que D_{XRD} é o diâmetro médio das NP; 0,9 é a constante de Debye-Sherrer; λ é o comprimento de onda da radiação incidente (1,54056 Å) e θ é o ângulo de Bragg referente ao pico mais intenso (35,88° para MGH e 35,48° para MGH-LL). O β (equação 3.4) refere-se a diferença entre a largura a meia altura (FWHM) para o pico mais intenso entre as amostras e um padrão de silício. Por meio

da equação 3.5 é feita a conversão do FWHM de graus para radianos (CULLITY, 1978).

$$D_{XRD} = \frac{0,9\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (3.3)$$

$$\beta^2 = \beta_{amostra}^2 - \beta_{padrão}^2 \quad (3.4)$$

$$\beta = \frac{FWHM \pi}{180} \quad (3.5)$$

O D_{XRD} para as NP calculado foi de 10,21 e 9,50 nm para as NP de MGH e MGH-LL, respectivamente. Houve uma ligeira diminuição no tamanho médio calculado para MGH-LL. Apesar da pequena diferença dos domínios cristalinos tal diminuição é o motivo que explica a ausência dos índices de Miller citados abaixo de 27° no difratograma para MGH-LL. Geralmente se observa que o recobrimento da superfície de óxidos de ferro nanométricos faz reduzir o tamanho médio das NP o que se reflete na redução da cristalinidade e alargamento dos picos no difratograma (PETCHAROEN; SIRIVAT, 2012; MAITY; AGRAWAL, 2007; RAMIMOGHADAM; BAGHERI; HAMID, 2015).

Os parâmetros de rede foram obtidos utilizando o software UnitCell (HOLLAND; REDFERN, 1997) o qual realiza um refinamento dos mínimos quadrados para obter os parâmetros da célula unitária através dos ângulos de difração obtidos e seus respectivos índices de Miller. Os valores para estes parâmetros foram de 8,323 Å e 8,320 Å para as NP de MGH e MGH-LL, respectivamente, ao passo que na literatura são encontrados 8,347 Å e 8,396 Å para MGH e MGT, respectivamente (CORNELL; SCHWETMANN, 2003). A proximidade dos parâmetros de rede calculados com aquele encontrado para MGH na literatura mostra a predominância desta fase cristalina nas amostras ao invés de MGT.

Além disto, a análise química do teor de ferro feito nas dispersões coloidais MGH e MGH-LL indica uma concentração de Fe^{3+} maior do que Fe^{2+} mostrando que a fase $\gamma-Fe_2O_3$ é predominante nestas amostras. A proporção de Fe^{3+}/Fe^{2+} encontrada para MGH foi igual a 20, enquanto para MGH-LL foi de 40. Este aumento na proporção de Fe^{3+}/Fe^{2+} para MGH-LL mostra que mesmo após a etapa de aborbulhamento com oxigênio, o processo de oxidação possivelmente continuou

ocorrendo espontaneamente devido ao contato com o oxigênio do ar, o qual ocorreu no intervalo que precede o recobrimento das NP com LA aumentando ainda mais o teor de cátions Fe^{3+} em MGH-LL (KANG, *et al.* 1996).

3.2 Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução

A caracterização das amostras quanto a forma e ao diâmetro médio das NP foi realizada por meio de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM). Como as dispersões coloidais são muito parecidas foram escolhidas apenas MGH-LL, MGH-LL/BR, MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA para serem analisados por HRTEM. A figura 3.2 mostra os planos cristalinos para MGH-LL/SR o que corrobora com os resultados obtidos por XRD. As micrografias obtidas, em escalas de 100 nm e 0,5 μm , para as amostras MGH-LL, MGH-LL/BR e MGH-LL/SR são apresentadas na figura 3.3. Nas imagens pôde ser visto que as NP apresentaram contornos irregulares com formato aproximadamente esférico e mostraram-se agregadas devido à elevada área superficial (HONG, *et al.* 2006).

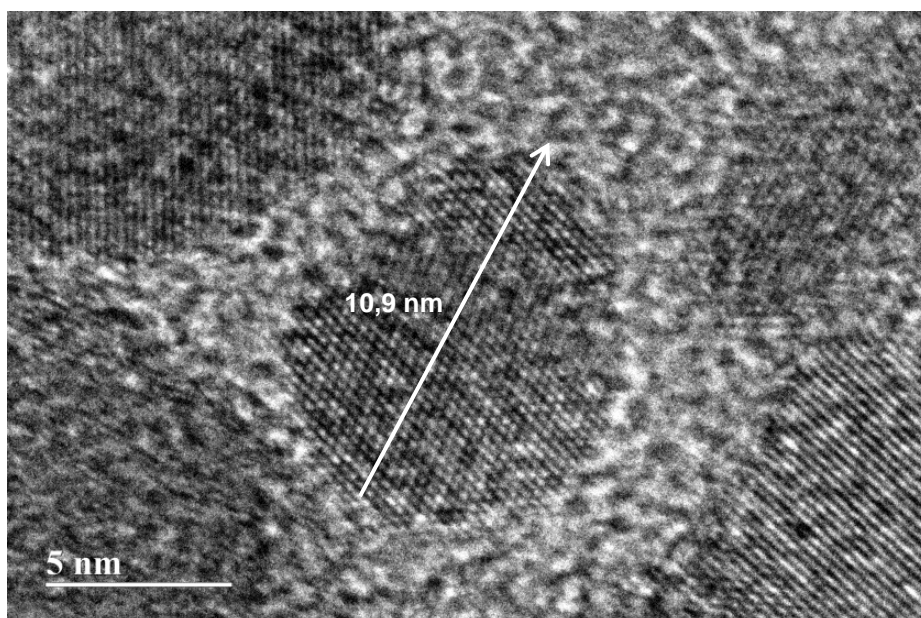


Figura 3.2. Micrografia obtida por HRTEM mostrando os planos cristalinos de uma nanopartícula MGH-LL/SR.

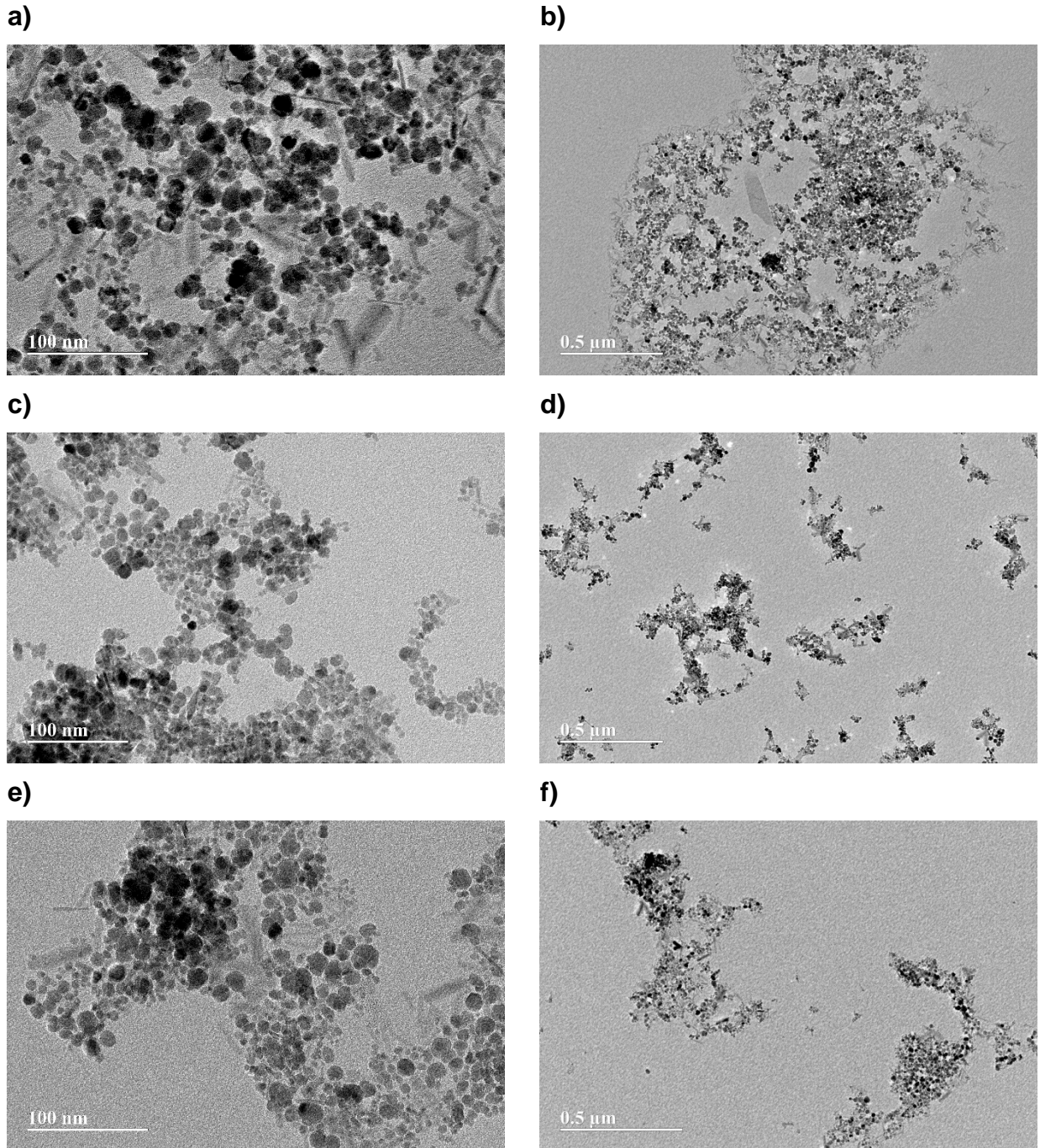


Figura 3.3. Micrografias obtidas por HRTEM para nanopartículas de MGH-LL a) e b); MGH-LL/BR, c) e d); e MGH-LL/SR, e) e f).

A micrografia para MGH-LL/SR/BSA (figura 3.4) apresentou NP com formatos arredondados, porém com maior aglomeração e contornos mais irregulares que as outras amostras. Uma ampliação na figura 3.4 mostra claramente NP englobadas em estruturas as quais não apareceram nas outras micrografias, conforme indicado por setas. Esta estrutura é, provavelmente, devido a funcionalização com BSA. Este recobrimento proteico forma uma “rede” capaz de envolver desde poucas até

mesmo várias NP. Apesar disto não foram observadas muitas estruturas com este mesmo aspecto nas micrografias, ou seja, um recobrimento com BSA de forma mais homogênea (TRAN; VO; TRAN, 2015) o que talvez permitisse estimar a espessura do revestimento orgânico (CUI, *et al.* 2014). De qualquer forma o mesmo perfil de recobrimento proteico para um sistema muito semelhante a MGH-LL/SR/BSA foi mostrado por Zaloga e colaboradores (2016).

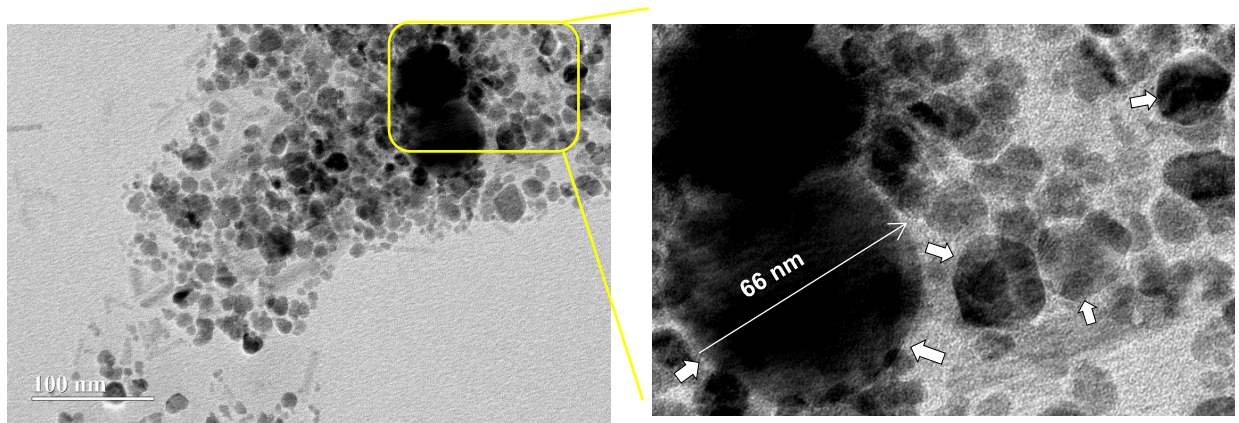


Figura 3.4. Micrografias obtidas por HRTEM para MGH-LL/SR/BSA. As setas na ampliação da figura á direita mostram o BSA formando uma estrutura que engloba as nanopartículas.

Os valores para o diâmetro médio e índice de polidispersão das NP foram obtidos mediante o ajuste dos dados a uma função log-normal (GRANQVISTT; BUHRMAN, 1976) conforme equação 3.6.

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma D}} \exp\left(-\frac{[\ln(D)-(D_0)]^2}{2\sigma^2}\right) \quad (3.6)$$

em que D_0 é o diâmetro médio das NP e σ é o índice de polidispersão. Os valores de D_0 e σ encontrados estão listados na tabela 3.1. Os dados se ajustaram bem à função o que é demonstrado pelos valores do coeficiente de regressão linear (R^2) na figura 5.

O valor de D_0 para MGH-LL (9,2 nm) está próximo daqueles obtidos por XRD: 9,50 nm para MGH-LL e 10,21 nm para MGH; o que significa que o processo de recobrimento da MGH com LA não alterou o D_0 das NP embora isso seja possível (BICA, *et al.* 2007). Os valores de D_0 para as amostras de MGH-LL, MGH-LL/BR e

MGH-LL/SR também ficaram bastante próximos do D_{XRD} para MGH e MGH-LL, o que já era esperado. Entretanto o D_0 para MGH-LL/SR/BSA foi um pouco maior do que os demais provavelmente devido ao recobrimento com BSA.

Tabela 3.1. Valores de diâmetro médio (D_0) e índice de polidispersão (σ) obtidos pelo ajuste dos dados de contagem de nanopartículas a uma função log-normal; concentração de ferro ([Fe]) das dispersões coloidais, massa (m_{NP}) e volume (V_{NP}) das nanopartículas; concentração (C_{NP}) e área superficial (A_{NP}) de nanopartículas por volume para MGH-LL, MGH-LL/BR, MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA. Todos os valores foram estimados a partir do D_0 calculado.

Amostra	D_0 /nm	σ	a [Fe] / 10^{-3} / mol L $^{-1}$	b m_{NP} / 10^{-18} g	c V_{NP} / 10^{-19} cm 3	C_{NP} / 10^{15} NP mL $^{-1}$	c A_{NP} / m 2 mL $^{-1}$
MGH-LL	9,2 ± 3,0	0,381	41,6	1,96	4,01	1,7	0,45
MGH-LL/BR	9,40 ± 2,9	0,366	27,6	2,13	4,35	1,03	0,29
MGH-LL/SR	9,7 ± 3,8	0,454	45,6	2,30	4,71	1,6	0,47
MGH-LL/SR/BSA	10,6 ± 3,5	0,352	36,2	3,10	6,31	0,9	0,32

^a nos cálculos foi considerado 2 mol de Fe equivalente a 1 mol de Fe₂O₃.

^b no cálculo da massa das nanopartículas foi considerado a densidade de 4,9 g/cm³ para o óxido de ferro.

^c no cálculo do volume e da área superficial foi considerado um formato aproximadamente esférico para as nanopartículas.

Os histogramas (figura 3.5) que mostram a frequência de contagem em função dos diâmetros das NP foram construídos a partir da contagem manual das mesmas: 152, 118, 151 e 87 NP para as amostras MGH-LL, MGH-LL/BR, MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA, respectivamente. As distribuições de tamanho nos histogramas são parecidas e possuem um alto σ o qual variou de 0,352 a 0,454 com diâmetros numa faixa de 3 – 27 nm. Isto já era previsto em decorrência da metodologia empregada na síntese em que o controle de distribuição de tamanho das NP é limitado (LAURENT, *et al.* 2008). Mesmo assim os histogramas mostraram uma população dominante na região de 7 – 13 nm para as quatro dispersões

coloidais: 83% para MGH-LL, 82% para MGH-LL/BR, 72% para MGH-LL/SR e 79% para MGH-LL/SR/BSA.

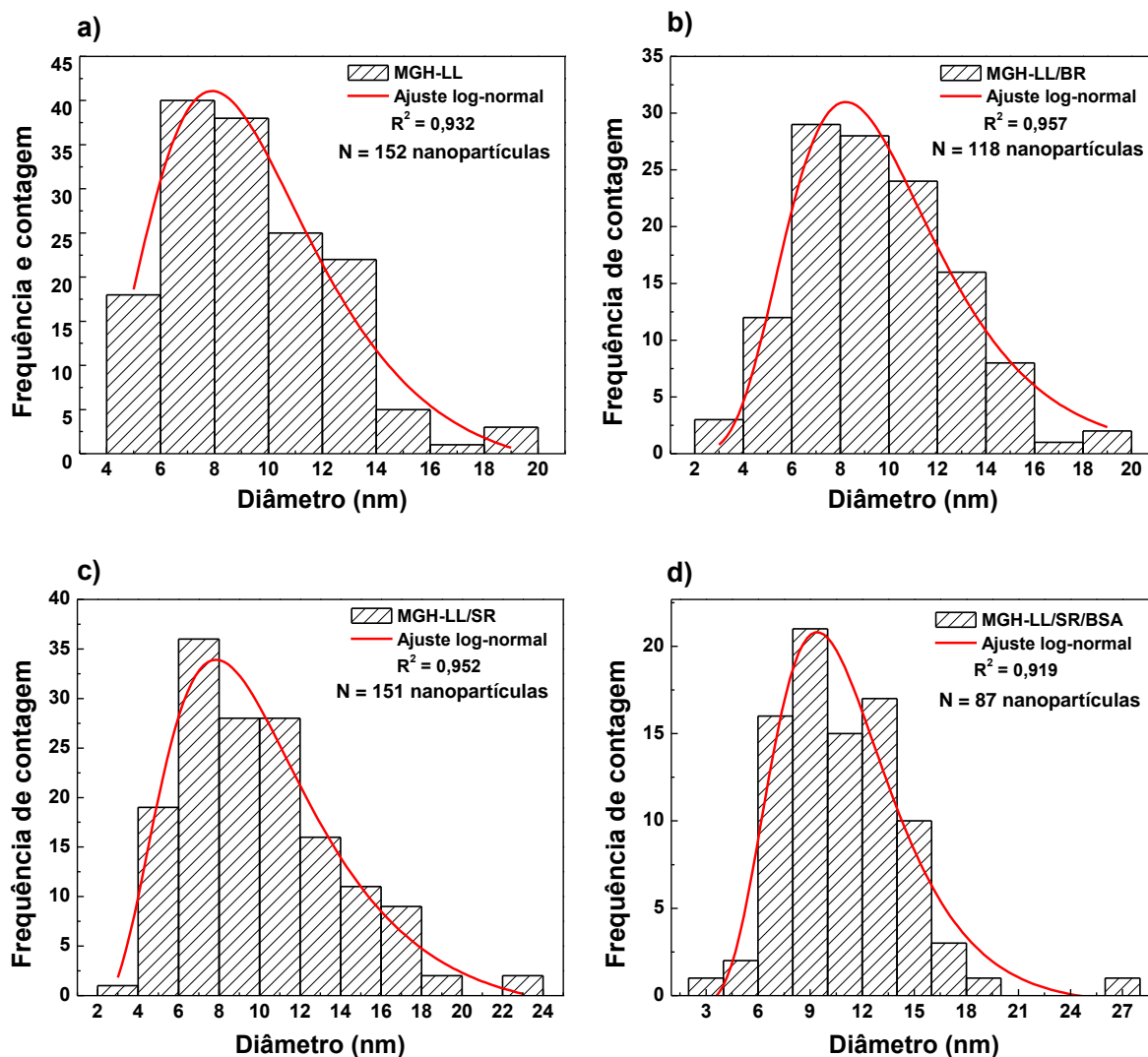


Figura 3.5. Histogramas resultantes da contagem de nanopartículas e ajuste a uma função log-normal para a) MGH-LL, b) MGH-LL/BR, c) MGH-LL/SR e d) MGH-LL/SR/BSA, obtidos pela contagem manual de 152, 118, 151 e 87 nanopartículas, respectivamente.

Considerando as NP vistas nas imagens por HRTEM como tendo um formato aproximadamente esférico foram estimados o volume médio (V_{NP}) e a área média superficial (A_{NP}) a partir dos valores de D_0 calculados. A massa média (m_{NP}) para uma NP foi estimada a partir de V_{NP} e da densidade da MGH que é igual a $4,87 \text{ g cm}^{-3}$ (CORNELL; SCHWETMANN, 2003). A partir dos valores de m_{NP} calculados e sabendo-se as concentrações de ferro determinadas para cada dispersão coloidal

(ANEXO A) foram estimadas as concentrações de NP por mL (C_{NP})⁷. Os valores de V_{NP} , A_{NP} , m_{NP} e C_{NP} estão na tabela 3.1.

No tocante a visualização da dupla camada de LA nas micrografias o obstáculo reside na penetração do feixe de elétrons pela espessa camada orgânica. Apesar de Li e colaboradores (2010) terem relatado que conseguiram mensurar a espessura de ácido oleico revestindo NP de MGT através das micrografias por HRTEM, o mesmo não foi possível para a bicamada de LA neste trabalho. Fu, Dravid e Johnson (2001) também relataram não ser possível tal determinação. Todavia, o recobrimento pode ser identificado pelas técnicas de termogravimetria e espectroscopia na região do infravermelho; e mais indiretamente pelas curvas de adsorção nas quais se constatou interação da bicamada de LA com os complexos de ródio(II), o que seria impossível sem um recobrimento apropriado que os acomodasse. Todas essas técnicas serão abordadas mais detalhadamente nas seções seguintes.

3.3 Magnetometria de amostra vibrante

As amostras de MGH foram caracterizadas por meio de magnetometria de amostra vibrante (VSM) antes e após recobrimento da superfície com objetivo de avaliar o comportamento magnético e verificar se havia alguma alteração desta propriedade após adsorção dos complexos de ródio(II) e BSA.

As curvas de magnetização para as amostras realizadas à temperatura ambiente estão na figura 3.6. A magnetização de saturação (M_S) foi obtida pela construção de um gráfico da magnetização em função do inverso do campo magnético aplicado ($1/H$) em que M_S é o coeficiente linear. Os valores de M_S encontrados estão na tabela 3.2. A M_S para MGH, 47,7 emu/g, foi bem menor do que para o material “em volume”, que se situa na faixa de 80 – 100 emu/g, o que já era esperado, já que se encontra numa escala nanométrica assumindo assim comportamento superparamagnético (CORNELL; SCHWETMANN, 2003;

⁷ A massa molar de γ -Fe₂O₃ (159,6882 g mol⁻¹) foi utilizada neste cálculo.

KALIDASAN, *et al.* 2015) o que também está de acordo com os resultados obtidos por meio de XRD e HRTEM.

As curvas de magnetização para as amostras recobertas com LA e funcionalizadas com os complexos de ródio(II) e BSA não apresentaram ciclos de histereses e mostraram que as NP permaneceram superparamagnéticas não havendo alteração considerável desta propriedade. As curvas de magnetização também não exibiram campos coercitivos nem magnetização remanentes apreciáveis. Quanto ao perfil as curvas são similares sendo que apenas MGH-LL e MGH-LL/SR/BSA apresentaram nítida diminuição da M_S quando comparado à M_S de MGH. Pode-se perceber que somente as curvas para MGH-LL, MGH-LL/AR, MGH-LL/PR e MGH-LL/BR se sobrepõem apresentando valores de M_S muito próximos; a curva de magnetização para MGH-LL/SR foi levemente diferente das demais, e MGH-LL/SR/BSA foi a que mais se destacou dos sistemas funcionalizados já que visivelmente apresentou a menor M_S . Na figura 3.6b podem-se ver mais claramente essas diferenças encontradas para todas as amostras.

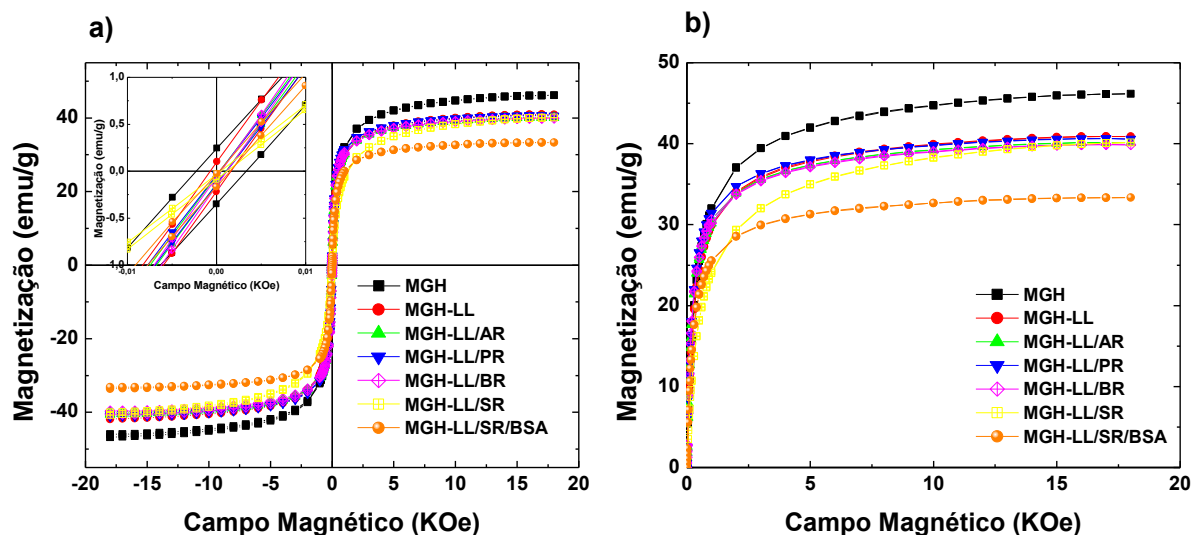


Figura 3.6. Curvas de magnetização a temperatura ambiente obtidas por VSM para amostras de MGH, MGH-LL, MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/SR, MGH-LL/BR e MGH-LL/SR/BSA. Na figura a) são representados a magnetização para uma variação de campo magnético de -18000 a 18000 Oe, com ampliação no canto superior esquerdo em que o campo magnético situa-se na faixa de -0,01 a 0,01 Oe; e b) ampliação do primeiro quadrante, de 0 a 18000 Oe.

Os valores de M_S para MGH e MGH-LL encontrados foram de 47,7 e 42,0 emu/g, respectivamente. O revestimento de LA faz diminuir a M_S já que a magnetização é diretamente proporcional a quantidade de amostra para o mesmo material magnético. A presença de duas camadas de adsorção do surfactante adsorvidas à superfície das NP aumenta notadamente a quantidade de material diamagnético (a porcentagem de recobrimento com LA será discutido na seção 3.6) conforme observado (FU; DRAVID; JOHNSON, 2001; MAITY; AGRAWAL, 2007).

Tabela 3.2. Valores de magnetização de saturação (M_S) obtidos para as amostras MGH, MGH-LL, MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR, MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA.

Amostra	M_S / (emu/g)
MGH	47,7
MGH-LL	42,0
MGH-LL/AR	41,1
MGH-LL/PR	41,5
MGH-LL/BR	40,6
MGH-LL/SR	42,4
MGH-LL/SR/BSA	34,0

Os valores da M_S para MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR e MGH-LL/SR variaram em uma faixa estreita, de 40,6 a 42,4 emu/g. Isso mostra que o efeito dos complexos de ródio(II) na magnetização das NP é totalmente insignificante porque carboxilatos de ródio(II) possuem natureza diamagnética devido a ligação metal-metal (BOYAR; ROBINSON, 1983; CARNEIRO, *et al.* 2011).

Contudo, esperava-se uma redução da M_S , ainda que fosse muito pequena, pelo mesmo motivo já explicado acerca do recobrimento com LA, tendo em vista que o estudo de adsorção realizado, o qual será descrito na próxima seção, mostra indubitavelmente uma adsorção crescente. Ainda que MGH-LL/AR e MGH-LL/PR apresentem ínfima concentração dos complexos de ródio(II) adsorvidos, o que poderia explicar a semelhança entre estas curvas com a curva de MGH-LL, o mesmo, entretanto, não se pode dizer de MGH-LL/SR e MGH-LL/BR em que uma concentração bem maior dos complexos de ródio(II) foi observada, e, mesmo assim, as curvas de magnetização para os quatro sistemas estudados foram muito parecidas não sendo observada nenhuma tendência que relacionasse a M_S com o

teor adsorvido. Muito possivelmente as quantidades de complexos de ródio(II) nas amostras analisadas foram de tal maneira pequenas que não foi suficiente para reduzir a M_S à valores detectáveis, mesmo para aquelas que apresentaram elevados teores adsorvidos, como BR e SR.

Todavia, se compararmos as curvas de MGH, MGH-LL e MGH-LL/SR/BSA há uma tendência na redução da M_S com o aumento do recobrimento da superfície das NP o que condiz com sistemas parecidos encontrados na literatura em que se avalia a magnetização durante as etapas de recobrimento (YEE, *et al.* 1999; LIU, *et al.* 2004; LI, *et al.* 2012). A funcionalização do sistema MGH-LL/SR com BSA foi uma etapa muito bem sucedida, com taxas de adsorção superiores a 90% (ANEXO B) o que pode explicar uma diminuição tão expressiva de sua M_S que o distingue dos demais sistemas (ZALOGA, *et al.* 2014).

Uma vez que uma única metodologia foi empregada na síntese da dispersão coloidal MGH, o diâmetro médio das NP (demonstrado pelos valores de D_{XRD} e D_0 calculados) deve ser preservado nas etapas subsequentes – revestimento com LA e funcionalização com os complexos de ródio(II) e BSA – sem grandes alterações. Dessa forma, a redução da M_S deve ser atribuída unicamente à presença de LA e BSA (LIU, *et al.* 2004).

3.4 Estudo de adsorção

O estudo de adsorção foi realizado utilizando os complexos AR, PR, BR e SR (adsorvatos) e MGH revestidas com bicamada de LA (adsorvente). O experimento realizado mostrou que houve adsorção para todos os complexos de ródio(II). As diferenças entre os sistemas estão nos perfis de cada curva obtida e na quantidade dos complexos de ródio(II) adsorvidos, determinados por AAS (ANEXO A). A figura 3.7 contém as isotermas de adsorção obtidas para os sistemas trabalhados.

O cálculo do teor adsorvido em cada R_{adc} mostrou que não houve uma dependência expressiva das taxas de adsorção com a concentração do adsorvato no sistema, ou seja, tanto em baixas concentrações quanto em concentrações mais elevadas dos complexos de ródio(II) adicionados, não houve aumento brusco das taxas de adsorção. Isto pode ser claramente constatado pela figura 3.8 que mostra os teores adsorvidos em função de cada R_{adc} para os quatro sistemas. Analisando

as isotermas juntamente com os dados da figura 3.8 percebe-se que a adsorção foi crescente, mas sempre na mesma proporção a qual foi bem distinta para cada sistema. Os teores adsorvidos seguiram a ordem: MGH-LL/SR > MGH-LL/BR > MGH-LL/PR ~ MGH-LL/AR.

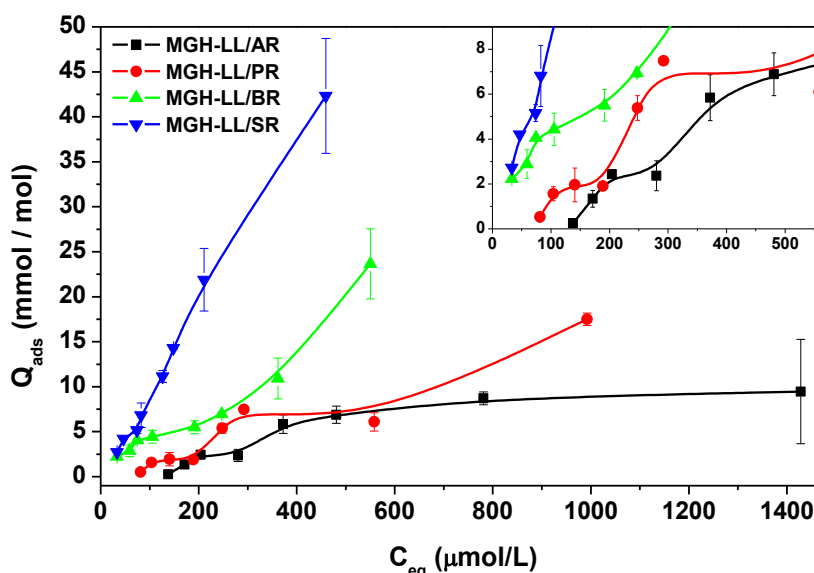


Figura 3.7. Isotermas de adsorção para os complexos de ródio(II) adsorvidos em MGH-LL expressa em mmol dos complexos por mol do óxido de ferro (Q_{ads}) em função da concentração de equilíbrio (C_{eq}) em $\mu\text{mol/L}$: MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR e MGH-LL/SR. No canto superior direito é mostrado uma ampliação das isotermas na região de baixa concentração dos adsorvatos.

Visto que os teores médios adsorvidos em cada R_{adc} , para cada complexo, não variaram muito em toda a faixa trabalhada, $R_{ads} = 4 - 60 \text{ mmol}_{\text{complexo}} / \text{mol}_{\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3}$, calculou-se a média e os resultados são mostrados na tabela 3.3. Os sistemas MGH-LL/PR e MGH-LL/AR apresentaram os menores teores de adsorção sendo que MGH-LL/PR foi levemente melhor do que MGH-LL/AR, enquanto MGH-LL/BR e MGH-LL/SR apresentaram as maiores taxas de adsorção tendo MGH-LL/SR com os melhores índices de todos os sistemas.

Tendo em vista a adsorção crescente observada, indo do MGH-LL/AR ao MGH-LL/SR, pode se afirmar que o tipo de cadeia carbônica seja o fator determinante para a adsorção na bicamada de LA. Nos sistemas estudados a fisissorção é sugerida ao invés da quimissorção. Isso pode ser confirmado tanto pelo crescente caráter hidrofóbico dos complexos de ródio(II) quanto pelo perfil das

isotermas nas quais houve um aumento da inclinação. Na fisissorção ocorre interação entre o adsorvato e a superfície do adsorvente denominada de forças de van de Waals (CASTELLAN, 1999).

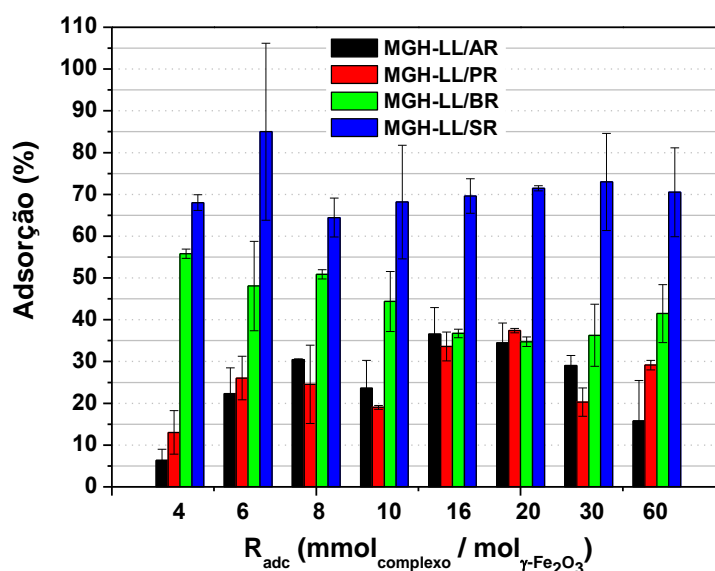


Figura 3.8. Taxas de adsorção (%) em função da quantidade dos adsorvatos adicionados (R_{adc}), expressa em mmol de complexo de ródio(II) por mol do óxido de ferro, obtidas para MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR e MGH-LL/SR.

Tabela 3.3. Média das taxas de adsorção para todos os valores de complexos de ródio(II) adicionados, e parâmetros obtidos após ajuste dos dados das isotermas aos modelos de Langmuir e Freundlich, para os sistemas MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR e MGH-LL/SR.

Amostra	Adsorção /% $\sum \pm \sigma$	Langmuir	Freundlich		
		$^a R^2$	$^a R^2$	$^b K$	$^c n$
MGH-LL/AR	$24,8 \pm 10$	- 0,105	0,685	$1,35 \cdot 10^{-3}$	0,76
MGH-LL/PR	$25,4 \pm 8,0$	- 0,052	0,845	$4,12 \cdot 10^{-3}$	0,82
MGH-LL/BR	$43,5 \pm 7,6$	0,039	0,907	0,131	1,31
MGH-LL/SR	$71,3 \pm 6,1$	- 0,091	0,972	0,073	0,96

^a R^2 : coeficiente de regressão linear.

^b K : medida da capacidade do adsorvente.

^c n : intensidade de adsorção.

Nos sistemas estudados ocorre interação de van der Waals entre as cadeias carbônicas de AR, PR, BR e SR e as cadeias carbônicas de LA que formam a bicamada. O aumento do tamanho da cadeia carbônica nos complexos de ródio(II), ou seja, um aumento da hidrofobicidade, indo do AR para o BR, pode estar relacionado com esse crescente aumento na adsorção, conforme ilustrado na figura 3.9a. Quanto maior a cadeia carbônica no complexo de ródio(II) mais interações de van der Waals são realizadas proporcionando melhor “ancoragem” do complexo no sítio da bicamada. Assim, como BR possui a maior cadeia carbônica deve certamente realizar mais interações de van der Waals do que PR e AR (ADAMSON; GAST, 1997).

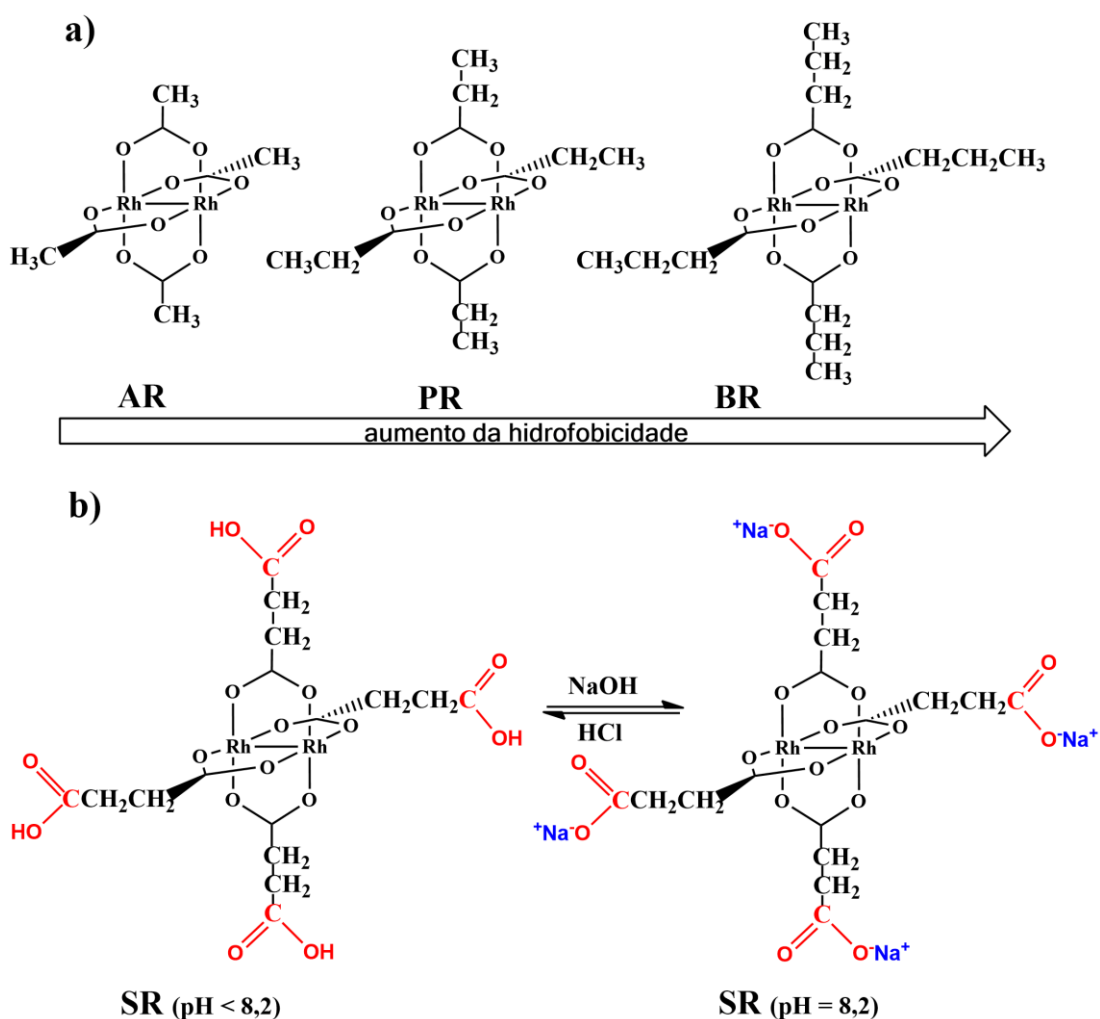


Figura 3.9. a) Representações para AR, PR e BR, destacando o aumento do caráter hidrofóbico dos complexos de ródio(II) devido o aumento da cadeia carbônica, e b) para SR destacando os quatro grupos carboxílicos na forma ácida, e após ser neutralizado com solução NaOH.

A relação que se estabelece entre o caráter hidrofóbico dos complexos de ródio(II) com a porcentagem da adsorção explica bem a tendência observada para os sistemas MGH-LL/AR, MGH-LL/PR e MGH-LL/BR, mas não explica as diferenças encontradas para MGH-LL/SR quando comparado com os demais haja vista que SR é mais hidrossolúvel que os outros complexos de ródio(II). Apesar de BR e SR serem semelhantes quanto a estrutura química, a presença de grupos carboxilatos (COO^-) livres na extremidade das cadeias carbônicas no SR deve ser o fator responsável pelo aumento brusco na taxa de adsorção (figura 3.9b).

Na tentativa de explicar este fato foram consideradas três hipóteses: 1) quimissorção, 2) ligação de hidrogênio e 3) reação de substituição do surfactante por SR na segunda camada. Na primeira hipótese supõe que além das interações de van der Waals entre as cadeias carbônicas de SR e LA no sítio da bicamada, poderia também ocorrer quimissorção entre a superfície das NP e SR através de seus grupos COO^- desprotonados. Posto isto, haveria duas possibilidades de interação. Na primeira possibilidade, a presença do SR poderia desfazer agregados de NP revestidas com a bicamada de LA deixando dessa forma regiões disponíveis (que até então estavam impedidas por causa da cobertura orgânica) para interação direta de SR com a superfície de MGH. Isso é razoável considerando que houvesse lacunas, ou seja, regiões em MGH-LL não recobertas pelo LA, talvez devido a geometria irregular dessas NP aglomeradas (figura 3.10a). Quanto a segunda possibilidade, poderia ocorrer uma reação de substituição de SR com as moléculas de laurato apenas na região formada pela monocamada, considerando nesse caso uma substituição parcial de LA, sem comprometer o arranjo orgânico em sua totalidade, criando assim uma espécie de bicamada híbrida LA/SR. Nesse caso, haveria uma interação entre SR e a superfície das NP, e também com moléculas de LA vizinhas nesta região (figura 3.10b).

Entretanto não é possível obter uma dispersão coloidal entre MGH sem revestimento e a solução de SR, o que contradiz a hipótese. Tal fato foi verificado empiricamente. No momento em que a solução de SR é adicionado à dispersão coloidal MGH há imediata turvação do meio seguido de rápida aglomeração das NP. Ao contrário disto, durante o preparo das dispersões de MGH-LL com SR não ocorreu sedimentação em nenhuma amostra para todos os valores de R_{adc} . O

aspecto sempre crescente da isoterma também corrobora com o fato de que quimissorção é improvável que ocorra.

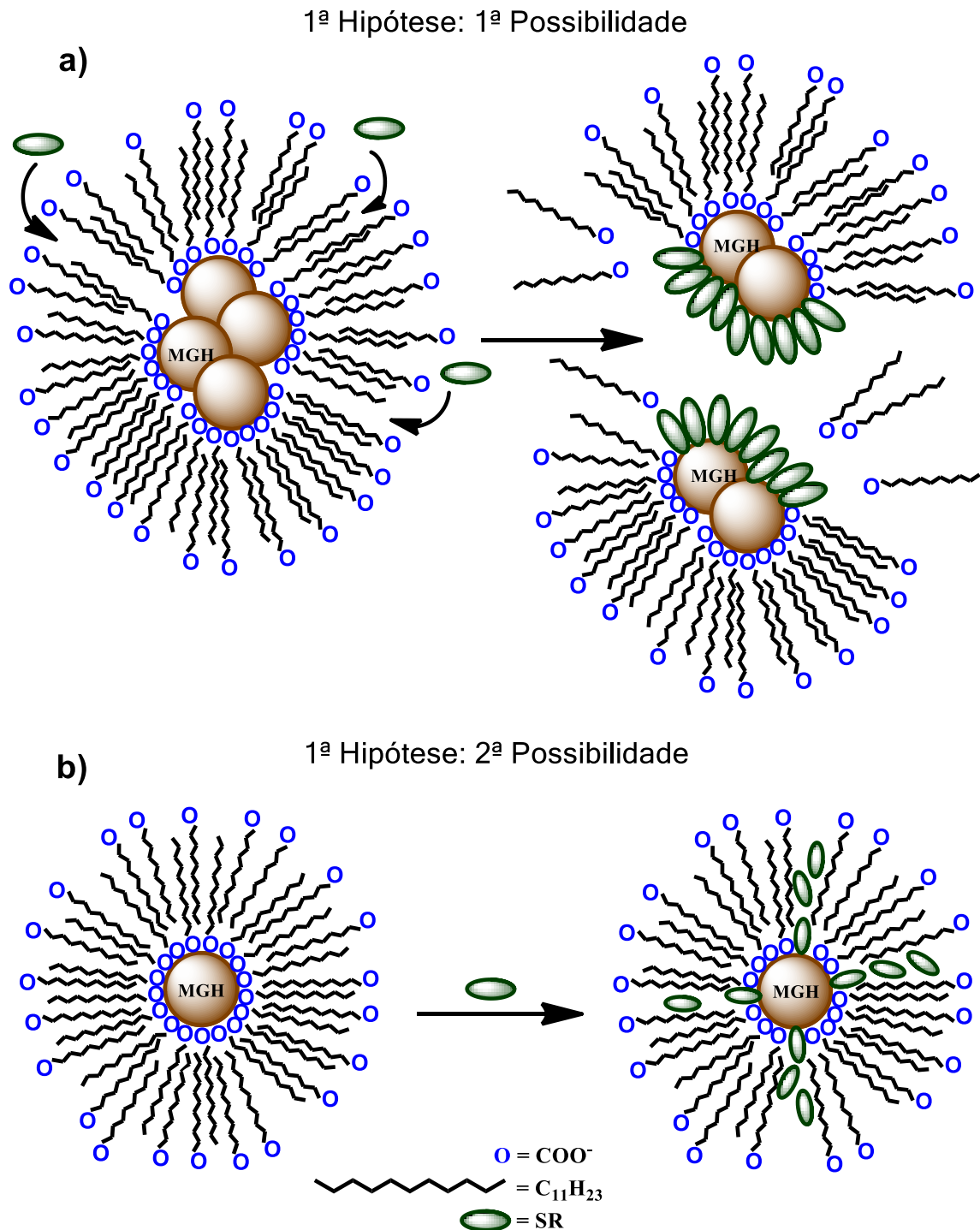


Figura 3.10. Representação da hipótese proposta para explicação das elevadas taxas de adsorção de SR em MGH-LL segundo a qual ocorre quimissorção entre o complexo de ródio(II) e a superfície de MGH. a) Na primeira possibilidade o SR desfaz agregados de NP revestidos com bicamada de LA, enquanto na segunda possibilidade b) ocorre substituição de LA por SR apenas na monocamada havendo formação de uma bicamada híbrida de LA/SR.

A segunda hipótese seria a existência de ligações de hidrogênio entre moléculas de SR, através de seus quatro grupos COOH, o que arrastaria mais moléculas para o sítio de adsorção havendo uma concentração maior de SR do que BR na região hidrofóbica da bicamada de LA (SILVA, 2012). Contudo, a solução de SR empregada foi neutralizada até o ponto de equivalência, isto é, as quatro carboxilas estavam desprotonadas o que desfavorece este tipo de interação (figura 3.9b).

A terceira hipótese seria uma substituição de algumas moléculas de LA que constituem a segunda camada por SR, ou seja, aquelas que estão fisissorvidas à monocamada (talvez esta substituição não seja de fato apreciável visto que os valores da M_s entre MGH-LL e MGH-LL/SR ficaram muito próximos). Nesse caso haveria interação de SR tanto com a monocamada quanto com a segunda camada, ou seja, haveria um gradiente de SR em toda extensão que compreende a bicamada de LA, ao contrário da primeira hipótese (figura 3.11). Assim, é provável que tanto esta reação de substituição quanto a fisissorção já prevista, entre as cadeias carbônicas de SR e LA, ocorram simultaneamente o que oferece uma explicação razoável para as elevadas taxas de adsorção do SR em MGH-LL.

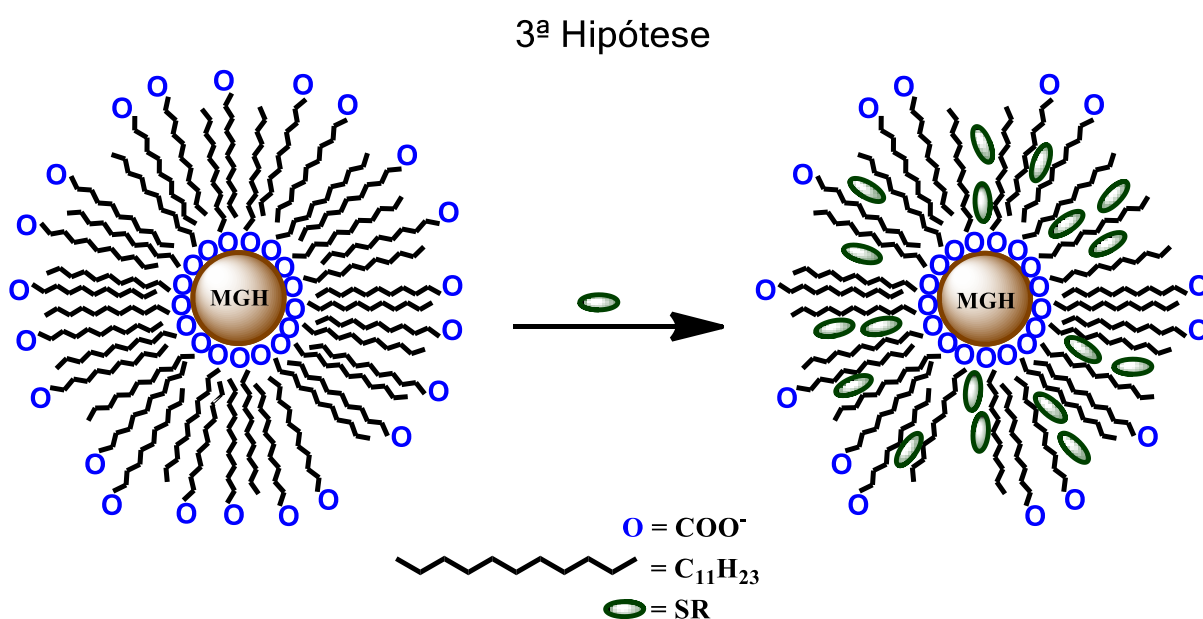


Figura 3.11. Representação da terceira hipótese segundo a qual haveria substituição de LA por SR apenas naquelas moléculas fisissorvidas à monocamada.

No que concerne ao aspecto das isotermas as curvas são convexas na região de baixa concentração dos adsorvatos, em $Q_{ads} = 0 - 9$, o que pode ser visto na ampliação da figura 3.7. Nesta região do gráfico percebe-se que as curvas parecem atingir um patamar de saturação passando por um ponto de inflexão o que é bem evidente para MGH-LL/PR e MGH-LL/AR nas quais dois patamares de saturação são bem visíveis. Este aspecto pode ser indício de formação de camadas de adsorção (MYERS, 1999; SHAW, 1992). Já as curvas de MGH-LL/BR e MGH-LL/SR não apresentaram um patamar de saturação bem definido, ao invés disto sofrem um leve desvio de sua linearidade, próximo de $Q_{ads} = 5$, e continuam crescendo. Já para regiões de concentração mais elevada dos adsorvatos, em $Q_{ads} > 9$, as isotermas de MGH-LL/BR e MGH-LL/SR mostraram inclinações acentuadas enquanto a isoterma de MGH-LL/AR atingiu um plateau; e a isoterma de MGH-LL/PR ainda mostrou adsorção para o último ponto, em $Q_{ads} = 17$. De modo geral, notou-se que quanto mais hidrofóbico era o complexo tanto mais acentuada foi a inclinação das isotermas.

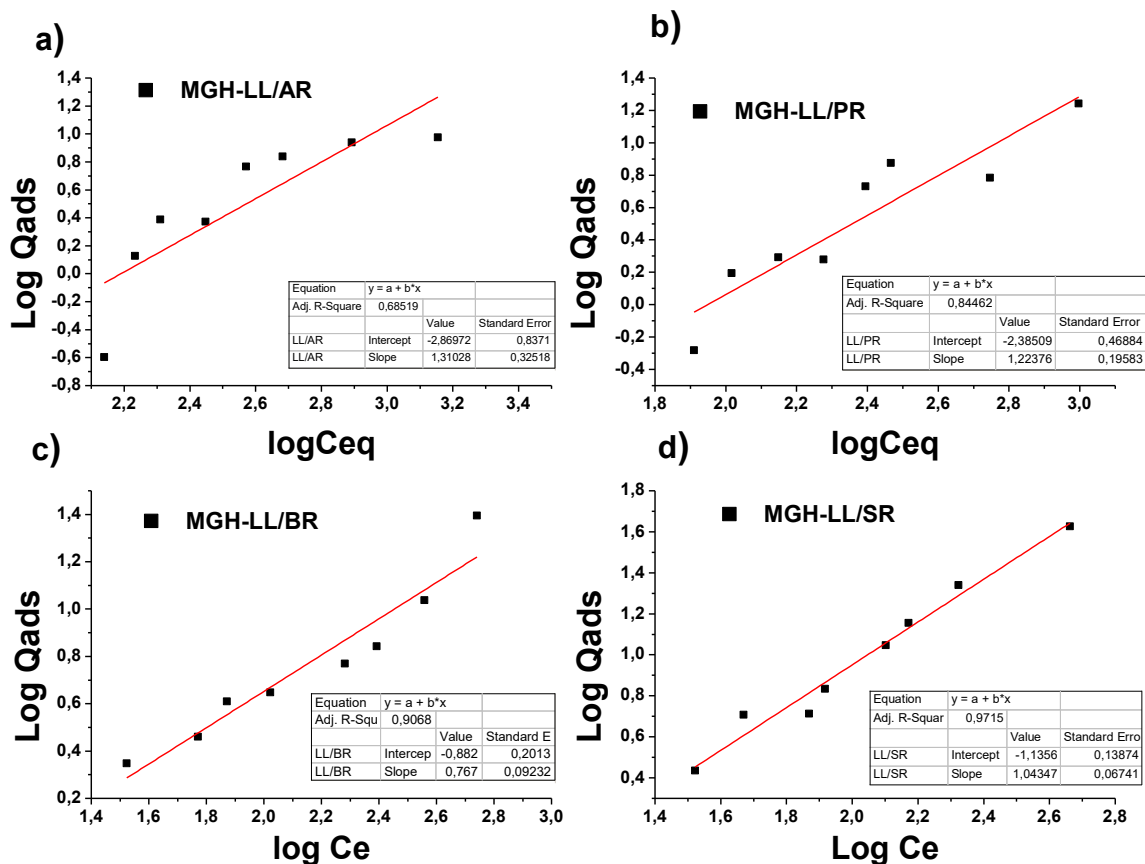


Figura 3.12. Isotermas linearizadas de Freundlich para adsorção dos complexos de ródio(II) em MGH-LL: a) MGH-LL/AR, b) MGH-LL/PR, c) MGH-LL/BR e d) MGH-LL/SR.

Os dados obtidos nas isotermas foram tratados utilizando o modelo de Freundlich, conforme equação 3.7, em razão da forma obtida das curvas. Nesta equação o coeficiente linear K refere-se à medida da capacidade do adsorvente e o coeficiente angular n refere-se a intensidade de adsorção (ADAMSON; GAST, 1997).

$$\log Q_{\text{ads}} = \log K + \frac{\log C_e}{n} \quad (3.7)$$

As isotermas linearizadas estão na figura 3.12 e os parâmetros obtidos, K e n , estão na tabela 3.3. Uma comparação dos coeficientes R^2 obtidos para o ajuste dos dados aos modelos de Langmuir e Freundlich, que são os dois modelos mais amplamente utilizados em se tratando de estudos de adsorção, fica evidente que os dados se ajustaram muito melhor ao segundo modelo o que confirma a fisissorção prevista nestes sistemas.

3.5 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), registrados como transmitância em função do número de onda, foram obtidos para MGH antes e depois de recobertas com o surfactante, e após funcionalizadas com os carboxilatos de ródio(II) e com BSA. As principais bandas relativas aos grupos funcionais que caracterizam o ácido graxo, os complexos de ródio(II) e a proteína foram identificadas e atribuídas. Foi feita uma análise comparativa dos espectros com a finalidade de se verificar a permanência e a posição dessas bandas após o recobrimento e funcionalização.

Na figura 3.13a são apresentados os espectros FTIR sobrepostos de MGH e MGH-LL. No espectro para MGH foi observada uma banda larga centrada em 3386 cm^{-1} e uma de intensidade média em 1626 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento do grupo OH e moléculas de água na superfície das NP, respectivamente. As bandas na região de baixa frequência referem-se a vibrações das ligações Fe-O na matriz cristalina (WALDRON, 1955). A banda em 586 cm^{-1} pode ser atribuída a deformação da ligação Fe-O em sítios octaédricos e tetraédricos; a banda em 445 cm^{-1} pode ser

atribuída a deformação da ligação Fe-O apenas em sítios octaédricos (BELIN, *et al.* 2002).

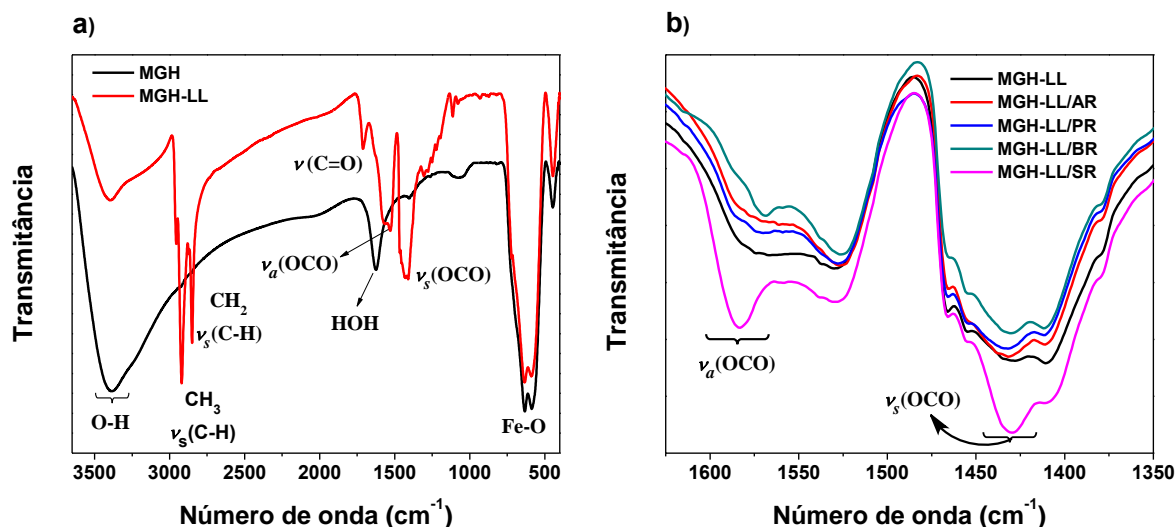


Figura 3.13. a) Sobreposição dos espectros de infravermelho obtidos para MGH e MGH-LL. Os grupos funcionais responsáveis pelas vibrações são identificados próximos as bandas. b) Sobreposição dos espectros de infravermelho normalizados para MGH-LL, MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR e MGH-LL/SR. É destacado no gráfico as regiões de estiramentos assimétrico, $\nu_a(\text{OCO})$, e simétrico, $\nu_s(\text{OCO})$.

No espectro para MGH-LL (figura 3.13a) todas as bandas provenientes da MGH aparecem exceto a banda em 1626 cm^{-1} já que a superfície das NP foi recoberta com o surfactante (KOROLEV; RAMAZANOVA; BLINOV, 2002). Foram observadas nesse espectro as bandas oriundas do estiramento C-H, de grupos CH_2 e CH_3 , bem como de ácidos carboxílicos. As bandas em 2920 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} podem ser atribuídas aos estiramentos simétricos, $\nu_s(\text{C-H})$, dos grupos CH_3 e CH_2 , respectivamente (LI, *et al.* 2010; ZHAO, *et al.* 2006). As bandas de média intensidade em 1410 cm^{-1} e 1529 cm^{-1} podem ser atribuídas aos estiramentos simétrico, $\nu_s(\text{OCO})$, e assimétrico, $\nu_a(\text{OCO})$, do grupo COO^- , respectivamente, devido à ligação química formada entre os grupos COO^- do LA e a superfície de MGH (WANG, *et al.* 2004). A banda em 1710 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento do grupo carboxila, $\nu(\text{C=O})$, que está presente na segunda camada do surfactante, conforme demonstrado por Yang e colaboradores (2010) após fazer uma análise comparativa de espectros de amostras de MGT recobertas com monocamada e bicamada de ácido oleico. A ausência de uma banda intensa em 1700 cm^{-1} , devido

ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$ do LA livre (ANEXO C), mostra a eficiência da diálise em retirar o surfactante em excesso.

Na figura 3.13b são apresentados os espectros normalizados para as amostras funcionalizadas de MGH-LL com os carboxilatos de ródio(II). Tanto os adsorvatos quanto o adsorvente possuem os mesmos grupos responsáveis pelos modos de vibração (CH_2 , CH_3 e COO^-). Apesar das bandas mais intensas que caracterizam os complexos de ródio(II) estarem situadas nas regiões de 1550 a 1595 cm^{-1} , e de 1415 a 1451 cm^{-1} , devido aos estiramentos assimétrico, $\nu_a(\text{OCO})$, e simétrico, $\nu_s(\text{OCO})$, respectivamente (BOYAR; ROBINSON, 1983), não foram vistas nessas regiões dos espectros bandas que caracterizam AR e PR (ANEXO D) para as amostras MGH-LL/AR e MGH-LL/PR, respectivamente. Os espectros para MGH-LL/AR e MGH-LL/PR são idênticos ao de MGH-LL. Provavelmente isso se deve ao fato de que AR e PR não apresentaram taxas expressivas de adsorção fazendo com que suas bandas ficassem sobrepostas às do LA. Entretanto, para MGH-LL/BR e MGH-LL/SR foram vistas as bandas oriundas do BR e SR em razão de apresentarem taxas de adsorção bem maiores do que AR e PR.

Para melhor visualização e comparação, os espectros de MGH-LL/BR (figura 3.14a) e MGH-LL/SR (figura 3.14b) são apresentados sobrepostos aos espectros de BR e SR, respectivamente, e também sobrepostos ao espectro de MGH-LL. Para MGH-LL/BR a banda em 1573 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento assimétrico, $\nu_a(\text{OCO})$, do BR. A banda em 1426 cm^{-1} no espectro de BR, devido ao estiramento simétrico, $\nu_s(\text{OCO})$, não apareceu no espectro de MGH-LL/BR provavelmente por ter intensidade menor que $\nu_a(\text{OCO})$. Mesmo MGH-LL/BR tendo índices de adsorção maiores do que MGH-LL/AR e MGH-LL/PR apenas uma banda foi possível ser detectada. Ao contrário do MGH-LL/BR, as três principais bandas que caracterizam o SR foram identificadas: 1583 cm^{-1} , 1426 cm^{-1} e 1300 cm^{-1} , as quais podem ser atribuídas ao estiramento assimétrico, $\nu_a(\text{OCO})$, estiramento simétrico, $\nu_s(\text{OCO})$, e acoplamento entre estiramento simétrico, $\nu_s(\text{OCO})$, e deformação angular, $\delta(\text{O-H})$, respectivamente (SILVA, 2012). As bandas do SR no espectro de MGH-LL/SR além de serem mais intensas do que as bandas de BR em MGH-LL/BR se sobressaem sobre as bandas do LA devido ao elevado teor de SR fisissorvido à bicamada de LA conforme demonstrado pela isoterma (figura 3.7).

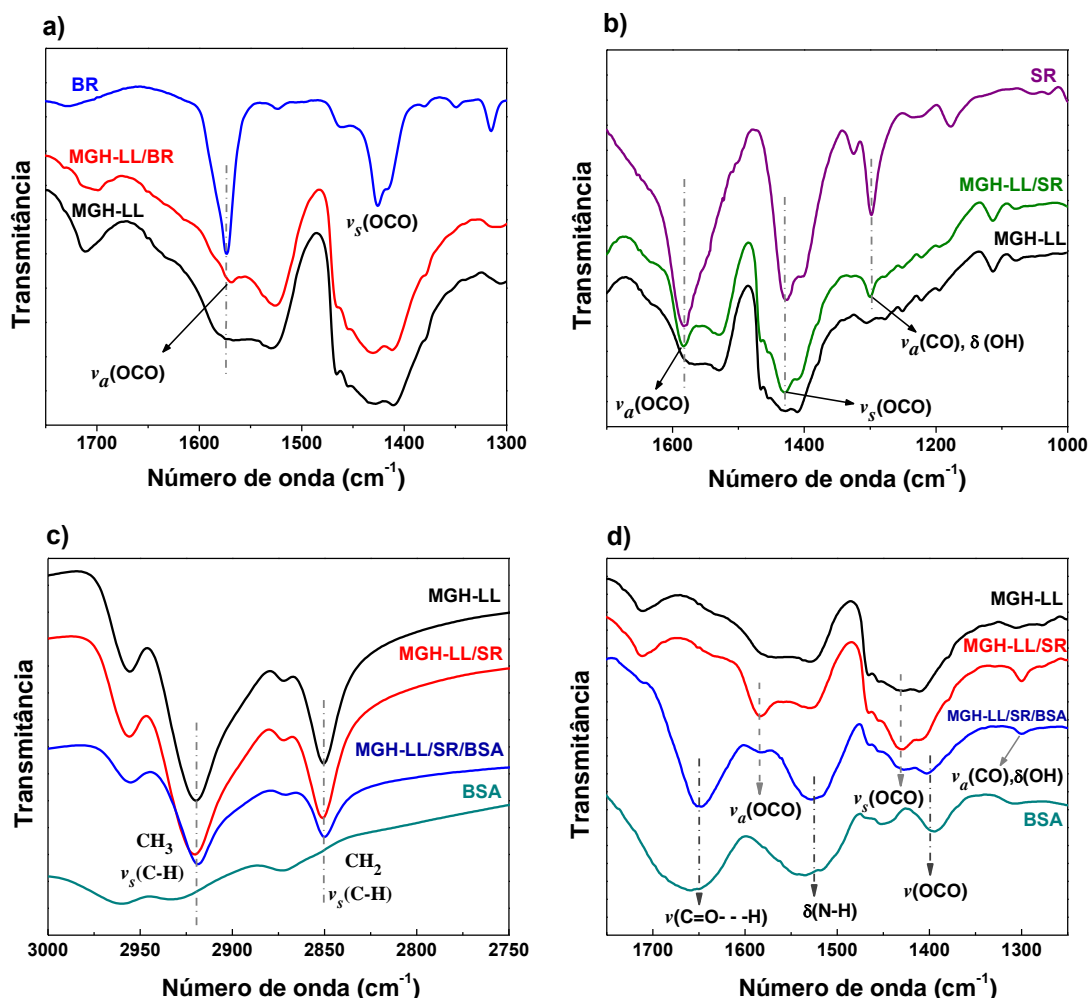


Figura 3.14. Sobreposição dos espectros de infravermelho para a) MGH-LL/BR com MGH-LL e BR; b) MGH-LL/SR com MGH-LL e SR. O espectro para SR não apresenta a banda relativa ao estiramento do grupo carboxila $\nu(\text{C}=\text{O})$ em 1722 cm^{-1} em decorrência de ter sido neutralizado com solução de NaOH até o ponto de equivalência. Sobreposição dos espectros de infravermelho normalizados para MGH-LL/SR/BSA com MGH-LL, MGH-LL/SR e BSA com as principais bandas que caracterizam o SR e BSA destacadas nas regiões de c) 3000 a 2750 cm^{-1} e d) 1850 a 1250 cm^{-1} .

No espectro para MGH-LL/SR/BSA foram observadas tanto as bandas que caracterizam o BSA na estrutura quanto as bandas do LA e do SR. Uma análise comparativa dos espectros de MGH-LL/SR/BSA com BSA mostra que as bandas referentes à proteína ficaram levemente deslocadas e mais estreitas na amostra funcionalizada. As bandas mais intensas no espectro do BSA, localizadas em 1395 , 1535 e 1659 cm^{-1} , apareceram no espectro de MGH-LL/SR/BSA em 1403 , 1527 e 1650 cm^{-1} , respectivamente (figura 3.14d). A banda em 1650 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento da carbonila ($\text{C}=\text{O}$) fazendo uma ligação de hidrogênio com um

grupo amida (N-H), $\nu(\text{C}=\text{O}\cdots\text{H})$; a banda em 1527 cm^{-1} pode ser atribuída a deformação angular do grupo amida, $\delta(\text{N-H})$; a banda pouco intensa em 1403 cm^{-1} é atribuída ao estiramento simétrico de um grupo COO^- livre, $\nu(\text{OCO})$ (GRDADOLNIK; MARÉCHAL, 2001).

Apesar da alta intensidade das bandas do BSA no espectro de MGH-LL/SR/BSA, foi possível visualizar as bandas do SR (figura 3.14d) e da cadeia carbônica do LA (figuras 3.14c). Apesar de muito pouco intensas, as bandas na região de 1600 a 1250 cm^{-1} provenientes dos modos de vibração $\nu_a(\text{OCO})$, $\nu_s(\text{OCO})$ e $\delta(\text{O-H})$ do SR foram identificadas, conforme destacado na figura 3.14d. Ao comparar os espectros de MGH-LL/SR/BSA e MGH-LL/SR percebe-se que estas bandas não foram deslocadas ou mesmo suprimidas sugerindo que talvez o SR não esteja interagindo com BSA, e, que a proteína exerça interação predominantemente com a bicamada de LA. O espectro de MGH-LL/SR/BSA também mostrou que a estrutura do esqueleto carbônico de LA é preservada intacta após funcionalização com BSA já que as bandas na região entre 3000 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} atribuídas ao $\nu_s(\text{C-H})$ do LA apareceram sem qualquer modificação de sua posição.

3.6 Análise termogravimétrica

As amostras de MGH revestidas com LA e funcionalizadas com o carboxilatos de ródio(II) e BSA foram caracterizadas por meio de análise termogravimétrica (TGA) com objetivo de se verificar a presença de LA, de AR, PR, BR e SR adsorvidos e BSA. Todas as curvas termogravimétricas foram colocadas em um único gráfico na figura 3.15 a fim de se mostrar e comparar a perda de massa (Δm) crescente em decorrência da funcionalização com os carboxilatos de ródio(II) cuja extensão demonstrou uma relação estreita com a hidrofobicidade dos adsorvatos, e com BSA. Nas figuras 3.16 e 3.17 as curvas termogravimétricas são mostradas separadamente juntamente com suas derivadas (DTG). Os valores para os Δm totais estão na tabela 3.4. A análise foi feita comparando o perfil das curvas e da DTG, e os valores de Δm totais observados em toda faixa de temperatura observada.

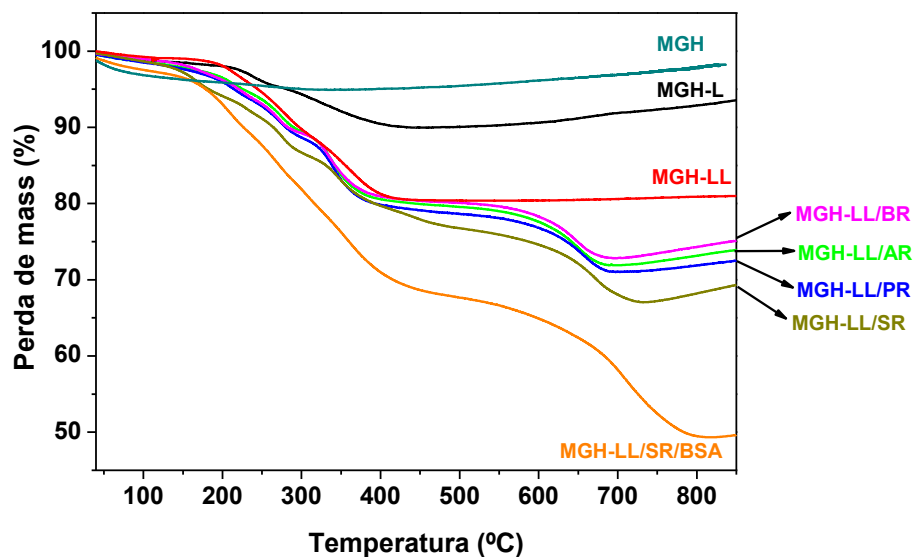


Figura 3.15. Curvas termogravimétricas obtidas para MGH, MGH-L, MGH-LL, MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR, MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA.

As curvas termogravimétricas obtidas para MGH-L e MGH-LL apresentaram aspectos semelhantes da maioria dos trabalhos em que se utilizam ácidos graxos para recobrir NP (SHEN; LAIBINIS; HATTON, 1999a,b; FU; DRAVID; JOHNSON, 2001; ZHANG; HE; GU, 2006). MGH-L e MGH-LL apresentaram Δm totais de 9,8% e 19,6% respectivamente, ambos numa faixa de 30 – 440 °C. A razão entre as massas de LA e de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ em MGH-L e MGH-LL foi de 0,11 e 0,24 g/g, respectivamente. A diferença notada entre as curvas termogravimétricas para MGH-L e MGH-LL obtidas neste trabalho e aquelas encontradas nos trabalhos citados acima consiste na quantidade de eventos de Δm relativos ao tipo de amostra: geralmente são relatados dois eventos de Δm bem definidos para o sistema recoberto com bicamada enquanto é relatado apenas um único evento de Δm para um sistema recoberto com monocamada do ácido graxo. Entretanto, a curva termogravimétrica para MGH-L apresentou dois eventos de Δm bem definidos, com dois picos de sua DTG, em 239 e 322°C (figura 3.16b); enquanto MGH-LL apresentou três eventos de Δm perceptíveis apenas pela análise de sua DTG, com picos em 219, 270 e 360 °C (figura 3.16a).

Ao contrário de grande parte dos trabalhos publicados Vidal-Vidal, Rivas e López-Quitela (2006) apresentaram curvas termogravimétricas para NP recobertas com monocamada de ácido oleico com dois eventos de Δm as quais muito se

assemelham à curva termogravimétrica obtida para MGH-L. Posteriormente, Yang e colaboradores (2010) referindo-se ao mesmo sistema disseram que os dois eventos de Δm observados para aquela monocamada eram devido a ligações químicas distintas entre os grupos COO^- do surfactante e os átomos de ferro na superfície da NP. Assim, os dois eventos de Δm vistos para MGH-L podem ser atribuídos seguramente à monocamada de LA, e o terceiro evento de Δm visto para MGH-LL, visto mais nitidamente por sua DTG, pode ser atribuído à segunda camada de LA. Portanto, os três eventos observados além do maior valor de Δm para MGH-LL são atribuído à presença de uma bicamada de LA que circunda as NP.

A explicação que os autores atribuem aos diferentes eventos de Δm referentes à monocamada e bicamada de ácidos graxos é devido às diferentes populações dos mesmos na superfície das NP cujas interações são de natureza distintas: na monocamada as moléculas do surfactante estão quimissorvidas à superfície das NP, enquanto na bicamada as moléculas do surfactante, adicionadas posteriormente, estão fisissorvidas às primeiras (SHEN; LAIBINIS; HATTON, 1999a). Dessa forma, os eventos de Δm observados para MGH-L e MGH-LL podem ser atribuídos a dessorção e subsequente evaporação de LA.

Em geral, as curvas termogravimétricas para MGH-LL funcionalizadas mostraram a presença tanto de AR, PR, BR e SR quanto de BSA adsorvidos em sítios da bicamada de LA. Isto pode ser verificado pelo aspecto das curvas termogravimétricas quando comparadas com aquelas obtidas para MGH-L e MGH-LL, pela quantidade de picos da DTG e principalmente pelos Δm totais obtidos, os quais foram em sua totalidade maiores do que o Δm total para MGH-LL. Os valores de Δm totais aumentaram conforme a ordem: $\text{MGH-LL/SR/BSA} > \text{MGH-LL/SR} > \text{MGH-LL/PR} \sim \text{MGH-LL/AR} > \text{MGH-LL/BR}$. Esta ordem pode ser correlacionada aproximadamente com o padrão observado nas isotermas de adsorção, ou seja, quanto maior a adsorção, maiores foram os valores de Δm .

As curvas termogravimétricas para MGH-LL/AR (figura 3.16c) e MGH-LL/PR (figura 3.16d) mostraram Δm totais de 28%, numa faixa de temperatura de 30 – 693°C, e 28,8%, numa faixa de temperatura de 30 – 700 °C, respectivamente, com quatro picos de DTG em ambos. Estes valores de Δm maiores do que para MGH-LL são devido à adsorção dos complexos AR e PR. Assim como os valores das taxas

de adsorção para estes dois sistemas estiveram muito próximos (tabela 3.3), da mesma forma os valores de Δm também ficaram praticamente no mesmo patamar.

Tabela 3.4. Valores das perdas de massa (Δm) totais obtidos na faixa de temperatura considerada (ΔT) e picos das derivadas das curvas termogravimétricas (DTG).

Amostra	Δm /%	ΔT / °C	DTG / °C
MGH-L	9,8	30 – 440	239 e 322
MGH-LL	19,6	30 – 440	219, 270 e 360
MGH-LL/AR	28,0	30 – 693	212, 273, 338 e 651
MGH-LL/PR	28,8	30 – 700	214, 270,340 e 658
MGH-LL/BR	27,0	30 – 690	175, 220, 269,334 e 647
MGH-LL/SR	32,7	30 – 730	167, 233, 274, 346, 440, 672
MGH-LL/SR/BSA	50,3	30 – 810	210, 267, 306, 357 e 710

As curvas termogravimétricas para MGH-LL/SR (figura 3.16f) e MGH-LL/SR/BSA (figura 3.17) mostraram Δm totais de 32,7% numa faixa de temperatura de 30 – 730 °C (seis picos DTG), e 50,3% numa faixa de temperatura de 30 – 810 °C (5 picos DTG), respectivamente. O grande aumento de Δm para MGH-LL/SR pode ser atribuído às taxas de adsorção bem maiores deste sistema do que aquelas vistas para os demais complexos de ródio(II). O valor de Δm observado para MGH-LL/SR/BSA, o maior de todos, é devido adsorção de BSA em MGH-LL/SR.

Ao contrário do que se esperava a curva termogravimétrica para MGH-LL/BR (figura 3.16e) apresentou Δm total de apenas 27%, numa faixa de temperatura de 30 – 690 °C (cinco picos DTG) como se nesse sistema a adsorção fosse inferior àquela vista para MGH-LL/AR e MGH-LL/PR o que não concorda com o padrão crescente de adsorção visto. Não se sabe exatamente o motivo para isto apesar da repetição do experimento para esta amostra mostrar resultados não muito diferentes. Na tentativa de explicar essa observação, foram avaliados dois fatores: dessorção de LA associado com diluição e condições de preparo.

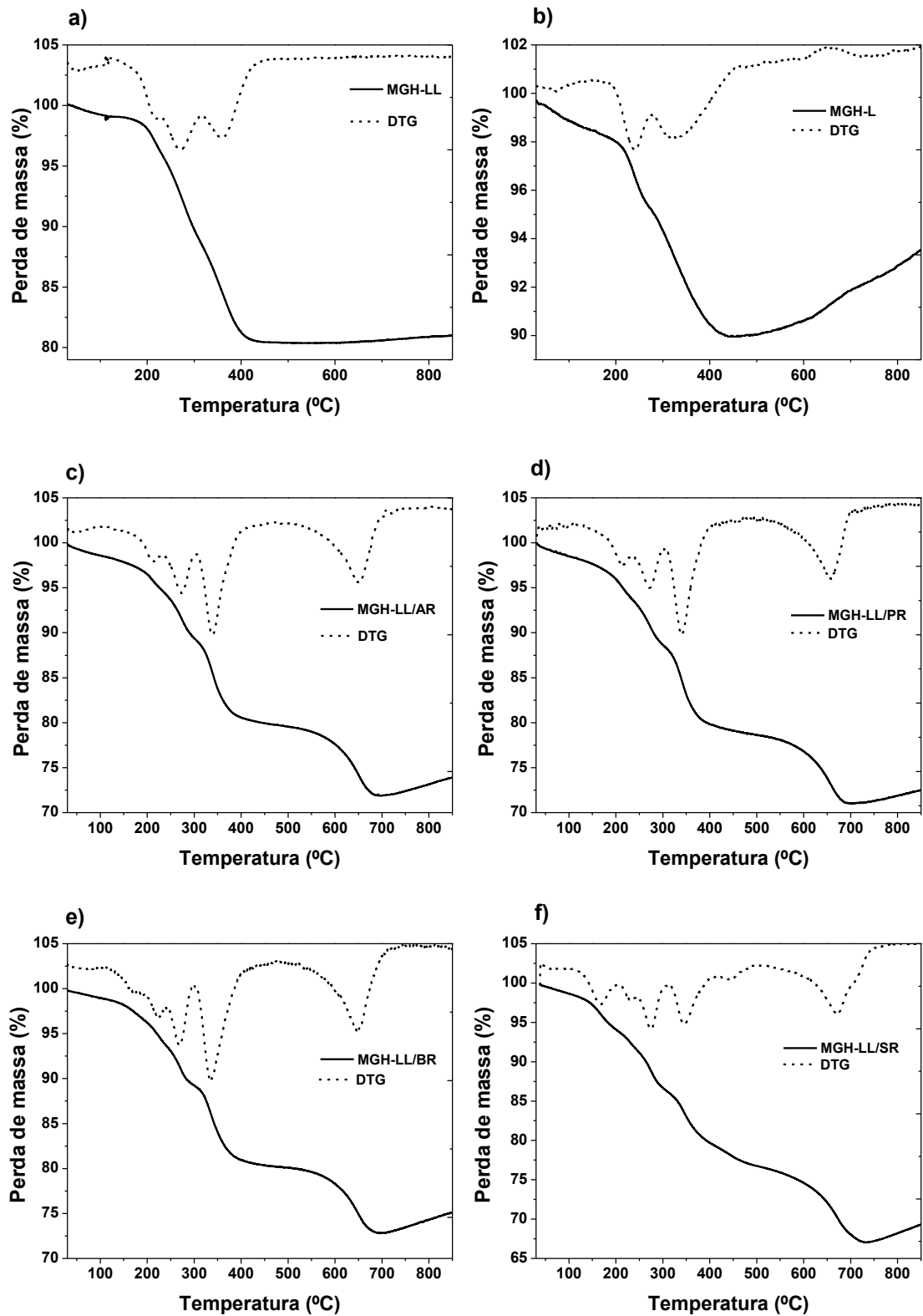


Figura 3.16. Curvas termogravimétricas (linha vermelha) e suas derivadas (DTG) (linha preta) obtidas para a) MGH-LL, b) MGH-L, c) MGH-LL/AR, d) MGH-LL/PR, e) MGH-LL/BR e f) MGH-LL/SR.

Com respeito ao primeiro fator, o BR é menos solúvel em água do que AR e PR, e ainda bem menos solúvel do que o SR. Por isso uma pequena alíquota de acetona foi adicionada a solução de BR para melhorar sua solubilização no preparo desta solução em específico. Mas, a bicamada de LA se desestabiliza na presença deste solvente o que foi verificado em um teste qualitativo. Então, a adsorção de BR poderia ser acompanhada pela dessorção de parte do LA. É preciso dizer que mesmo com o uso de acetona, a solução de BR ainda continuou mais diluída do que as outras soluções, e devido a isto, uma quantidade maior desta solução foi utilizada no preparo da dispersão coloidal MGH-LL/BR para satisfazer o R_{adc} , tornando essa amostra a mais diluída de todas. Portanto, estes dois efeitos poderiam explicar o inesperado valor de Δm para MGH-LL/BR. Apesar dessas considerações, não se sabe se esta hipótese é verdadeira constituindo-se em objeto de investigação futura.

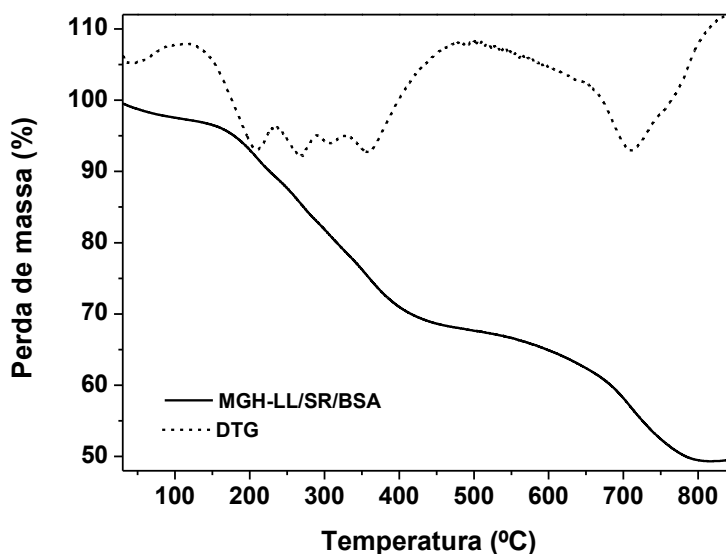


Figura 3.17. Curva termogravimétrica para MGH-LL/SR/BSA (linha vermelha) e sua derivada (DTG) (linha preta).

Em relação ao segundo fator, as condições adotadas para o preparo das amostras podem determinar a quantidade de complexo de ródio(II) adsorvida, apesar das taxas constantes de adsorção verificadas (tabela 3.3) para todos os sistemas. De acordo com a figura 3.8 as taxas de adsorção para um $R_{adc} = 20$ não seguiram a tendência crescente de adsorção com o aumento da hidrofobicidade das moléculas, colocando o BR um pouco abaixo do PR, e praticamente no mesmo

patamar que AR. Algo parecido foi verificado para $R_{\text{adc}} = 16$. Somente estes dois pontos tiveram um comportamento anômalo, nos demais o BR foi adsorvido em maior quantidade do AR e PR em MGH-LL. Assim, a proximidade dos valores de Δm para MGH-LL/AR, MGH-LL/PR e MGH-LL/BR estão de acordo com as condições de preparo das amostras empregadas. Independente dos motivos reais que possam explicar um Δm tão pequeno visto para MGH-LL/BR, a semelhança da curva termogravimétrica de MGH-LL/BR com aquelas dos sistemas funcionalizados com AR, PR e SR juntamente com o Δm total superior ao precursor MGH-LL comprova a presença de BR adsorvido em sítios da bicamada.

3.7 Estabilidade coloidal

A avaliação da estabilidade coloidal das dispersões funcionalizadas foi realizada por meio dos parâmetros diâmetro hidrodinâmico (D_H), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ζ), medidos em alíquotas das amostras para uma mesma [Fe]. Além destes, também foi considerada a contínua observação das dispersões uma vez que a desestabilização das mesmas pode ser acompanhada por alterações visíveis em seu aspecto tais como aumento da opacidade e sedimentação. Os valores de D_H , PDI e ζ foram medidos em água, NaCl 0,45% e DMEM (tabela 3.5)

Os valores de D_H obtidos parecem muito maiores do que aqueles encontrados pelas técnicas de HRTEM e XRD, mas deve se levar em conta que as medidas realizadas por DLS são feitas em alíquotas diluídas das dispersões nas quais mesmo com ausência de campo magnético externo as NP são propensas a aglomeração (MAITY; AGRAWAL, 2007).

Inicialmente o D_H e ζ foram medidos em água já que este é o meio de dispersão em que as NP foram sintetizadas, conservadas e manipuladas no decorrer de outros experimentos além deste, tais como as isotermas de adsorção e a cinética de liberação. Os dados mostraram que houve diminuição do D_H após a síntese da bicamada de LA, de $98,7 \pm 0,47$ nm para $76,4 \pm 0,23$ nm. Este resultado não era esperado, pelo menos não uma redução nessa magnitude, visto que após o recobrimento, as NP (junto com LA) passam a ter diâmetro maior; o que se deve tanto ao comprimento do surfactante circundando as NP quanto a extensão deste

recobrimento, cujo teor em massa, demonstrado pela TGA, é bastante expressivo, 19,6%. Uma possível explicação para isso poderia ser a diminuição de pequenos agregados de NP na dispersão coloidal MGH que ocorre no decorrer da síntese de MGH-LL (PAVLIN; BREGAR, 2012; RAMIMOGHADAM; BAGHERI; HAMID, 2015).

Possivelmente, estes agregados em suspensão são defeitos no instante em que os grupos COO^- do surfactante se ligam aos átomos de ferro na superfície das NP. Como a cobertura orgânica, formada pela bicamada de LA, previne as NP contra agregação em virtude de um mecanismo de estabilização eletrostático e estérico (LAURENT, *et al.* 2008) admite-se que os agregados foram defeitos permanentemente. Quanto ao ζ , a dispersão coloidal MGH-LL apresentou densidade de carga negativa, $-38,7 \pm 1,11$ mV, o que é devido aos grupos COO^- , na segunda camada de LA, orientados para o meio de dispersão (FREITAS, *et al.* 2008; TOMBÁ CZ, *et al.* 2008).

A dispersão coloidal MGH-LL permaneceu estável por um período superior a dois meses sendo observada apenas uma ligeira sedimentação de NP. No entanto manteve seu aspecto e nenhuma alteração significativa que a descaracterizasse como dispersão coloidal estável foi notada. Além do mecanismo de estabilização eletrostático e estérico, também foi utilizado um excesso de LA nas duas etapas de recobrimento na tentativa de melhorar a estabilidade coloidal da dispersão (PETCHAROEN; SIRIVAT, 2012; WOODING, *et al.* 1991). Utilizou-se uma quantidade de LA quase três vezes maior na síntese do que aquela encontrada no recobrimento. Isto pode ser verificado ao comparar a razão entre as massas do surfactante e do óxido de ferro utilizada na síntese (seção 2.3, § 1º) e aquela obtida a partir da TGA (seção 3.6, § 2º). Além dos trabalhos citados acima, Ramimoghadam, Bagheri e Hamid (2015) demonstraram em vários experimentos que de fato a adição de quantidades crescentes de LA na síntese pode melhorar a estabilidade da dispersão coloidal produzida.

Após funcionalização de MGH-LL com AR, PR e BR os valores de D_H e ζ mantiveram-se constantes dentro de uma faixa estreita, de $70,6 \pm 0,59$ nm a $76,7 \pm 0,23$ nm, e de $-42,6 \pm 1,11$ mV a $-40,4 \pm 0,81$ mV, respectivamente, como eram de se esperar, já que, muito provavelmente, os complexos são adsorvidos em sítios próximos a região onde ocorre interação hidrofóbica entre as cadeias carbônicas do LA, não alterando a densidade de carga na região hidrofílica na bicamada. Somente

as dispersões coloidais MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA apresentaram os menores valores para D_H , $55,88 \pm 0,05$ nm (PDI: 0,174) e $53,7 \pm 0,03$ nm (PDI: 0,176), respectivamente. Houve também um ligeiro aumento no ζ , $-35,3 \pm 1,21$ mV e $-33,5 \pm 2,72$ mV, respectivamente.

Este resultado inesperado para MGH-LL/SR corrobora com a terceira hipótese, proposta na seção 3.4, a qual foi utilizada para explicar as excelentes taxas de adsorção de SR, quando comparado com BR. A substituição de certa quantidade de LA por SR, na região que constitui a segunda camada, provocaria um rearranjo da configuração da bicamada de LA de tal maneira que seu D_H fosse reduzido. Isso é possível considerando que o empacotamento do surfactante na superfície das NP seja altamente organizado, e que as moléculas de LA assumam uma disposição espacial expandida, ou seja, preservam uma geometria linear, sem serem dobradas na superfície das NP, conforme ilustrado na figura 3.11 (WOODING, *et al.* 1991). Assim, a desorção de parte do LA fisissorvido por moléculas de SR muito provavelmente diminuiria o D_H de MGH-LL já que o comprimento de LA é maior do que SR. Esta substituição obviamente também alteraria obrigatoriamente a densidade de carga negativa na superfície de MGH-LL, conforme visto no leve aumento do ζ . Como D_H , PDI e ζ não alteraram muito após a funcionalização com BSA esta suposta configuração deve ser mantida.

De modo geral, os valores obtidos para D_H e ζ mostram que as NP se dispersam bem em água após funcionalização com os complexos de ródio(II) e com BSA sendo que as dispersões coloidais MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA foram as mais estáveis. A figura 3.18 mostra que não houve grandes aumentos do D_H num período de duas semanas. Mesmo em um período de dois meses as dispersões coloidais funcionalizadas ainda apresentavam sinais de estabilidade apesar de ter sido observado pequena sedimentação de NP. A dispersão coloidal MGH-LL/SR apresentou sedimentação um pouco menor do que as demais e MGH-LL/SR/BSA praticamente não houve NP sedimentadas. Sabe-se que BSA melhora de forma surpreendente a estabilidade de dispersões coloidais a base de óxido de ferro (ZALOGA, *et al.* 2014, 2015) mas os resultados parecem sugerir que o SR também promove este efeito.

Tabela 3.5. Diâmetro hidrodinâmico (D_H), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (ζ) com desvio padrão (SD), medidos para as dispersões coloidais MGH recoberta com bicamada de LA (MGH-LL), e MGH-LL funcionalizadas com AR (MGH-LL/AR) PR (MGH-LL/PR), BR (MGH-LL/BR), SR (MGH-LL/SR) e MGH-LL/SR funcionalizado com BSA (MGH-LL/SR/BSA). As medidas foram realizadas em água, solução salina NaCl 0,45% e em meio de cultura DMEM a uma $[Fe] = 5,88$ mmol/L.

Dispersão coloidal	Meio aquoso		Solução			
			NaCl 0,45%		DMEM	
	$D_H \pm SD$ (nm)	ζ / mV	$D_H \pm SD$ (nm)	ζ / mV	$D_H \pm SD$ (nm)	ζ / mV
	PDI		PDI		PDI	
MGH	98,7 ± 0,47	56,8 ± 1,9	1219 ± 112	19 ± 0,31	-	-
	0,255 ± 0,008		0,396 ± 0,04			
MGH-LL	76,4 ± 0,23	- 38,7 ± 1,11	418 ± 102	- 37 ± 0,34	130 ± 2,1	- 13,6 ± 0,57
	0,227 ± 0,004		0,428 ± 0,05		0,234 ± 0,02	
MGH-LL/AR	76,7 ± 0,23	- 40,4 ± 0,81	1597 ± 367	-	169 ± 2,05	- 10,1 ± 1,63
	0,219 ± 0,008		0,590 ± 0,01		0,410 ± 0,011	
MGH-LL/PR	70,6 ± 0,59	- 42,6 ± 1,11	1397 ± 299	-	128 ± 0,78	- 9,56 ± 0,007
	0,249 ± 0,012		0,437 ± 0,085		0,257 ± 0,008	
MGH-LL/BR	74,7 ± 1,17	- 41,9 ± 0,06	1825 ± 170	-	117 ± 1,13	- 10 ± 0,693
	0,212 ± 0,015		0,723 ± 0,034		0,247 ± 0,004	
MGH-LL/SR	55,8 ± 0,05	- 35,3 ± 1,21	631 ± 120	- 35,7 ± 1,6	99 ± 0,62	- 14,5 ± 0,58
	0,174 ± 0,006		0,407 ± 0,04		0,264 ± 0,04	
MGH-LL/SR/BSA	53,7 ± 0,03	- 33,5 ± 2,72	91,2 ± 2,8	- 19 ± 0,76	84,1 ± 1,6	- 14,2 ± 1,51
	0,176 ± 0,011		0,169 ± 0,012		0,393 ± 0,01	

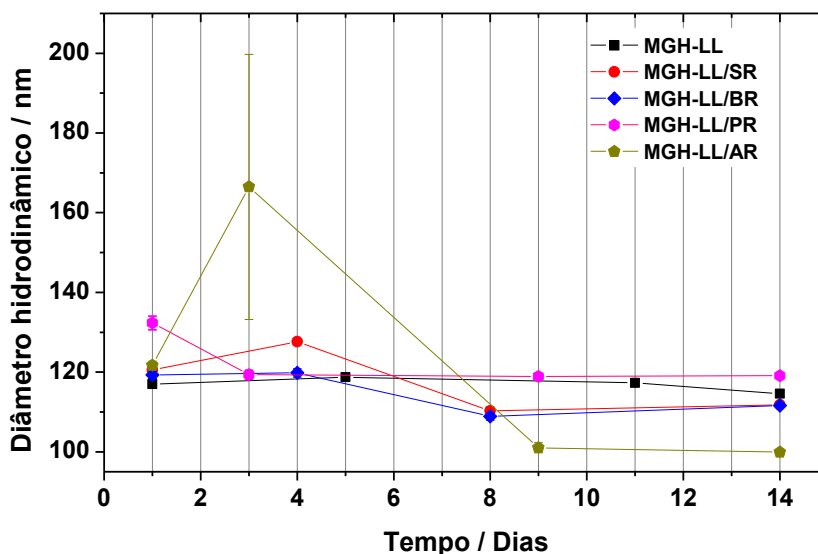


Figura 3.18. Diâmetro hidrodinâmico (D_H) para as dispersões coloidais MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR e MGH-LL/SR realizadas durante quatorze dias. As amostras foram diluídas a uma $[Fe] = 5,88$ mmol/L.

O D_H versus tempo foi medido para MGH-LL logo após adição da solução de NaCl variando-se a concentração na faixa de 0,9 – 0,00045% com a finalidade de se determinar o limite de estabilidade suportado. Em 0,9% as NP sedimentaram imediatamente impossibilitando realizar as medidas, mas abaixo desse valor foi possível realiza-las. A figura 3.19 mostra que acima de 0,09% começa a ocorrer um brusco aumento do D_H o qual atinge valores imensos em 0,45%. Assim, as dispersões foram avaliadas em NaCl 0,45% e observou-se que o D_H para MGH-LL/AR, MGH-LL/PR e MGH-LL/BR aumentou grandemente quando comparados com MGH-LL, numa faixa de 1397 ± 299 a 1825 ± 170 nm os quais estão muito próximos daquele vistos para MGH sugerindo que os complexos AR, PR e BR, não contribuem muito para estabilidade coloidal do sistema em solução salina o que pôde ser também verificado visualmente pela rápida agregação das NP durante as medições. Resultado completamente oposto foi verificado para MGH-LL/SR cujo D_H aumentou apenas para 631 ± 120 nm (PDI: $0,407 \pm 0,004$), com sinais de agregação bem menos visíveis. Em contraste com AR, PR e BR, parece que SR interage com a bicamada de LA de modo a melhorar a resistência em solução salina.

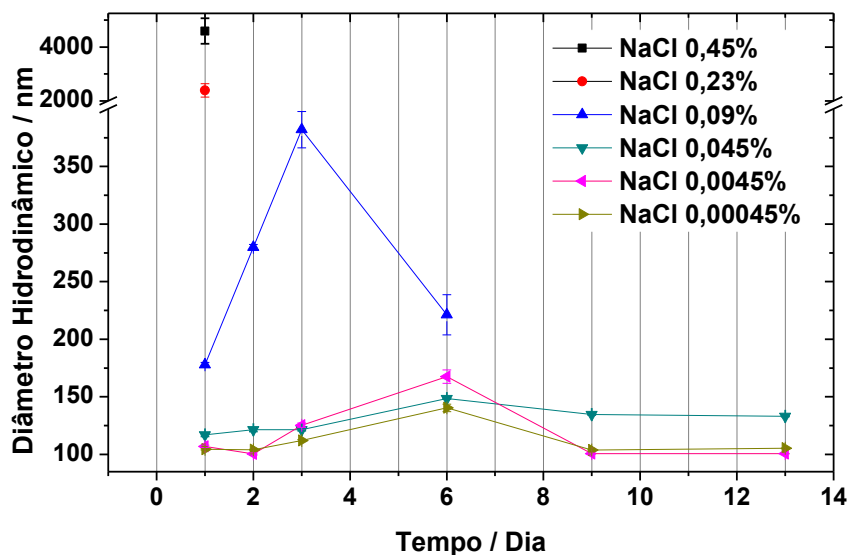


Figura 3.19. Medidas de diâmetro hidrodinâmico (D_H) para as dispersões coloidais MGH-LL diluídas em NaCl (0,45 – 0,00045%) realizadas durante quatorze dias.

A dispersão coloidal MGH-LL/SR/BSA apresentou resultados ainda melhores em solução NaCl 0,45% o que é devido ao recobrimento com BSA. O D_H e o ζ foram $91,2 \pm 2,8$ nm e $-19 \pm 0,76$ mV, respectivamente. O efeito desestabilizador devido à força iônica foi bem menos pronunciado e a dispersão coloidal permaneceu estável por um tempo muito maior do que as demais, apesar do aumento do ζ . Além disto, a sedimentação das NP para MGH-LL/SR/BSA não foi completa como as demais visto que o meio de dispersão em MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR e MGH-LL/SR tornou-se praticamente límpido (em MGH-LL/SR o meio de dispersão demorou mais para ficar límpido). Mesmo em NaCl 0,9% MGH-LL/SR/BSA não sedimentou rapidamente, houve apenas aumento da turbidez enquanto nas outras amostras as NP sedimentaram completamente em uma hora. Isto sugere que BSA interage com a bicamada que circunda as NP dificultando o contato com NaCl retardando assim sua desestabilização (WELL, *et al.* 2012).

Por fim as dispersões foram avaliadas em DMEM onde se observou a ausência de agregação e sedimentação por pelo menos nove meses para todas as amostras. Os valores de D_H , registrados apenas no dia de preparo das amostras, tiveram um ínfimo aumento e não variaram numa faixa muito ampla (SABUNCU, *et al.* 2012). Apesar de MGH-LL/AR, MGH-LL/PR e MGH-LL/BR apresentarem boa

estabilidade neste meio, com D_H variando numa faixa de $117 \pm 1,13$ nm a $169 \pm 2,05$ nm, novamente observou-se que as dispersões coloidais MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA apresentaram os melhores resultados, pois tiveram os menores valores de D_H , $99 \pm 0,62$ nm (PDI: $0,264 \pm 0,04$) e $84,1 \pm 1,6$ nm (PDI: $0,393 \pm 0,01$), respectivamente. Todos os dados obtidos sugerem fortemente que as dispersões coloidais MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA são muito mais estáveis que as demais o que também foi verificado visualmente.

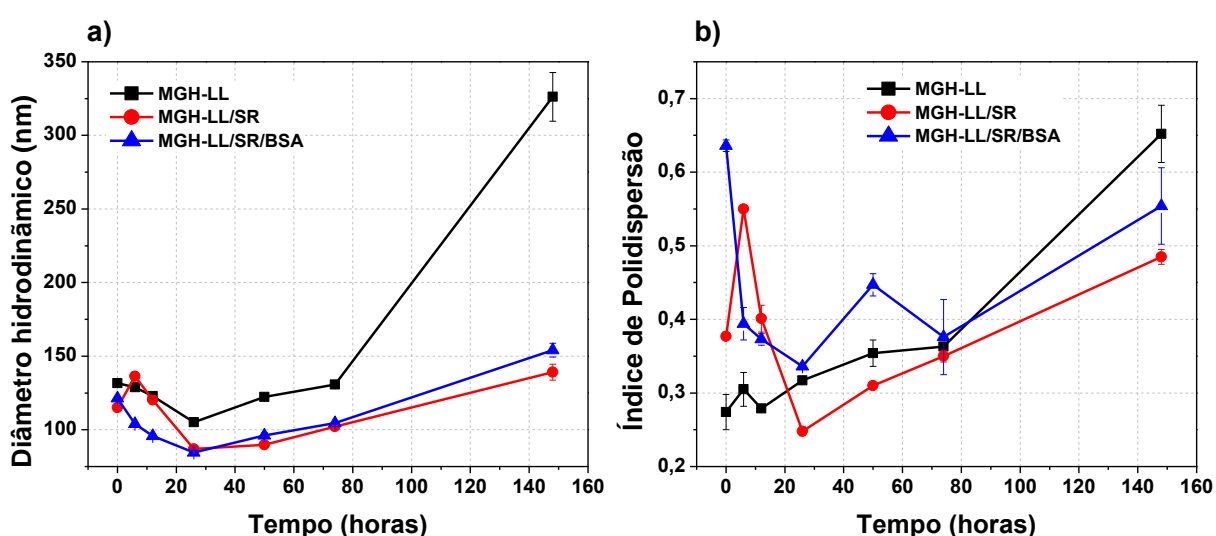


Figura 3.20. a) Diâmetro hidrodinâmico e b) índice de polidispersão para MGH-LL, MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA medidos durante o experimento de cinética de liberação de SR em DMEM num período de aproximadamente seis dias.

Por causa disso, especificamente essas duas amostras foram escolhidas para serem avaliadas quanto ao D_H durante a cinética de liberação. A figura 3.20 mostra que em aproximadamente 80 horas o D_H variou dentro de uma faixa muito estreita, atingindo um D_H máximo por volta de 100 nm, enquanto MGH-LL atingiu um D_H máximo de cerca de 130 nm no mesmo período. Apenas depois de 6 dias houve brusco aumento no D_H e mesmo assim MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA continuaram apresentando valores de D_H menores do que para MGH-LL, sem sinais visíveis de agregação e sedimentação. Os resultados mostram que além de LA e BSA melhorarem a estabilidade das dispersões coloidais, o SR também contribuiu para esse efeito. Se de fato ocorre uma modificação estrutural na bicamada de LA pela

adsorção de SR, conforme proposto, então foi uma alteração benéfica no sistema no que diz respeito ao aumento da estabilidade coloidal nos diferentes meios analisados.

3.8 Cinética de liberação

A cinética de liberação foi realizada tendo em vista analisar a liberação dos complexos AR, PR, BR e SR a partir de MGH-LL, quando dispersas em DMEM, e também avaliar se há alguma relação entre a velocidade de liberação com a natureza hidrofóbica dos complexos. As curvas obtidas mostram a liberação cumulativa em função do tempo (figura 3.21).

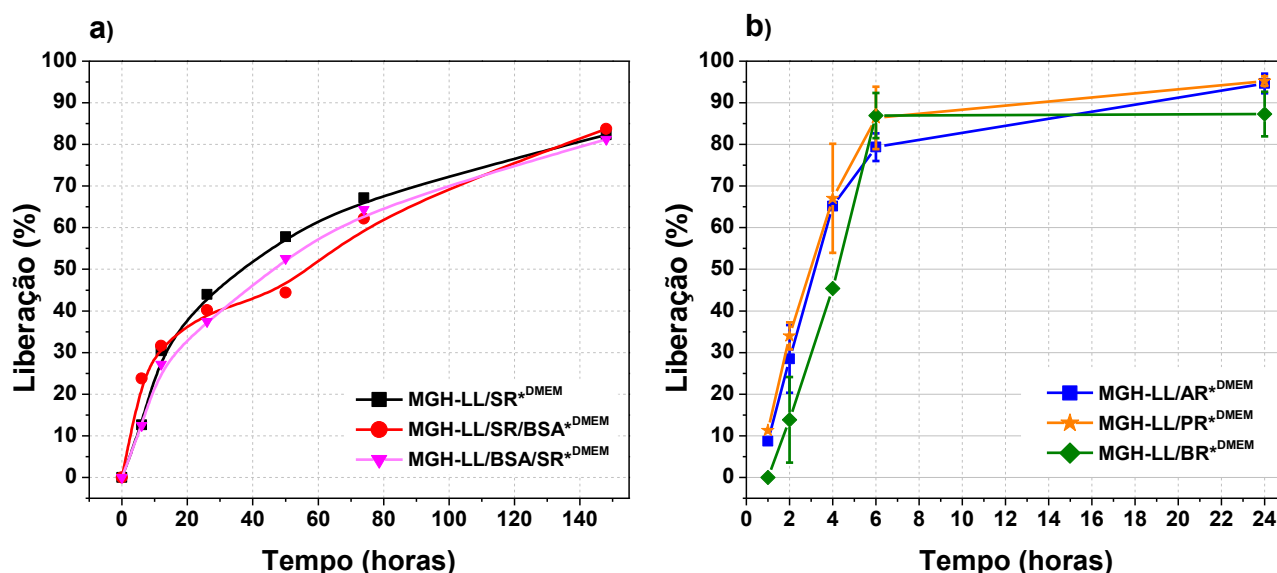


Figura 3.21. Curvas de cinética de liberação para a) MGH-LL/SR*DMEM, MGH-LL/SR/BSA*DMEM e MGH-LL/BSA/SR*DMEM, e b) MGH-LL/AR*DMEM, MGH-LL/PR*DMEM e MGH-LL/BR*DMEM diluídos em DMEM.

Uma primeira análise de todas as curvas mostra que houve liberação significativa, acima de 80%, para as dispersões coloidais diluídas em DMEM. Uma diferença notada nos sistemas trabalhados foi com respeito ao perfil das curvas e o tempo necessário para ocorrer o desprendimento dos complexos de ródio(II) da bicamada de LA e sua difusão pela membrana. À vista disso os sistemas podem ser separados em dois grupos: aqueles em que a liberação ocorreu mais lentamente, MGH-LL/SR*DMEM, MGH-LL/SR/BSA*DMEM e MGH-LL/BSA/SR*DMEM (figura 3.21a); e

aqueles em que a liberação ocorreu mais rapidamente, em no máximo 24 horas, compreendem MGH-LL/AR*^{DMEM}, MGH-LL/PR*^{DMEM} e MGH-LL/BR*^{DMEM} (figura 3.21b).

As curvas para MGH-LL/AR*^{DMEM}, MGH-LL/PR*^{DMEM} e MGH-LL/BR*^{DMEM}, mostraram uma cinética de liberação linear em razão de possuírem aspecto inclinado com elevada liberação dos complexos AR, PR e BR ao longo de 6 horas, 79,4, 86,4 e 87%, respectivamente. Este mesmo comportamento já foi relatado para SPIO associadas com ácidos graxos (ZALOGA, *et al.* 2014; TRAN; VO; TRAN, 2015). A liberação de uma grande quantidade de AR, PR e BR, em um intervalo muito curto, antes que um patamar seja atingido é chamada na literatura de “*burst effect*”, cujas potenciais causas, apontadas por Huang e Brazel (2001), podem ser: condições de síntese, características da superfície da matriz hospedeira – nesse caso MGH-LL –, geometria da amostra, interações entre o fármaco e a matriz hospedeira (adsorção na superfície) e sua morfologia. Destas, as interações entre AR, PR e BR com a bicamada de LA são certamente a principal causa pelo “*burst effect*” constatado.

A grande vantagem desse efeito é a capacidade de liberação imediata dos complexos de ródio(II) no sítio de ação desejado em razão da sua abundante adsorção em regiões próximo à superfície de MGH-LL. A alta toxicidade local ou sistêmica pode ser contrabalançada pelo direcionamento na liberação devido a aplicação do campo magnético o que potencializa seus efeitos (GRONCZEWSKA; DEFORT; KOZIOŁ, 2016).

Após a rápida liberação, as curvas atingem um patamar e a liberação para MGH-LL/AR*^{DMEM}, MGH-LL/PR*^{DMEM} e MGH-LL/BR*^{DMEM} diminui substancialmente para 15,3, 8,8 e 0,4%, respectivamente. As quantidades totais liberadas para MGH-LL/AR*^{DMEM}, MGH-LL/PR*^{DMEM} e MGH-LL/BR*^{DMEM} foram 94,7, 95,2 e 87,3%, respectivamente. Estes sistemas apresentaram liberação total em um período superior a carreadores semelhantes para anticorpos (AIRES, *et al.* 2016) e anti-inflamatórios (GRONCZEWSKA; DEFORT; KOZIOŁ, 2016), mas inferior a carreadores de antitumorais (VISMARA, *et al.* 2017; TRAN; VO; TRAN, 2015).

Por um lado, estes dados mostram que o caráter hidrofóbico crescente dos complexos de ródio(II) pouco afetou na sua quase completa dessorção e

consequente liberação em DMEM, ou seja, em todos os sistemas houve uma liberação expressiva. Por outro lado, é possível explicar as diferenças observadas nos valores totais liberados se considerarmos a natureza hidrofóbica dos complexos de ródio(II) no âmbito de sua interação com a bicamada de LA.

Apesar dos valores da liberação cumulativa estarem próximos percebe-se uma redução, conforme a ordem: $MGH-LL/AR^{*DMEM} \sim MGH-LL/PR^{*DMEM} > MGH-LL/BR^{*DMEM}$; e isto pode seguramente ser correlacionado com o aumento na hidrofobicidade nas moléculas AR, PR e BR (seção 3.4, § 5^o). Isso significa que a maior liberação cumulativa observada para $MGH-LL/AR^{*DMEM}$ e $MGH-LL/PR^{*DMEM}$ pode ser atribuída a menor força de interação entre AR e PR com a bicamada de LA, favorecendo desse modo sua saída do sítio de ligação, e consequente liberação em DMEM, em uma extensão ligeiramente maior do que aquela vista para BR; o que foi demonstrado em suas curvas cujos pontos se encontram, em sua grande maioria, acima dos pontos para $MGH-LL/BR^{*DMEM}$.

O oposto foi verificado para $MGH-LL/BR^{*DMEM}$, cuja curva de liberação esteve sempre abaixo das curvas para $MGH-LL/AR^{*DMEM}$ e $MGH-LL/PR^{*DMEM}$, com exceção do ponto registrado na sexta hora, e, na qual se observou liberação cumulativa um pouco menor em virtude de BR interagir mais fortemente com a bicamada de LA do que AR e PR. Inclusive, não houve liberação de BR na primeira hora, e na segunda hora apenas cerca de 14% foram liberados o que reforça ainda mais essa ideia. É interessante notar que assim como a liberações cumulativas para $MGH-LL/AR^{*DMEM}$ e $MGH-LL/PR^{*DMEM}$ apresentaram valores muito próximos, o mesmo ocorreu com estes sistemas com respeito às taxas de adsorção as quais também foram muito próximas (tabela 3.3).

As curvas para $MGH-LL/SR^{*DMEM}$, $MGH-LL/SR/BSA^{*DMEM}$ e $MGH-LL/BSA/SR^{*DMEM}$, em contraste com as demais, mostraram um perfil claramente distinto com aspecto côncavo durante todo o período do experimento. A liberação de SR ocorreu em um intervalo de tempo bem maior, ou seja, muito mais lenta do que para $MGH-LL/AR^{*DMEM}$, $MGH-LL/PR^{*DMEM}$ e $MGH-LL/BR^{*DMEM}$, abrangendo mais de seis dias; além do mais, foi constante em todo intervalo analisado sem atingir qualquer patamar de saturação. Enquanto $MGH-LL/AR^{*DMEM}$, $MGH-LL/PR^{*DMEM}$ e $MGH-LL/BR^{*DMEM}$ apresentaram uma liberação maciça nas primeiras 6 horas, $MGH-LL/SR^{*DMEM}$, $MGH-LL/SR/BSA^{*DMEM}$ e $MGH-LL/BSA/SR^{*DMEM}$ liberaram apenas 12,6,

23,8 e 12,5% de SR, respectivamente, no mesmo período; e em 24 horas, a liberação foi de 44, 40 e 38%, respectivamente. A liberação cumulativa depois de 6 dias foi de 82,3, 83,7 e 81,2%, respectivamente.

Os perfis destas curvas classificam MGH-LL/SR*^{DMEM}, MGH-LL/SR/BSA*^{DMEM} e MGH-LL/BSA/SR*^{DMEM} como sistemas de liberação sustentada nos quais a administração dos compostos é capaz de alcançar um efeito terapêutico prolongado, devido a liberação lenta dos mesmos durante um período de dias (ou meses), após a aplicação de uma única dose. Os benefícios de uma liberação sustentada incluem: 1) menor frequência de administração, 2) efeitos colaterais reduzidos; 3) níveis estáveis de absorção do fármaco no sangue e no plasma, e 4) melhor conformidade para o paciente. (NATARAJAN, *et al.* 2014). Comportamento muito semelhante foi observado para carreadores de antitumorais (QUAN, *et al.* 2011; JIA, *et al.* 2012; FANG, *et al.* 2012; SADIGHIAN, *et al.* 2014) e carreadores de antibióticos (KARIMINIA; SHAMSIPUR; SHAMSIPUR, 2016) com liberação total em um período de 3 dias a 12 dias.

O motivo proposto para a grande diferença quanto á cinética de liberação observada para os sistemas contendo AR, PR e BR, e aqueles contendo SR, pode ser a estabilidade coloidal melhorada de MGH-LL após adsorção de SR, conforme discutido na seção 3.7, a qual poderia ser associada com uma interação mais efetiva entre SR e a bicamada de LA, conforme discutido na seção 3.4. Provavelmente a liberação prolongada observada para os sistemas contendo SR, pode estar relacionada com esta estabilidade coloidal melhorada, já que as dispersões em DMEM se mantêm estáveis por um tempo maior, conforme demonstrado pelo baixo D_H (figura 3.20). Em contrapartida, um aumento na desestabilização dos sistemas contendo AR, PR e BR, e conseqüente agregação das NP – o aumento de D_H em DMEM foi maior do que para sistemas contendo SR (tabela 3.5) –, pode conduzir a uma liberação abundante dos complexos de ródio(II). Dito isto, a liberação ocorreria simultaneamente a uma progressiva desestabilização das NP. Contudo, os valores de D_H para MGH-LL/AR*^{DMEM}, MGH-LL/PR*^{DMEM} e MGH-LL/BR*^{DMEM} foram medidos apenas no instante inicial e não concomitantes a cinética de liberação para confirmar esse fato.

O BSA que inicialmente foi utilizado tendo em vista melhorar o perfil farmacocinético e também a estabilidade da dispersão coloidal MGH-LL/SR em

diferentes meios, conforme abordado na seção 3.7, o que se alcançou com sucesso, de fato não interferiu na liberação de SR em MGH-LL/SR/BSA^{*DMEM}. Observou-se apenas uma ligeira diminuição na liberação num período de 26 a 74 horas. Uma possível explicação para isto, é que talvez o BSA exerça interação muito mais efetiva com LA do que com SR (CURRY; BRICK; FRANKS, 1999; KRENZEL; CHEN; HAMILTON, 2013; BORA; DEB, 2009); de tal maneira que não interfira na liberação de SR, seja por obstrução à passagem em direção ao meio externo (SADIGHIAN, *et al.* 2014), ou, seja capturando essas moléculas desprendidas, já que possui sítios de interação com fármacos hidrofóbicos (BAI, *et al.* 2013). Esta explicação também concorda com o espectro de FTIR para MGH-LL/SR/BSA no qual se observou que as bandas para SR não mudaram suas posições (figura 3.14d). A forma como o BSA se organiza no sistema MGH-LL/SR/BSA assim como a cinética de liberação de SR propostos neste trabalho estão ilustrados na figura 3.22.

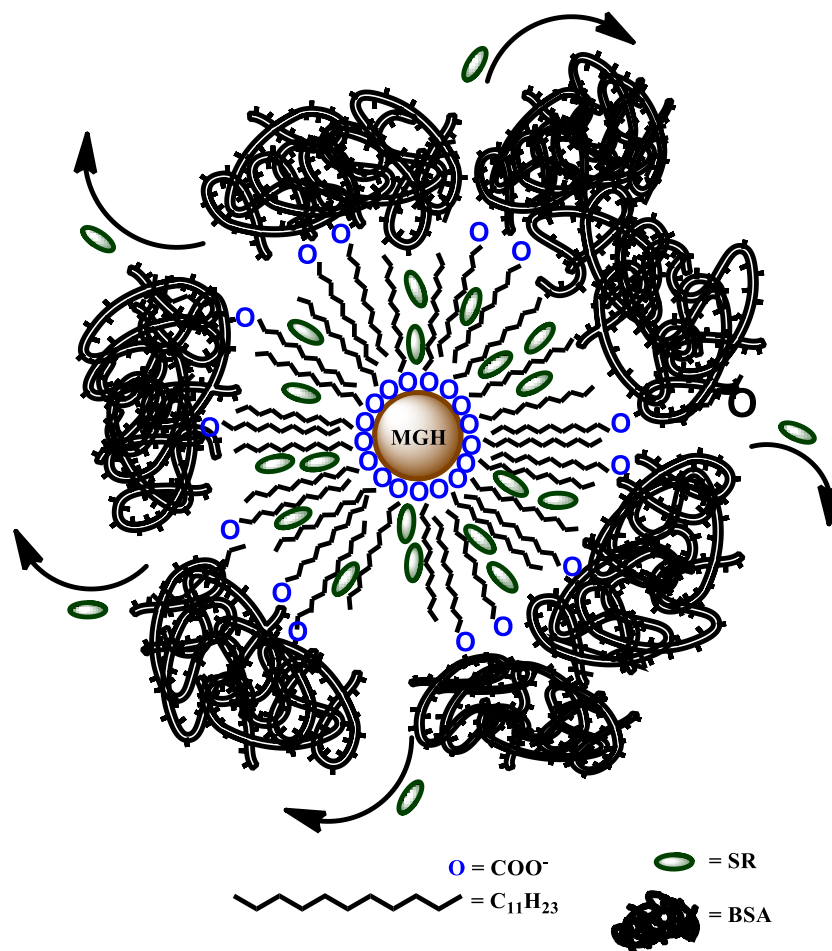


Figura 3.22. Representação para a estrutura MGH-LL/SR/BSA durante a cinética de liberação de SR em DMEM.

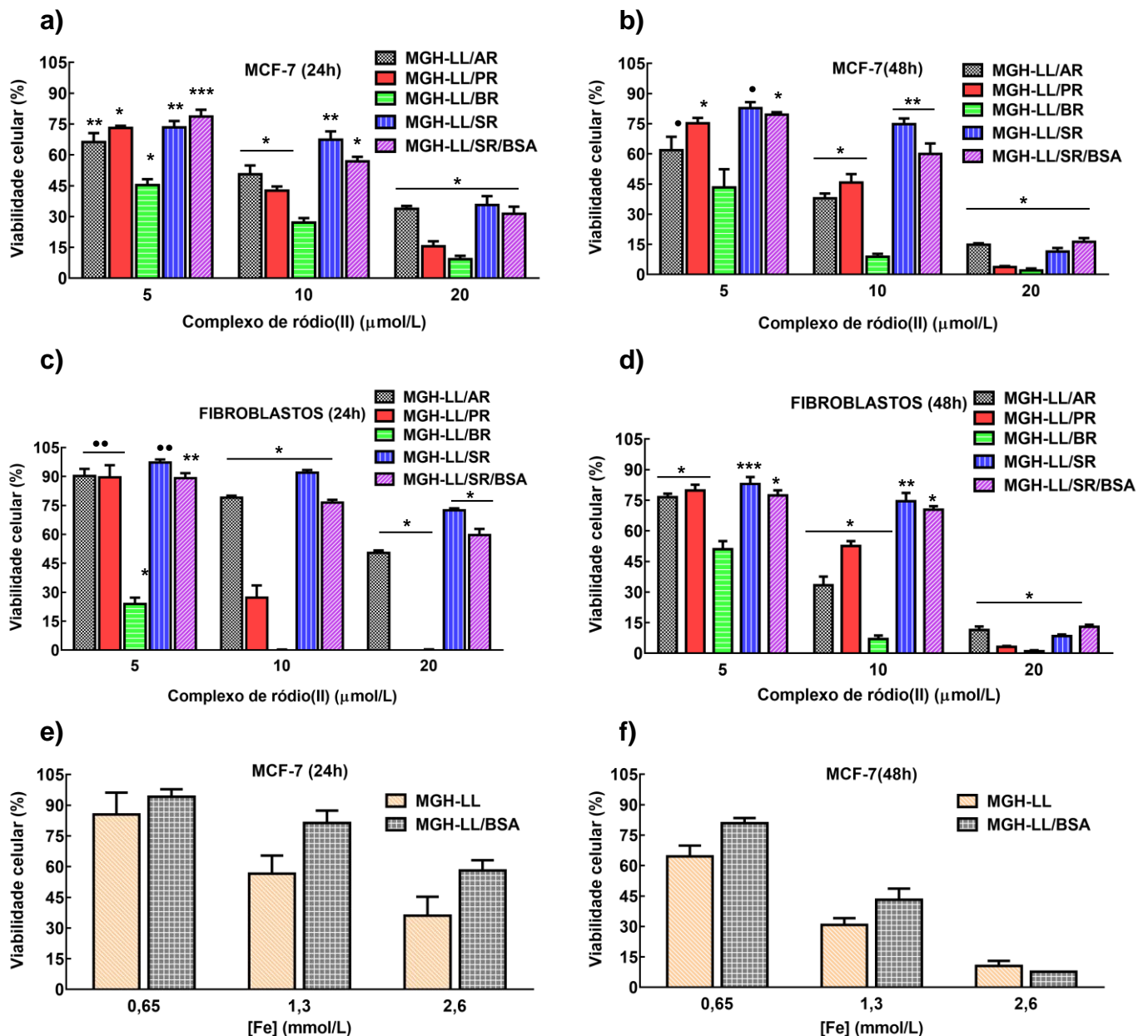
Apesar dos carboxilatos de ródio(II) possuírem afinidade com albumina, os valores referentes a constante de ligação calculados por Espósito e cooperadores (2000) não apresentaram valores tão elevados comparados com outros fármacos, o que facilita o desligamento da proteína. Então, mesmo que o SR liberado da bicamada de LA se ligue à BSA, é provável que a proteína não retenha o complexo de ródio(II) por tempo considerável, ou mesmo nem se ligue ao SR sabendo-se que a proteína está interagindo com LA, e pode também interagir com outros componentes do meio DMEM. Estas considerações são válidas, pois a curva para MGH-LL/SR/BSA*^{DMEM} mostrou um comportamento similar à curva de MGH-LL/SR*^{DMEM}. Apesar desta hipótese, esta análise é inconclusiva, e carece de mais experimentos a fim de se investigar mais detalhadamente o mecanismo de interação de SR com LA e BSA quando em presença de MGH-LL.

Levando-se em conta a interação proposta entre SR e LA (seção 3.4, § 10º) pensou-se que o complexo de ródio(II) poderia estar localizado em regiões mais internas na bicamada de LA, ou seja, mais distantes da fronteira de MGH-LL com o meio de dispersão, impedindo um contato direto entre SR e BSA em MGH-LL/SR/BSA. Tendo isto em mente, foi proposto que a adição de SR posterior ao BSA poderia alterar a cinética de liberação do sistema considerando que houvesse uma interação entre o complexo de ródio(II) e a proteína, ou mesmo uma partição da adsorção em duas potenciais regiões: bicamada de LA e BSA. Posto isto, haveria uma dependência da liberação com as interações entre SR com estes sítios de adsorção, o que talvez resultasse em um perfil de liberação distinto daquele visto para MGH-LL/SR/BSA*^{DMEM} e MGH-LL/SR*^{DMEM}.

Entretanto, nenhuma alteração na cinética de liberação em MGH-LL/BSA/SR*^{DMEM} foi observada. Na verdade, o sistema MGH-LL/BSA/SR*^{DMEM} apresentou exatamente o mesmo comportamento que MGH-LL/SR*^{DMEM} e MGH-LL/SR/BSA*^{DMEM} e nenhuma grande variação ocorreu, exceto o mesmo efeito observado para MGH-LL/SR/BSA*^{DMEM}: uma leve redução na liberação de SR no intervalo de 26 a 74 horas. Tal fato visto para estas dispersões contendo BSA sugere que a proteína exerça um ínfimo efeito regulador na liberação de SR em DMEM.

3.9 Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade foi realizado para verificar a atividade citotóxica de AR, PR, BR e SR depois de associados ao carreador MGH-LL. A figura 3.23a – d mostra a citotoxicidade das dispersões coloidais MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR, MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA em MCF-7 e em fibroblastos após 24 e 48 horas. A figura 3.23e – f mostra a citotoxicidade dos grupos controle MGH-LL e MGH-LL/BSA em MCF-7. A figura 3.23g – h mostra a citotoxicidade de SR em MCF-7 após 24 e 48 horas. A partir dessa figura pode se comparar as atividades citotóxicas dos sistemas em função das concentrações dos ativos e também do caráter hidrofóbico de cada complexo de ródio(II).



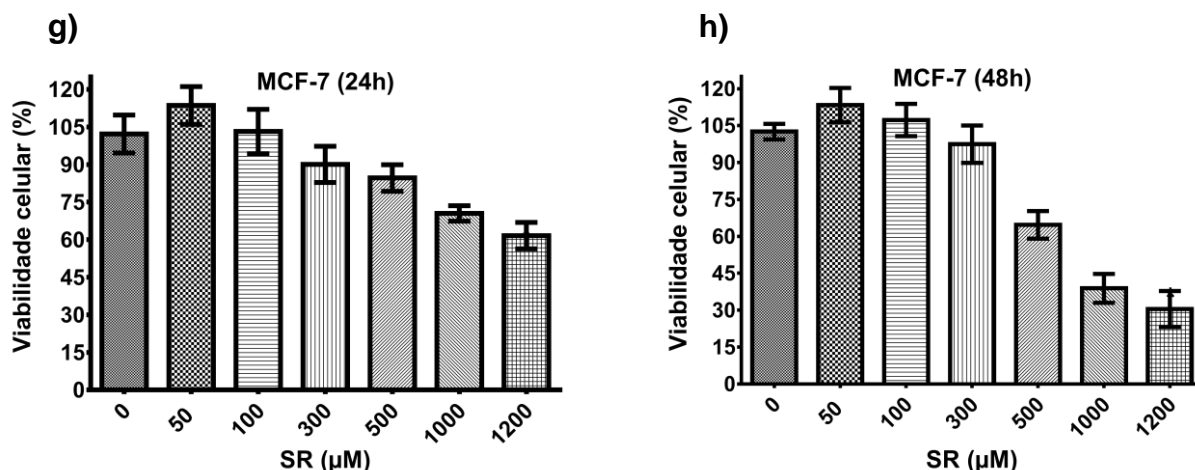


Figura 3.23. Efeito citotóxico das dispersões coloidais MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR, MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA em células de carcinoma mamário (MCF-7) após a) 24 e b) 48 horas, e em células fibroblastos de polpa dentária humana após c) 24 e d) 48 horas. As dispersões coloidais MGH-LL e MGH-LL/BSA foram utilizadas como grupos controle em MCF-7 após e) 24 e f) 48 horas. As concentrações dos complexos de ródio(II) empregadas foram 5, 10 e 20 μmolL^{-1} que equivalem a [Fe] nos grupos controle de 0,65, 1,3 e 2,6 mmolL^{-1} , respectivamente. Citotoxicidade de SR em células MCF-7 após g) 24 e h) 48 horas. Os asteriscos e círculos pretos indicam diferenças estatisticamente significativas determinadas pelo teste entre a porcentagem da viabilidade celular e do grupo controle, sendo * $p < 0,0001$, ** $p < 0,0005$, *** $p < 0,001$, * $p < 0,005$, ** $p < 0,005$.

Todas as dispersões coloidais exerceram atividade antitumoral a qual foi verificada pela redução da viabilidade celular nas células MCF-7. As atividades de todos os sistemas foram maiores após 48 horas do que em 24 horas. A relação entre o caráter hidrofóbico de cada complexo com a redução da viabilidade celular observada fica muito evidente nas células MCF-7 em 10 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ após 24 horas, e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ após 48 horas; e, em fibroblastos apenas em 10 μmolL^{-1} após 24 horas, e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ após 48 horas. Isso significa que a citotoxicidade observada seguiu a ordem: MGH-LL/BR > MGH-LL/PR > MGH-LL/AR conforme foi relatado por Howard e cooperadores (1977) quando se referiram aos complexos livres. Para os demais valores de concentração as atividades de MGH-LL/AR e MGH-LL/PR não seguiram a tendência esperada. Ao contrário disto, MGH-LL/AR foi mais citotóxico do que MGH-LL/PR em MCF-7 em 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ após 24 horas, e 5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ após 48 horas; e em fibroblastos em 5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ após 48 horas. O sistema MGH-LL/BR foi o mais citotóxico nas duas linhagens celulares, em todas as concentrações, o que já era esperado em virtude de BR ser o composto mais hidrofóbico (RAO; SMITH; PATHAK, 1980). De modo geral a citotoxicidade dos

complexos de ródio(II) foi bem menor em fibroblastos do que em MCF-7, com exceção de MGH-LL/BR.

Com respeito ao SR este é o primeiro relato acerca da sua atividade citotóxica, recentemente sua massa molar foi confirmada por espectroscopia de massas (ANEXO E). O SR não foi tóxico mesmo em $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ nos dois intervalos analisados. Contudo, doses bem menores do SR para as dispersões coloidais MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA induziram uma grande diminuição na viabilidade celular nas células MCF-7 e fibroblastos depois de 24 e 48 horas. Com respeito ao período de 24 horas ambas as dispersões coloidais induziram atividade citotóxica maior em células de carcinoma do que em fibroblastos mostrando que os sistemas MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA aumentaram a citotoxicidade do SR. Entretanto, após 48 horas o efeito citotóxico foi similar para as duas linhagem de células. Um comportamento muito similar também foi observado para dispersão coloidal MGH funcionalizada com citrato de ródio(II) em que foi demonstrado um aumento na citotoxicidade do composto em células tumorais 4T1 (CARNEIRO, *et al.* 2011). As dispersões coloidais MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA foram bem menos citotóxicas do que as demais dispersões coloidais. Isso pode ser explicado pelo aumento do caráter hidrofílico de SR devido a presença dos quatro grupos COO^- ausentes nos demais complexos de ródio(II) (figura 3.9).

A dispersão coloidal MGH-LL que foi utilizada como grupo controle também demonstrou atividade citotóxica em células MCF-7. Além disto, foi mais citotóxica do que MGH-LL/BSA em todas as [Fe] após 24 horas. Mesmo após 48 horas, este efeito foi semelhante quando considerado nas mesmas [Fe]. Tem sido relatado na literatura que LA apresenta atividade antimicrobiana (KABARA, *et al.* 1972), citostática e citotóxica em alga e cianobactéria (WU, *et al.* 2006) e em células de câncer de cólon (FAUSER, *et al.* 2013), e que sistemas SPIO sem qualquer revestimento não possuem toxicidade (PRADHAN, *et al.* 2007). Assim, o efeito citotóxico encontrado para MGH-LL pode estar relacionado à citotoxicidade da LA.

CAPÍTULO 4 – CONCLUSÃO

4.1 Considerações finais

O preparo das dispersões coloidais MGH e MGH-LL mostrou boa reprodutibilidade com excelente rendimento visto que as perdas de NP durante cada síntese praticamente foram muito pequenas. Todas as amostras analisadas por HRTEM apresentaram formatos aproximadamente esféricos e dimensões na escala nanométrica com uma distribuição de tamanho das NP em uma faixa estreita.

Os diâmetros médios das NP calculados por XRD e por HRTEM foram muito próximos. Apesar de não ter sido observado uma grande variação na M_s para MGH-LL/AR, MGH-LL/PR, MGH-LL/BR e MGH-LL/SR quando comparados aos sistemas precursores, as curvas de magnetização mostraram comportamento superparamagnético o que é imprescindível tendo em vista sua aplicação no direcionamento dos compostos através da aplicação de um campo magnético externo sem o qual os efeitos dos mesmos não seriam potencializados.

A presença de uma bicamada de LA circundando as NP foi confirmada por TGA onde se verificou perda de massa total de 19,6% atribuído à cobertura orgânica. A utilização de LA como revestimento não apenas permitiu a adsorção dos compostos antitumorais AR, PR, BR e SR em taxas crescentes em função do comprimento das cadeias carbônicas, mas melhorou a estabilidade coloidal das NP. A etapa de adsorção foi muito bem sucedida o que significa que MGH-LL mostrou se capaz de agir como um carreador para os complexos de ródio(II). Vale ressaltar que o BR que é composto mais insolúvel, por ser o mais hidrofóbico, apresentou ótimas taxas de adsorção em MGH-LL. Isso é importante visto que já foi demonstrado que BR apresenta o melhor potencial citotóxico contra a linhagem celular MCF-7.

A presença dos complexos de ródio(II) em regiões da bicamada de LA pôde ser confirmada pelo perfil das isotermas de adsorção em que se verificou um aspecto crescente, ainda que menos pronunciado para MGH-LL/AR e MGH-LL/PR. Ainda que os espectros de FTIR das amostras funcionalizadas não tenham mostrado bandas de estiramento $\nu_a(\text{OCO})$ e $\nu_s(\text{OCO})$ para AR e PR, as curvas termogravimétricas mostraram valores de Δm maiores do que aquele encontrado para MGH-LL, o que se deu em virtude das baixas taxas de adsorção. Portanto, não há dúvidas de que estes complexos foram adsorvidos em MGH-LL. Quanto aos

sistemas MGH-LL/BR e MGH-LL/SR tanto os espectros de FTIR quanto a TGA claramente mostraram a presença de BR e SR, respectivamente, em MGH-LL.

Os grupos COO^- nas quatro extremidades da molécula SR foram apontados como fator chave na explicação para as excelentes taxas de adsorção quando se compara com MGH-LL/AR e MGH-LL/PR, e, principalmente com MGH-LL/BR já que a única diferença química entre SR e BR são estes grupos COO^- , o que torna MGH-LL/BR uma referência para MGH-LL/SR. A interação entre SR e a bicamada de LA precisa ser mais investigada. Do mesmo modo, o modelo que foi proposto para a estrutura de MGH-LL/SR segundo o qual há uma substituição parcial de LA por SR apenas na segunda camada do surfactante, mesmo sendo razoável, visto que na literatura são encontrados sistemas híbridos semelhantes, carece de uma análise mais detalhada.

A funcionalização do sistema MGH-LL/SR com BSA mostrou elevados níveis de adsorção da proteína o que foi demonstrado por TGA onde se observou o maior Δm de todas as amostras. O espectro de FTIR mostrou bandas oriundas da proteína presentes em MGH-LL/SR/BSA. O sistema MGH-LL/SR/BSA mostrou estabilidade coloidal muito melhor do que as demais amostras nos meios testados. Apesar da sugestão de que MGH-LL/SR/BSA e MGH-LL/BSA/SR podem apresentar estruturas semelhantes, a interação de SR com MGH-LL/BSA, assim como a interação de BSA com MGH-LL/SR, precisam ser investigados. A elucidação deste mecanismo poderia ser melhor compreendido por meio da técnica de espectroscopia de fluorescência. Um teste preliminar realizado em MGH-LL/SR/BSA e MGH-LL/BSA/SR parece indicar que o BSA interage preferencialmente com a bicamada de LA.

A cinética de liberação mostrou que todos os complexos de ródio(II) foram liberados em DMEM quase que completamente. Isso mostrou que o sistema MGH-LL logrou êxito como plataforma de liberação controlada. A extensão e rapidez desta liberação em DMEM foi levemente dependente do caráter hidrofóbico dos complexos de ródio(II). Portanto, assim como as fracas interações hidrofóbicas entre AR e PR com a bicamada de LA – um pouco mais efetiva para BR – são apontadas como a causa da vertiginosa liberação; de igual modo, as interações mais efetivas entre os grupos COO^- de SR com as cadeias carbônicas do surfactante podem explicar a duradoura e espaçada liberação no intervalo observado.

Todos os sistemas exerceram atividade citotóxica em células MCF-7 e fibroblasto independente dos teores adsorvidos. Foi demonstrado que o efeito citotóxico do SR nos sistemas MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA é maior do que para o complexo de ródio(II) livre. As dispersões MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA apresentaram citotoxicidades inferiores daquela vista para MGH-LL/AR, MGH-LL/PR e MGH-LL/BR porque SR é o composto mais hidrofílico. Dessa forma, a associação entre os agentes antitumorais AR, PR, BR e SR com MGH-LL representa uma alternativa promissora para minimizar a toxicidade dos complexos de ródio(II) no tratamento do câncer.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSON, A. W.; GAST, A. P. **Physical chemistry of surfaces**. 6th ed. New York: John Wiley & Sons, INC, 1997. 784p.
- AIRES, A.; OCAMPO, S. M.; SIMÕES, B. M.; RODRÍGUEZ, M. J.; CADENAS, J. F.; COULEAUD, P.; SPENCE, K.; LATORRE, A.; MIRANDA, R.; SOMOZA, Á.; CLARKE, R. B.; CARRASCOSA, J. L.; CORTAJARENA, A. L. Multifunctionalized iron oxide nanoparticles for selective drug delivery to CD44-positive cancer cells. **Nanotechnology**, v. 27, n. 6, p. 065103, 2016.
- BAI, Y.; SUN, S.; ZHANG, H.; ZHAO, T. Investigation of interaction between bovine serum albumin and drugs by fluorescence spectrometry. **Analytical Methods**, v. 5, n. 24, p. 7036-7041, 2013.
- BEAR, J. L.; KITCHENS, J.; WILLCOTT, M. R. A kinetic study of the reactions of rhodium(II) acetate with trifluoroacetic acid. **Journal of Inorganic Nuclear Chemistry**, v. 33, p. 3479-3486, 1971.
- BELIN, T.; GUIGUE-MILLOT, N.; CAILLOT, T.; AYMES, D.; NIEPCE, J. C. Influence of grain size, oxygen stoichiometry, and synthesis conditions on the γ -Fe₂O₃ vacancies ordering and lattice parameters. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 163, n. 2, p. 459-465, 2002.
- BICA, D.; VÉKÁS, L.; AVDEEV, M. V.; MARINICĂ, O.; SOCOLIUC, V.; BĂLĂSOIU, M.; GARAMUS, V. M. Sterically stabilized water based magnetic fluids: Synthesis, structure and properties. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, n. 1, p. 17 - 21, 2007.
- BORA, D. K.; DEB, P. Fatty Acid Binding Domain Mediated Conjugation of Ultrafine Magnetic Nanoparticles with Albumin Protein. **Nanoscale Research Letters**, v. 4, n. 2, p. 138-143, 2009.
- BOYAR, E. B.; ROBINSON, S. D. Rhodium(II) Carboxylates. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 50, n. 1-2, p. 109-208, 1983.
- BURGOS, A. E.; OKIO, C. K. Y. A.; SINISTERRA, R. D. Preparação do composto de associação entre citrato de ródio(II) e β -ciclodextrina. **Química Nova**, v. 35, n. 4, p. 762-765, 2012.
- CARNEIRO, M. L. B.; PEIXOTO, R. C. A.; JOANITTI, G. A.; OLIVEIRA, R. G. S.; TELLES, L. A. M.; MIRANDA-VILELA, A. L.; BOCCA, A. L.; VIANNA, L. M. S.; SILVA, I. C. R.; SOUZA, A. R.; LACAVAL, Z. G. M.; BÃO, S. N. Antitumor effect and toxicity of free rhodium(II) citrate and rhodium(II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer. **Journal of nanobiotechnology**, v. 11, n. 1, p. 4, 2013.
- CARNEIRO, M. LB; NUNES, E. S.; PEIXOTO, R. CA.; OLIVEIRA, R. GS.; LOURENÇO, L. HM.; DA SILVA, I. CR.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C.; DE SOUZA, A. R.; LACAVAL, Z. GM.; BÃO, S. N. Free Rhodium(II) citrate and rhodium(II) citrate magnetic carriers as potential strategies for breast cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 11, 2011.
- CASTELLAN, G. **Fundamentos de físico-química**. Tradução. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos S.A. 1986. 529p.
- CHAUDHURI, R. G.; PARIJA, S. Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications. **Chemical Review**, v. 112, n. 4, p. 2373-2433, 2012.

- CHILDERS, E.; STRUTHERS, G. W. Infrared Evaluation of Sodium Salts of Organic Acids. **Analytical Chemistry**, v. 27, n. 5, p. 737-741, 1955.
- CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. **The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., 2003. 694p.
- CUI, M.; LIU, R.; DENG, Z.; GE, G.; LIU, Y.; XIE, L. Quantitative study of protein coronas on gold nanoparticles with different surface modifications. **Nano Research**, v. 7, n. 3, p. 345-352, 2014.
- CULLITY, B. D. **Elements of x-ray diffraction**. 2nd ed. Massachusetts: Addison-Wesley publishing company inc., 1978. 555p.
- CURRY, S.; BRICK, P.; FRANKS, N. P. Fatty acid binding to human serum albumin: new insights from crystallographic studies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1441, n. 2-3, p. 131-140, 1999.
- DIAS, A. M. G. C.; HUSSAIN, A.; MARCOS, A. S.; ROQUE, A. C. A. A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 1, p. 142-155, 2011.
- DILNAWAZ, F.; SINGH, A.; MOHANTY, C.; SAHOO, S. K. Dual drug loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeted cancer therapy. **Biomaterials**, v. 31, n. 13, p. 3694-3706, 2010.
- DIMER, F. A.; FRIEDRICH, R. B.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.
- ELSADEK, B.; KRATZ, F. Impact of albumin on drug delivery — New applications on the horizon. **Journal of Controlled Release**, v. 157, n. 1, p. 4-28, 2012.
- ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 157, n. 2, p. 168-182, 2012.
- ERATHODIYIL, N.; YING, J. Y. Functionalization of Inorganic Nanoparticles for Bioimaging Applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n.10, p. 925-935, 2011.
- ESPÓSITO, B. P.; OLIVEIRA, E.; ZYNGIER, S. B.; NAJJAR, R.; ESPÓSITO, B. et al. Effects of human serum albumin in some biological properties of rhodium(II) complexes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 5, p. 447-452, 2000.
- FANG, C.; KIEVIT, F. M.; VEISEH, O.; STEPHEN, Z. R.; WANG, T.; LEE, D.; ELLENBOGEN, R. G.; ZHANG, M. Fabrication of magnetic nanoparticles with controllable drug loading and release through a simple assembly approach. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 1, p. 233-241, 2012.
- FAUSER, J. K.; MATTHEWS, G. M.; CUMMINS, A. G.; HOWARTH, G. S. Induction of Apoptosis by the Medium-Chain Length Fatty Acid Lauric Acid in Colon Cancer Cells due to Induction of Oxidative Stress. **Chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 214-224, 2013.

- FREITAS, E. R. L.; SOARES, P. R. O.; SANTOS, R. P.; SANTOS, R. L.; SILVA, J. R.; PORFIRIO, E. P.; BÁO, S. N.; LIMA, E. C. O.; MORAIS, P. C.; GUILLO, L. A. In Vitro Biological Activities of Anionic γ -Fe₂O₃ Nanoparticles on Human Melanoma Cells. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, p. 2385-2391, 2008.
- FU, L.; DRAVID, V. P.; JOHNSON, D. L. Self-assembled (SA) bilayer molecular coating on magnetic nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 181, n. 1-2, p. 173-178, 2001.
- GRANQVISTT, C. G.; BUHRMAN, R. A. Ultrafine metal particles. **Journal of Applied Physics**, v. 47, n. 5, p. 2200-2219, 1976.
- GRDADOLNIK, J.; MARÉCHAL, Y. Bovine serum albumin observed by infrared spectrometry. I. Methodology, structural investigation, and water uptake. **Biopolymers (Biospectroscopy)**, v. 62, n. 1, p. 40-53, 2001.
- GRONCZEWSKA, E.; DEFORT, A.; KOZIOŁ, J. L. Kinetics of Ibuprofen Release From Magnetic Nanoparticles Coated with Chitosan, PEG and Dextran. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 50, n. 7, p. 491-499, 2016.
- HOLLAND, T. J. B.; REDFERN, S. A. T. Unit cell refinement from powder diffraction data: the use of regression diagnostic. **Mineralogical Magazine**, v. 61, n. 404, p. 65-77, 1997.
- HONG, R.; ZHANG, S. Z.; HAN, Y. P.; LI, H. Z.; DING, J.; ZHENG, Y. Preparation, characterization and application of bilayer surfactant-stabilized ferrofluids. **Powder Technology**, v. 170, n. 1, p. 1-11, 2006.
- HORNUNG, A.; POETTLER, M.; FRIEDRICH, R. P.; WEIGEL, B.; DUERR, S.; ZALOGA, J.; CICHA, I.; ALEXIOU, C.; JANKO, C. Toxicity of Mitoxantrone-loaded Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in a HT-29 Tumour Spheroid Model. **Anticancer research**, v. 36, n. 6, p. 3093-3102, 2016.
- HOWARD, R. A.; SHERWOOD, E.; ERCK, A.; KIMBALL, A. P.; BEAR, J. L. Hydrophobicity of several rhodium(II) carboxylates correlated with their biologic activity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 943-946, 1977.
- HUANG, X.; BRAZEL, C. S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 73, n. 2-3, p. 121-136, 2001.
- JEFFERY, G.H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R.C. **VOGEL's Textbook of quantitative chemical analysis**. 5th ed. New York: Longman Scientific & Technical, 1989. 906p.
- JIA, Y.; YUAN, M.; YUAN, H.; HUANG, X.; SUI, X.; CUI, X.; TANG, F.; PENG, J.; CHEN, J.; LU, S.; XU, W.; ZHANG, L.; GUO, Q. Co-encapsulation of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles and doxorubicin into biodegradable PLGA nanocarriers for intratumoral drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 2012: 7, p. 1697-1708, 2012.
- KABARA, J. J.; SWIECZKOWSKI, D. M.; CONLEY, A. J.; TRUANT, J. P. Fatty Acids and Derivatives as Antimicrobial Agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 2, n. 1, p.23-28, 1972.
- KALIDASAN, V.; LIU, X. L.; HERNG, T. S.; YANG, Y. DING, J. Bovine Serum Albumin-Conjugated Ferrimagnetic Iron Oxide Nanoparticles to Enhance the

- Biocompatibility and Magnetic Hyperthermia Performance. **Nano-Micro Letters**, v. 8, n. 1, p. 80-93, 2015.
- KANG, Y. S.; RISBUD, S.; RABOLT, J. F.; STROEVE, P. Synthesis and characterization of nanometer-size Fe_3O_4 and $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ particles. **Chemistry of Materials**, v. 8, n. 9, p. 2209-2211, 1996.
- KARIMINIA, S.; SHAMSIPUR, A.; SHAMSIPUR, M. Analytical characteristics and application of novel chitosan coated magnetic nanoparticles as an efficient drug delivery system for ciprofloxacin. Enhanced drug release kinetics by low-frequency ultrasounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 129, p. 450-457, 2016.
- KINDERLERER, J. L. Degradation of the Lauric Acid Oils. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 33, n. 4, p. 345-354, 1994.
- KOROLEV, V. K.; RAMAZANOVA, A. G.; BLINOV, A. V. Adsorption of surfactants on superfine magnetite. **Russian Chemical Bulletin**, v. 51, n. 11, p. 2044 - 2049, 2002.
- KRATZ, F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 132, n. 3, p. 171-183, 2008.
- KRENZEL, E. S.; CHEN, Z.; HAMILTON, J. A. Correspondence of Fatty Acid and Drug Binding Sites on Human Serum Albumin: A Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Study. **Biochemistry**, v. 52, n. 9, p. 1559-1567, 2013.
- LAN, Q.; LIU, C.; YANG, F.; LIU, S.; XU, J.; SUN, D.; Synthesis of bilayer oleic acid-coated Fe_3O_4 nanoparticles and their application in pH-responsive Pickering emulsions. **Journal of colloid and Interface Science**, v. 310, n. 1, p. 260-269, 2007.
- LAURENT, S.; FORGE, D.; MARC, P.; ROCH, A.; ROBIC, C.; ELST, L. V.; MULLER, R. N. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological aspects. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 6, p. 2064-2110, 2008.
- LI, D.; JIANG, D.; CHEN, M.; XIE, J.; WU, Y.; DANG, S.; ZHANG, J. An easy fabrication of monodisperse oleic acid-coated Fe_3O_4 nanoparticles. **Materials Letters**, v. 64, n. 22, p. 2462-2464, 2010.
- LI, L.; MAK, K. Y.; LEUNG, C. W.; CHAN, K. Y.; CHAN, W. K.; ZHONG, W.; PONG, P. W. T. Synthesis and Characterization of Self-Assembled Monolayer and Bilayer Carboxyl-Group Functionalized Magnetic Nanoparticles. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 48, n. 11, p. 3299-3302, 2012.
- LI, W.; ZALOGA, J.; DING, Y.; LIU, Y.; JANKO, C.; PISCHETSRIEDER, M.; ALEXIOU, C.; BOCCACCINI, A. R. Facile preparation of multifunctional superparamagnetic PHBV microspheres containing SPIONs for biomedical applications. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016.
- LIU, Z. L.; WANG, H. B.; LU, Q. H.; DU, G. H.; PENG, L.; DU, Y. Q.; ZHANG, S. M.; YAO, K. L. Synthesis and characterization of ultrafine well-dispersed magnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 283, n. 2 - 3, p. 258-262, 2004.

- 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. 1-2, p. 24-46, 2011.
- MAITY, D.; AGRAWAL, D. C. Synthesis of iron oxide nanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 308, n. 1, p. 46-55, 2007.
- MALVERN INSTRUMENTS LTD. **Zetasizer nano series user manual**. Malvern Instruments, 2005.
- MYERS, D. **Surfaces, interfaces, and colloids**. Tradução. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 1999. 493p.
- NATARAJAN, J. V.; NUGRAHA, C.; NG, X. W.; VENKATRAMAN, S. Sustained-release from nanocarriers: a review. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 122-138, 2014.
- PAVLIN, M.; BREGAR, V. B. Stability of nanoparticle suspensions in different biologically relevant media. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 7, n. 4, p. 1389-1400, 2012.
- PENG, Z.; HIDAJAT, K.; UDDIN, M. Adsorption of bovine serum albumin on nanosized magnetic particles. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 271, n. 2, p. 277-283, 2004.
- PETCHAROEN, K.; SIRIVAT, A. Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method. **Materials Science and Engineering: B**, v. 177, n. 5, p. 421-427, 2012.
- PRADHAN, P.; GIRI, J.; BANERJEE, R.; BELLARE, J.; BAHADUR, D. Cellular interactions of lauric acid and dextran-coated magnetite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, n. 1, p. 282-287, 2007.
- QUAN, Q.; XIE, J.; GAO, H.; YANG, M.; ZHANG, F.; LIU, G.; LIN, X.; WANG, A.; EDEN, H. S.; LEE, S.; ZHANG, G.; CHEN, X. HSA Coated Iron Oxide Nanoparticles as Drug Delivery Vehicles for Cancer Therapy. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 5, p. 1669-1676, 2011.
- RAMIMOGHADAM, D.; BAGHERI, S.; HAMID, S. B. A. In-situ precipitation of ultra-stable nano-magnetite slurry. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 379, p. 74-79, 2015.
- RAO, P. N.; SMITH, M. L.; PATHAK, S. Rhodium (II) butyrate: A potential anticancer drug with cell cycle phase-specific effects in HeLa cells. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 64, p. 905-912, 1980.
- RUTNAKORNPITUK, M.; MEEROD, S.; BOONTHA, B.; WICHAI, U. Magnetic core-bilayer shell nanoparticle: A novel vehicle for entrapment of poorly water-soluble drugs. **Polymer**, v. 50, n. 15, p. 3508-3515, 2009.
- SABUNCU, A. C.; GRUBBS, J.; QIAN, S.; ABDEL-FATTAH, T. M.; STACEY, M. W.; BESKOK, A. Probing nanoparticle interactions in cell culture media. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 96-102, 2012.
- SADIGHIAN, S.; ROSTAMIZADEH, K.; HOSSEINI-MONFARED, H.; HAMIDI, M. Doxorubicin-conjugated core-shell magnetite nanoparticles as dual-targeting

- carriers for anticancer drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 406-413, 2014.
- SALDANHA, Camila de Arruda. **Avaliação da atividade antifúngica da anfotericina B conjugada com nanopartículas magnéticas estabilizadas com bicamada de ácido láurico no tratamento da paracoccidioidomicose**. Brasília, 2012. 103p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2012.
- SHAW, D. J. **Introduction to colloid and surface chemistry**. 4th ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1992. 306p.
- SHEN, L.; LAIBINIS, P. E.; HATTON, T. A. Aqueous magnetic fluids stabilized by surfactant bilayers. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 194, n. 1-3, p. 37-44, 1999.
- SHEN, L.; LAIBINIS, P. E.; HATTON, T. A. Bilayer Surfactant Stabilized Magnetic Fluids: Synthesis and Interactions at Interfaces. **Langmuir**, v. 15, n. 2, p. 447-453, 1999.
- SILVA, Joel Rocha da. **Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com bicamadas de laurato/laurato e laurato/pluronic: Estudo da associação com anfotericina B**. Goiânia, 2008. 87p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, 2012.
- SILVA, Matheus Oliveira da. **Succinato de ródio (II): síntese, caracterização e adsorção em nanopartículas de maghemita**. 2012. 86p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, 2012.
- SOLER, M. A. G.; LIMA, E. C. D.; ALCÂNTARA, G. B.; MORAIS, P. C. Superparamagnetic Iron Oxides. **Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology**, Valencia, California, USA: American Scientific Publishers, v. 23, p. 513-532, 2012.
- SUN, Y. K.; MA, M.; ZHANG, Y.; GU, N. Synthesis of nanometer-size maghemite particles from magnetite. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 245, p. 15-19, 2004.
- TIETZE, R.; LYER, S.; DÜRR, S.; STRUFFERT, T.; ENGELHORN, T.; SCHWARZ, M.; ECKERT, E.; GÖEN, T.; VASYLYEV, S.; PEUKERT, W.; WIEKHORST, F.; TRAHMS, L.; DÖRFLER, A.; ALEXIOU, C. Efficient drug-delivery using magnetic nanoparticles — biodistribution and therapeutic effects in tumour bearing rabbits. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 9, n. 7, p. 961-971, 2013.
- TOMBÁ CZ, E.; BICA, D.; HAJDÚ, A.; ILLÉS, E.; MAJZIK, A.; VÉKÁS, L. Surfactant double layer stabilized magnetic nanofluids for biomedical application. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v. 20, n. 20, 2008.
- TRAN, T. T.; VAN VO, T. V.; TRAN, P. HL. Design of iron oxide nanoparticles decorated oleic acid and bovine serum albumin for drug delivery. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 94, p. 112-118, 2015.
- VIDAL-VIDAL, J.; RIVAS, J.; LÓPEZ-QUINTELA, M. Synthesis of monodisperse maghemite nanoparticles by the microemulsion method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 288, n. 1-3, p. 44-51, 2006.

- VISMARA, E.; BONGIO, C.; COLETTI, A.; EDELMAN, R.; SERAFINI, A.; MAURI, M.; SIMONUTTI, R.; BERTINI, S.; URSO, E.; ASSARAF, Y. G.; LIVNEY, Y. D. Albumin and Hyaluronic Acid-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Loaded with Paclitaxel for Biomedical Applications. **Molecules**, v. 22, n. 7, p. 1030, 2017.
- WALDRON, R. D. Infrared Spectra Ferrites. **Physical Reviews**, v. 99, n. 6, p. 1727-1735, 1955.
- WANG, PC.; CHIU, W. Y.; LEE, C F.; YOUNG, T.H. Synthesis of iron oxide/poly(methyl methacrylate) composite latex particles: Nucleation mechanism and morphology. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 42, n. 22, p. 5695-5705, 2004.
- WELLS, M. A.; ABID, A.; KENNEDY, I. M.; BARAKAT, A. I. Serum proteins prevent aggregation of Fe₂O₃ and ZnO nanoparticles. **Nanotoxicology**, v. 6, n. 8, p. 837-846, 2012.
- WOODING, A.; KILNER, M.; LAMBRICK, D. B. Studies of the double surfactant layer stabilization of water-based magnetic fluids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 144, n. 1, p. 236-242, 1991.
- WU, J. T.; CHIANG, Y. R.; HUANG, W. Y.; JANE, W. N. Cytotoxic effects of free fatty acids on phytoplankton algae and cyanobacteria. **Aquatic Toxicology**, v. 80, n. 4, p. 338-345, 2006.
- YANG, K.; PENG, H.; WEN, Y.; LI, N. Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 256, n. 10, p. 3093-3097, 2010.
- YEE, C.; KATABY, G.; ULMAN, A.; PROZOROV, T.; WHITE, H.; KING, A.; RAFAILOVICH, M.; SOKOLOV, J.; GEDANKEN, A. Self-Assembled Monolayers of Alkanesulfonic and -phosphonic Acids on Amorphous Iron Oxide Nanoparticles. **Langmuir**, v. 15, n. 21, p. 7111-7115, 1999.
- ZALOGA, J.; J., PÖTTLER, M.; LEITINGER, G.; FRIEDRICH, R. P.; ALMER, G.; LYER, S.; BAUM, E.; TIETZE, R.; HEIMKE-BRINCK, R.; MANGGE, H.; DÖRJE, F.; LEE, G.; ALEXIOU, C. Pharmaceutical formulation of HSA hybrid coated iron oxide nanoparticles for magnetic drug targeting. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 101, p. 152-162, 2016.
- ZALOGA, J.; JANKO, C.; NOWAK, J.; MATUSZAK, J.; KNAUP, S.; EBERBECK, D.; TIETZE, R.; UNTERWEGER, H.; FRIEDRICH, R. P.; HEIMKE-BRINCK, R.; BAUM, E.; CICHA, I.; DORJE, F.; ODENBACH, S.; LYER, S.; LEE, G.; ALEXIOU, C. Development of a lauric acid/albumin hybrid iron oxide nanoparticle system with improved biocompatibility. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 4847-4866, 2014.
- ZALOGA, J.; STAPF, M.; NOWAK, J.; PÖTTLER, M.; FRIEDRICH, R. P.; TIETZE, R.; LYER, S.; LEE, G.; ODENBACH, S.; HILGER, I.; ALEXIOU, C. Tangential Flow Ultrafiltration Allows Purification and Concentration of Lauric Acid-/Albumin-Coated Particles for Improved Magnetic Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 19291-19307, 2015.
- ZHANG, L.; HE, R.; GU, HC. Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 253, n. 5, p. 2611-2617, 2006.

ZHAO, S. Y.; LEE, D. K.; KIM C. W.; CHA, H. G.; KIM Y. H.; KANG, Y. S. Synthesis of Magnetic Nanoparticles of Fe_3O_4 and CoFe_2O_4 and Their Surface Modification by Surfactant Adsorption. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 27, n. 2, p. 237-242,2006.

CAPÍTULO 5 – ATIVIDADES ACADÊMICAS DESENVOLVIDAS

5.1 Trabalhos apresentados

Os resultados deste trabalho de doutorado foram parcialmente apresentados no I Workshop da Pós-Graduação em Química realizado no Instituto de Química (UFG), e no 55º Congresso Brasileiro de Química, realizado em Goiânia:

SILVA, M. O.; SOUZA, A. R. Desenvolvimento de nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ revestidas com um híbrido de bicamada de ácido láurico/BSA funcionalizados com carboxilatos de ródio(II). In: I Workshop da Pós-Graduação em Química. Goiânia, Brasil, 2015. Apresentação de pôster.

SILVA, M. O.; SOUZA, A. R. Desenvolvimento de nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ revestidas com um híbrido de bicamada de ácido láurico/BSA funcionalizados com carboxilatos de ródio(II). In: 55º Congresso Brasileiro de Química. Goiânia, Brasil, 2015. Apresentação de pôster.

5.2 Artigos publicados em cooperação

Amostras de dispersões coloidais de NP de maguemita funcionalizadas com citrato de ródio(II) foram sintetizadas e fornecidas para o grupo de pesquisa do Instituto de Ciências Biológicas da UNB para realização de estudos de morte celular por apoptose em células tumorais MCF-7, e para tratamento de camundongos portadores de carcinoma mamário 4T1. Dos resultados obtidos foram publicados dois artigos:

CHAVES, N. L.; LOPES, C. A. P.; CARNEIRO, M. L. B.; SOUZA, A. R.; SILVA, M. O.; CORRÊA, J. R.; BÃO, S. N. Rhodium Citrate Associated with Maghemite Nanoparticles Causes DNA Fragmentation Independently of Caspases 3 and Mediated by Reactive Oxygen Species. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 06, n. 05, 2015.

PEIXOTO, R. C. A.; MIRANDA-VILELA, A. L.; FILHO, J. S.; CARNEIRO, M. L. B.; OLIVEIRA, R. G. S.; SILVA, M. O.; SOUZA, A. R.; BÃO, S. N. Antitumor effect of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles on mice bearing breast cancer: a systemic toxicity assay. **Tumor Biology**, v. 36, n. 5, p. 3325-3336, 2014.

Além do artigo publicado com os resultados obtidos para os sistemas MGH-LL/SR e MGH-LL/SR/BSA, outro artigo está sendo escrito com os resultados obtidos para os sistemas MGH-LL/AR, MGH-LL/PR e MGH-LL/BR.

CAPÍTULO 6 – ARTIGO



Copyright © 2017 American Scientific Publishers
All rights reserved
Printed in the United States of America

Journal of
Nanoscience and Nanotechnology
Vol. 17, 1–12, 2017
www.aspbs.com/jnn

Development of a Promising Antitumor Compound Based on Rhodium(II) Succinate Associated with Iron Oxide Nanoparticles Coated with Lauric Acid/Albumin Hybrid: Synthesis, Colloidal Stability and Cytotoxic Effect in Breast Carcinoma Cells

Matheus Oliveira da Silva^{1*}, Marcella Lemos Brettas Carneiro², Joséilma Luciana Neves Siqueira³,
Sônia Nair Bão³, and Aparecido Ribeiro de Souza¹

¹Institute of Chemistry, Federal University of Goiás, Campus Samambaia, Goiânia, Goiás, 74.690-900, Brazil

²Faculty of Planaltina, University of Brasília (UnB), 73.345-010, Brazil

³Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília (UnB), 70.910-900, Brazil

In this study, we report the synthesis and characterization of a new rhodium(II) succinate complex ($\text{Rh}_2(\text{suc})_4$) and its immobilization on lauric acid bilayer-coated maghemite nanoparticles (MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$) and subsequent adsorption with bovine serum albumin (MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ /BSA). $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ has been characterized by elemental analysis, potentiometric titration, TGA, MS, FTIR and UV-Vis analysis. The maghemite phase was confirmed by XRD, and a diameter of 10 nm was obtained by Sherrer equation. The VSM experiment showed superparamagnetic properties. TEM showed nanoparticles with a spherical shape and a mean diameter of 8.5 ± 0.4 and 9.1 ± 0.4 nm for MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ and MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ /BSA, respectively. FTIR and TGA confirmed the immobilization of $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ and bovine serum albumin adsorption on superparamagnetic iron oxide. Hydrodynamic size (D_H) and zeta potential (ζ) measurements were made in aqueous, NaCl and DMEM media. D_H for dispersions was lower in aqueous medium, but increased in saline and DMEM media. In aqueous and saline media, ζ was not altered for MGH-2L and MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$, but was significantly lower for MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ /BSA. Therefore, MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ /BSA was the most stable dispersion, meaning that BSA coating prevents aggregation more than lauric acid bilayer coating. MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ and MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ /BSA dispersions induced cytotoxicity in breast carcinoma (MCF-7) and fibroblast cells in culture, and this effect was higher than that exerted by free $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ and more specific to breast carcinoma cells than to fibroblasts. Therefore, we suggest that these dispersions have an important potential for future clinical applications and, thus, they should be considered a platform to enhance $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ cytotoxicity, specifically in breast carcinoma.

Keywords: Mammary Carcinoma, Rhodium(II) Carboxylates, Drug Delivery System, Magnetic Drug Targeting, Colloidal Stability.

1. INTRODUCTION

The chemistry of transition metal complexes has emerged since Rosenberg discovered cisplatin as a therapeutic agent for the treatment of many cancers.¹ Despite its potential application, there are drawbacks, such as adverse effects and high toxicity.² Thus, other platinum-based anticancer compounds as well as palladium, ruthenium, gold

and other metal compounds have been tested to evaluate their anticancer activity;³ some of the most promising candidates have been studied clinically, including *trans*-[tetrachlorobis(1*H*-indazole)ruthenate(III)] (KP1019), its sodium salt *trans*-[tetrachloro(dimethylsulfoxide) (imidazole)ruthenate(III)] (NKP-1339), *trans*-tetrachloro(dms) (imidazole) ruthenate(III)] (NAMI-A)⁴ and a palladium-porphyrin complex that acts as a photosensitizer, TOOKAD-soluble.^{5,6}

* Author to whom correspondence should be addressed.

Rhodium(II) carboxylates ($\text{Rh}_2(\text{RCOO})_4\text{L}_2$) (where R = alkyl group; L = H_2O or another solvent molecule) belong to the second generation of antitumor metal complexes, along with platinum and ruthenium.⁷ Rhodium(II) carboxylates comprise a class of dinuclear compounds with metal–metal bond. The four perpendicular bridging ligands coordinate to the two rhodium atoms via carboxylic groups.⁸

These compounds showed carcinostatic activity against Ehrlich tumor,⁹ leukemia L1210 cells,¹⁰ K562 human leukemic cell line,¹¹ P388 ascites tumors, yoshida ascites sarcoma and the T8 sarcoma of Guerin on rats;¹² even the inhibition of DNA replication was observed¹³ and more recently breast carcinoma cells MCF-7 and 4T1 in mice.^{14,15} However, the high toxicity associated with low aqueous solubility has been an obstacle to the continuation of studies with these compounds. As a result, our research group has investigated the association of rhodium(II) carboxylates with superparamagnetic iron oxide (SPIO) as a platform for a drug delivery system (DDS). For instance, rhodium(II) citrate ($\text{Rh}_2(\text{cit})_4$) and its association with a SPIO dispersion showed cytotoxicity that was more specific to breast carcinoma than to epithelial breast cells¹⁴ and promoted a significant decrease in tumor area in mice

bearing orthotopic 4T1 breast carcinoma.¹⁶

The advantages of SPIO are mainly due to their chemical stability, easy synthesis route, low-cost reagents, biocompatibility and functionalization of its surface with a considerable number of therapeutic agents ranging from small molecules, such as carboxylic acids and amino acids, to greater molecules such as proteins and antibodies.¹⁷ However, in the SPIO dispersions, the nanoparticles (NPs) have a tendency to agglomerate spontaneously, since they have high surface free energy.¹⁸

In order to solve this problem, modification of the surface is required. Coating the SPIO surface promotes

- (i) colloidal stability, which occurs due to steric repulsion and electrostatic stabilization mechanisms;
- (ii) increased hydrophilic character;
- (iii) increased time in bloodstream;
- (iv) conditions for the encapsulation/adsorption of therapeutic agents¹⁹ and
- (v) reduced toxicity.²⁰

Albumin is a versatile protein carrier for drug delivery, which has been shown to be nontoxic, non-immunogenic, biocompatible and biodegradable and, thus, it is an excellent material to synthesize NPs for drug delivery.²¹ Similarly, fatty acid-coated NPs, such as oleic acid (OA)²² and lauric acid (LA),²³ has been employed fulfilling this purpose satisfactorily.

In this work, LA (12-carbon atom chain) was chosen as coating material on the maghemite surface because of the following advantages:

- (i) NPs used with it gain biocompatibility and stabilization,²⁴

- (ii) it has been approved for use in pharmaceuticals and the food industry;²⁵

- (iii) straightforward synthesis of coated NPs and

- (iv) provision of sites for association with hydrophobic drugs.²⁶

Recently, Zaloga and coworkers²⁷ prepared a hybrid-coated NP, on which bovine serum albumin (BSA) was adsorbed onto LA-coated NP. The magnetic DDS proved to be colloidally stable, with biocompatibility and the desired physicochemical properties. Moreover, albumin has been extensively employed as a drug carrier due to its excellent properties such as aqueous solubility, stability in the pH range of 4–9, preferential uptake in tumor tissue, biodegradability and non-toxicity.^{21,28}

In the present work, we described the synthesis, characterization and cytotoxicity of rhodium(II) succinate complex ($\text{Rh}_2(\text{suc})_4$) in its free form or associated with LA-coated SPIO and subsequently its adsorption with BSA. Hydrodynamic size analysis was performed to investigate the colloidal stability over time of the aqueous colloidal dispersions of the functionalized NPs in water, saline solution and DMEM culture medium. Finally, we investigated the cytotoxicity in either breast carcinoma cells or fibroblasts induced by $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ and

coated with SPIO, denominated MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ and MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ /BSA. We observed that the MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ and MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ /BSA dispersions induced a cytotoxic effect, and this was more specific to breast carcinoma than to fibroblast cells. Therefore, we suggest that these dispersions present relevant potential for clinical applications.

2. EXPERIMENTAL DETAILS

2.1. Materials

Rhodium(II) acetate, ($\text{Rh}_2(\text{ac})_4$), (ac = acetate) and rhodium(II) trifluoroacetate, ($\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$), (tfa = trifluoroacetate) were prepared by ligand exchange according to a previously reported procedure.^{29,30} All chemicals were used as received without further purification: ethyl ether (Chemco, Brazil), petroleum ether (Chemco, Brazil), hydrated rhodium(III) chloride (Umicore, Brazil), succinic acid (Baker Analyzed Reagent), iron(II) chloride tetrahydrated, iron(III) chloride hexahydrated, sodium hydroxide, concentrated hydrochloric acid and LA were purchased from VETEC, Brazil. Dialysis tube with a molecular weight cutoff (MWCO) of 12–16 kDa was purchased from INLAB, Brazil. Ultrafiltration tube (MWCO 100 kDa), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), BSA and trifluoroacetic acid were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2. Synthesis

2.2.1. Rhodium(II) Succinate Complex, $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$

The method employed for synthesis of $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ was similar to that used for synthesis of $\text{Rh}_2(\text{cit})_4$.¹⁴ To an aqueous

solution of succinic acid (1.263 g, 10.7 mmol) heated to 70 °C was added dropwise an aqueous solution of $\text{Rh}_2(\text{tfa})_4$ (502.5 mg, 0.76 mmol) under stirring. After being heated almost to dryness, five water aliquots (5 mL) were added and evaporated five times. The green paste was dissolved in ethyl ether and crushed out with petroleum ether, and the green solid was washed with ethyl ether. The yield was 51%. Anal Calc for $[\text{Rh}_2(\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_4)_4(\text{H}_2\text{O})_3]$: C, 26.4; H, 3.6; Rh, 28.3; H_2O , 7.4. Found: C, 25.8; H, 3.9, Rh, 28.1, H_2O , 7.8. Sodium rhodium(II) succinate ($\text{Na}_4[\text{Rh}_2(\text{suc})_4]$) was obtained by neutralization with NaOH standardized solution until equivalent point of $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$.

2.2.2. Maghemite NPs

Maghemite NPs were prepared by the co-precipitation method of Fe^{2+} and Fe^{3+} salts in alkaline medium.^{31,32} A volume of 250 mL of $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.18 mM) and $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.37 mM) solution with 0.5 mL of HCl was added dropwise to 200 mL of NaOH solution (0.75 M) under vigorous stirring. A black precipitate was formed immediately. The magnetite NPs (Fe_3O_4) were washed with water and dispersed in 250 mL of water, and pH was adjusted to 3.5 with HCl. The colloidal dispersion was heated to 100 °C under stirring and oxygen gas was bubbled for five hours. The black colloidal dispersion turned to brown. The maghemite NPs were then dispersed in 100 mL of water and dialyzed (MWCO 16–20 KDa) for 5.5–6 h.

2.2.3. LA Bilayer-Coated Maghemite NPs, MGH-2L

LA-coated maghemite NPs were prepared according to a reported procedure with some modification.³³ It was prepared in two steps with a molar ratio of 4:1 maghemite and LA monolayer. To 50 mL of colloidal dispersion (pH = 4) was added 60 mL of water under vigorous stirring and heated to 60 °C at 700 rpm. Then, 736 mg (3.66 mmol) of LA were gradually added. The temperature was increased to 80 °C and the pH adjusted to 8 with NaOH 0.1 M solution. Immediately, flocculation of NPs occurred, indicating formation of monolayer LA-coated SPIO (MGH-L). The NPs were kept in stirring for 30 minutes and washed five times with deionized water to remove LA excess. The LA bilayer-coated maghemite NPs (MGH-2L) were synthesized similarly. The difference is the constant adjustment of pH around 8 until stable colloidal dispersion is reached. After peptization the dispersion was left to stir at 80 °C for about 1 h, ensuring the complete formation of LA bilayer. Finally, the colloidal dispersion was cooled at room temperature, filtered and dialyzed (MWCO 16–20 KDa) in deionized water for three days. The final pH of dispersion was 7.2.

2.2.4. LA Bilayer/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ -Coated Maghemite NPs, MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$

MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ dispersion was prepared as follows: to 15 mL of MGH-2L dispersion ($[\text{Fe}] = 0.0416 \text{ mol L}^{-1}$

was added 3850 μL of $1.76 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_4[\text{Rh}_2(\text{suc})_4]$ solution. The dispersion was kept at 72 rpm for 24 h. The supernatant was collected by ultrafiltration (MWCO 30 KDa, 10 minutes) for rhodium analysis in order to obtain the adsorption content. The final pH of dispersion was 7.5.

2.2.5. LA Bilayer/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ /BSA-Coated Maghemite NPs, MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ /BSA

MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ /BSA dispersion was prepared by using 5 mL of the previous dispersion and adding 5.5 mg of BSA, which was then kept at 72 rpm for 1 h. The dispersion was ultra-filtrated (MWCO 100 KDa, 5 minutes) and filtrated with a 0.22 μm syringe filter, and the iron concentration determined again. The final pH of dispersion was 6.5.

2.3. Methods

2.3.1. Characterization of $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$

Elemental analyses were carried out on a Thermo CHNO-S 2000 analyzer. Thermogravimetric analysis (TGA) was performed on a DTG-60 Shimadzu system working under a nitrogen flow (50 mL min^{-1} , heating rate of $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ in the 25–900 °C range and standard alumina crucible. Reverse potentiometric titration was performed in triplicate. Firstly, 23 mL of water and 5 mL of $0.01 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ solution were added to 10 mg of the complex. Then alkalized solution (pH = 10.8) was titrated with $0.0094 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ standardized solution until pH = 2.9. Electronic spectra were recorded in the 700–200 nm range on a Perkin Elmer Lambda 45 spectrophotometer in water solution ($[\text{Na}_4[\text{Rh}_2(\text{suc})_4] = 0.23 \text{ mol L}^{-1}$). Infrared spectra were recorded using KBr pellets on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum 400 spectrometer in the 4000–500 cm^{-1} region and resolution of 4 cm^{-1} . Rhodium concentrations were measured in a Perkin Elmer AAnalyst 400 atomic absorption spectrometer equipped with rhodium lamp. The samples were digested with 10% HNO_3 in an aqueous solution. Mass spectrometry (MS) were performed on a high-resolution mass spectrometer (HRMS) Q-Exactive with 0.2% ammonium hydroxide, spray voltage of 3.8 kV and temperature of capillary of 275 °C in a 500–700 scan range.

2.3.2. Adsorption Equilibrium Studies of $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ by MGH-2L

Adsorption experiments were carried out at pH = 7.2 by the batch system: 88, 132, 176, 220, 352, 440 and 660 μL of $\text{Na}_4[\text{Rh}_2(\text{suc})_4]$ (1.64 g L^{-1} , pH = 8.1) standardized solution were added in 50 mL conical flasks containing 0.5 mL of MGH-2L ($[\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3] = 15.1 \text{ g L}^{-1}$, pH = 7.2), yielding 19, 28.7, 38.2, 47.8, 76.5, 95.6 and 143.4 mg of $\text{Na}_4[\text{Rh}_2(\text{suc})_4]$ per gram of maghemite, respectively. The mixtures were agitated in a shaker incubator continuously for 24 h to reach the equilibrium time,

at 25 °C and 150 rpm. After that, the dispersions were ultrafiltered (MWCO 30 KDa) and the supernatants collected for rhodium analysis. Two replicate samples were made for each amount of adsorbate added. The isotherm was obtained by plotting the amount adsorbed, which is expressed in mg of complex per gram of maghemite (Q_{ads}) against the equilibrium concentration (C_e).

2.3.3. NP Colloidal Dispersion

The iron concentration in the colloidal dispersions was determined by the o-phenanthroline method,³⁴ and solution absorbances were measured at 515 nm on a Perkin Elmer Lambda 45 spectrophotometer. The magnetization curves for all samples were obtained at room temperature using a vibrating-sample magnetometer (VSM) on a EV9-VSM, AdMagnets for powders at 25 °C in a range of -18.000 to 18.000 Oe. X-ray powder diffraction (XRD) data were collected on a Shimadzu XRD-6000 diffractometer and a Cu(K α) X-ray source. Diffraction patterns were obtained in a step scan mode in the 2 range from 10° to 80°

and steps of 2 deg min⁻¹. The NP average size was calculated by Sherrer equation, using the full width at half maximum (311) X-ray diffraction peak. The morphology and size of maghemite NPs after coating was performed by transmission electron microscopy (TEM) in a JEOL JEM-2100 operating at 200 kV. The size distribution was obtained with the software ImageJ v.1.50b (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) by measuring more than 250 NPs. The data were adjusted to log normal function. TGA experiments were carried out in a DTG-60 Shimadzu system working under a nitrogen flow (50 mL min⁻¹, heating rate of 10 °C min⁻¹ in the 25–900 °C range and standard alumina crucible. FT-IR spectra were recorded using KBr pellets on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum 400 spectrometer in the 4000–500 cm⁻¹

region and 4 cm⁻¹ resolution. All samples were dried in an oven at 100 °C for three hours. Both hydrodynamic size (D_H) distribution and zeta potential (ζ) measurements of colloidal dispersions were obtained by dynamic light scattering (DLS) with a Malvern Zetasizer Nano ZS90 at 25 °C in triplicate. D_H distribution was measured with the diffusion coefficient (D) in the Stoke-Einstein equation. The was determined by means of electrophoretic mobility using the Smoluchowski equation. Measurements were made in aqueous solution, 0.45% NaCl and DMEM media. Samples were dispersed in solution to obtain a 5.88 mmol L⁻¹ iron content.

2.3.4. Cell Culture and Cytotoxicity Assay

MCF-7 human mammary carcinoma cell line (purchased from American Type Collection, ATCC, USA) and fibroblasts (primary culture of human dental pulp) were cultured in flasks (TPP, Switzerland) with DMEM supplemented with 1% (v/v) penicillin-streptomycin (Sigma) and 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS-Gibco). Cells were maintained at 37 °C in humidified atmosphere with 5% CO₂

and seeded into 96-well culture microplates at a density of 5×10^3 cells/well, and incubated for 24 h to allow cell adhesion. Then, cells were treated with Rh₂(suc)₄ (doses of 50–1200 μ M) in its free form or associated with maghemite NPs coated with

- (1) LA bilayer [MGH-2L/Rh₂(suc)₄, 1.65×10^{15} NP/mL, or
- (2) LA bilayer and BSA [MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA, 1.32×10^{15} NP/mL, for 24 or 48 h.

When the cells were treated with these dispersions of MGH-2L/Rh₂(suc)₄ and MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA, the

concentrations of Rh₂(suc)₄ used were 5, 10 or 20 μ M Maghemite NP, without Rh₂(suc)₄, coated with LA bilayer (MGH-2L), 1.51×10^{15} NP/mL, or with LA and BSA (MGH-2L/BSA), 1.47×10^{15} NP/mL. In the treatments with MGH-2L and MGH-2L/BSA, the same equimolar iron concentrations found for MGH-2L/Rh₂(suc)₄ and MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA were used, i.e., iron concentrations ranged from 0.65 mM (equimolar dose used in 5 μ M of Rh₂(suc)₄ in MGH-2L/Rh₂(suc)₄ dispersion) to 2.6 mM (equimolar dose used in 20 μ M of Rh₂(suc)₄ in MGH-2L/Rh₂(suc) dispersion). Untreated cells correspond to the control group and dimethyl sulfoxide (DMSO) was used for background control. After treatments, cell viability was estimated by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Life Technologies, USA) assay. Cells were incubated with 15 μ L of MTT (5 mg/mL) and 185 μ L of culture medium for two and a half hours at 37 °C in humidified atmosphere with 5% CO₂. Then, the culture solution was removed and 200 μ L of DMSO was added. Absorbance readings were performed by using a spectrophotometer (Spectra-Max M2, Molecular Devices) equipped with a microplate reader at 595 nm wavelength. The relative cell viability (%) was calculated by employment of the formula: $[A]_{\text{treatment}}/[A]_{\text{control}} \times 100$, where $[A]_{\text{treatment}}$ is the absorbance of the tested sample and $[A]_{\text{control}}$ is the absorbance of the control sample (containing only culture medium). The absorbance of treatment groups was normalized with the values of the control group.

2.3.5. Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out using the Prism version 5.0 software. Data were expressed as mean \pm SEM (standard error of mean), and values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. Quantitative variables were tested for normal distribution with the Shapiro-Wilk test. Possible differences between groups were investigated by performing ANOVA or the Kruskal-Wallis test (data not normally distributed), followed respectively by Tukey's or Dunnet's multiple comparison tests.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Rh₂(suc)₄ Characterization

The Rh₂(suc)₄ was isolated as a bluish green powder, very slightly soluble in water, but readily soluble in alkaline

solution according to the following neutralization reaction: $\text{Rh}_2(\text{suc})_4 + 4 \text{NaOH} \rightarrow \text{Na}_4[\text{Rh}_2(\text{suc})_4]$. The complex was characterized by potentiometric titration, UV-Vis analysis, FTIR, TGA and MS. From potentiometric titration experiments, the amount of carboxylic acid groups in the complex provided a ratio of 3.95 ± 0.4 mol H^+ by complex mol, indicating a 4:1 stoichiometry predicted by the proposed formula $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$, which was confirmed by elemental analysis for stoichiometry $[\text{Rh}_2(\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_4)_4(\text{H}_2\text{O})_3]$. The electronic spectra are typical of those of binuclear rhodium(II) carboxylates, and the bands 584, 447, 330 and 291 nm can be attributed to $\pi^*_{(\text{RhRh})} \rightarrow \sigma^*_{(\text{RhRh})}$, $\pi^*_{(\text{RhRh})} \rightarrow \sigma^*_{(\text{RhO})}$, $\sigma_{(\text{RhRh})} \rightarrow \sigma^*_{(\text{RhRh})}$, and $\sigma_{(\text{RhO})} \rightarrow \sigma^*_{(\text{RhRh})}$ transitions,

respectively.³⁵ The MS of $\text{Rh}_2(\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_4)_4$ shows prominent peaks at $m/z = 672.88$ and 554.85 , corresponding to $[\text{Rh}_2(\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_4)_4 - 1\text{H}]^-$ and $[\text{Rh}_2(\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_4)_4 - 1(\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_4)]^-$, respectively. The three intense bands at 1720 , 1583 and 1426 cm^{-1} observed in the FTIR spectrum of $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ can be assigned to ($\nu(\text{C}=\text{O})$) free carboxyl acid group, antisymmetrical ($\nu_a(\text{CO}_2)$) and symmetrical ($\nu_s(\text{CO}_2)$) stretching of the C–O, respectively. The low-intensity band at 1300 cm^{-1} can be attributed to the coupling between C–O stretching and O–H bending ($\delta(\text{O–H})$).³⁶ The value of $\nu_{\text{as}} \text{CO}_2 - \nu_{\text{s}} \text{CO}_2 = 184 \text{ cm}^{-1}$ observed in the spectrum suggests the occurrence of a bridged or chelated bidentate coordination. The TGA curve obtained for the rhodium(II) complex indicates a weight loss of three coordinated water molecules, which is observed in two steps at the temperature around $195 \text{ }^\circ\text{C}$ (DTG peak at $83 \text{ }^\circ\text{C}$) following the decomposition of the complex above $230 \text{ }^\circ\text{C}$ at metal rhodium (DTG shoulder at 232 and peak at 295 , 332 and $345 \text{ }^\circ\text{C}$).

3.2. Characterization of Bare and Coated SPIO

Bare and coated SPIO dispersion were prepared and their characterization was performed by XRD, TEM and FTIR. XRD patterns of SPIO confirm maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) phase with the inverted spinel structure expected for iron ferrite when compared to reference patterns in the literature (Fig. 1).³² The molar ratio of $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ obtained

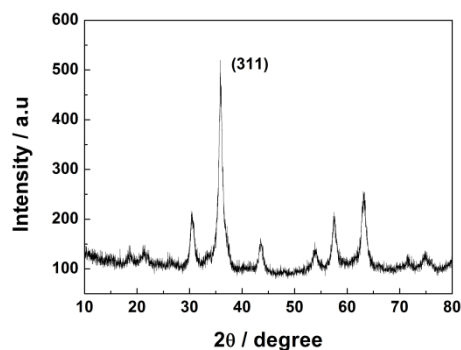


Figure 1. X-ray pattern of maghemite NPs.

by elemental analysis was less than 0.11, which showed an efficient oxidation from magnetite to maghemite phase. The diameter calculated by Sherrer equation at the high-intensity peak (311) was 10 nm.

In the TGA curves (Fig. 2) the weight loss is higher for MGH-2L (23.7%) than for MGH-L (9.5%), which confirms the presence of an LA bilayer on the maghemite surface.³⁷ The complex and BSA adsorption can be seen by the higher weight loss for MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ /BSA (45.8%) and MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ (27.1%) compared to MGH-2L. The more the coating, the greater the weight loss observed.³⁷

The surface modification of maghemite NPs with LA (mono- and bilayer) as well as immobilization of $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ and BSA was evidenced by infrared spectroscopy and TGA. The FTIR spectrum of functionalized NPs showed intense absorptions in the $1530\text{--}1593 \text{ cm}^{-1}$ range and $1408\text{--}1466 \text{ cm}^{-1}$ range assigned to asymmetrical $\nu_{\text{as}}(\text{COO})$ and symmetrical $\nu_{\text{s}}(\text{COO})$ stretching modes of carboxylate groups. The two bands at 2920 cm^{-1} and 2850 cm^{-1} in Figure 3(a) can be attributed to the stretching modes of CH_3 and CH_2 groups, respectively.^{22, 39} The band at 1710 cm^{-1} (Fig. 3(b)) can be attributed to the stretching mode ($\nu(\text{C}=\text{O})$) of carbonyl group due to the surfactant in the second layer.⁴⁰ Although $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ and MGH-2L give characteristic peaks in the same region of the FTIR spectrum, the enlargement at 1583 and 1426 cm^{-1} of observed C–O stretching frequencies indicates the adsorption of $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ onto the MGH-2L surface (Fig. 3(b)).¹⁴ For MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ /BSA (Fig. 3(b)), the band at 1650 cm^{-1} can be assigned to the stretching of the carbonyl group ($\nu(\text{C}=\text{O})$), accepting one hydrogen bond from the amide group (N–H bend in plane) for albumin. The low-intensity band at 1395 cm^{-1} can be assigned to symmetrical stretching ($\nu_{\text{s}}(\text{OCO})$) of free COO^- ; the band at 1527 cm^{-1} can be attributed to N–H bending ($\delta(\text{N–H})$).⁴¹ The characteristic band of the complex at 1583 cm^{-1} is apparent even after BSA adsorption, showing that the complex remains present after the formulation.

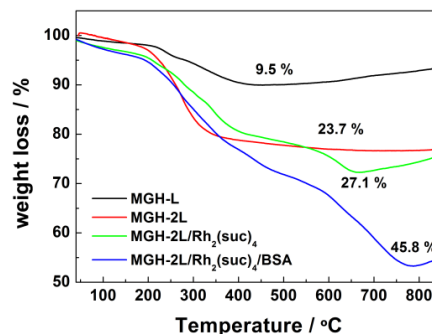


Figure 2. Thermogravimetric curves for MGH-L, MGH-2L, MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ and MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ /BSA (N_2 flow = 50 mL/min , heating rate: $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$).

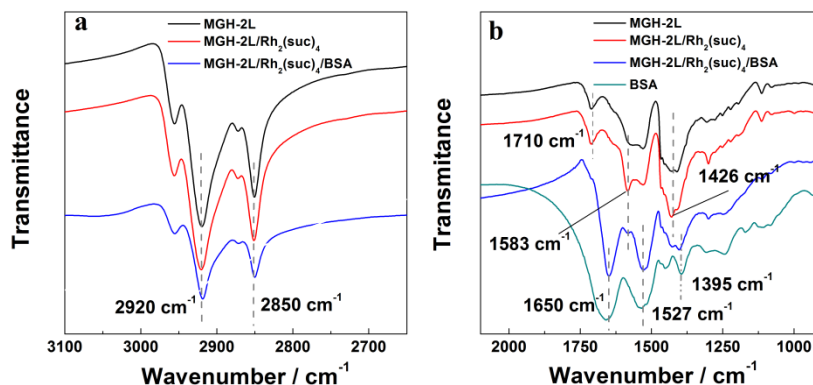


Figure 3. Fourier transform infrared spectra of MGH-2L, MGH-2L/Rh₂(suc)₄, MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA and BSA with the main bands attributed. (a) 3100–2600 cm⁻¹ region and (b) 2100–900 cm⁻¹ region.

The size and morphology of SPIO were observed by TEM, as shown in Figures 4(a) and (c). The magnetic cores maintained a spherical shape, and a nanoparticle mean diameter of 8.5 ± 0.4 for MGH-2L/Rh₂(suc)₄ (Fig. 4(b)), and 9.1 ± 0.4 nm for MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA (Fig. 4(d)) was obtained by a log-normal fit to the frequency data.

The magnetization curves for bare maghemite and surface-modified maghemite are shown in Figure 5. For all samples, the curves indicate superparamagnetic behavior, since no hysteresis was observed.⁴² The saturation of magnetization was 24 emu g⁻¹ to MGH, 22 emu g⁻¹ to MGH-2L, 23 emu g⁻¹ to MGH-2L/Rh₂(suc)₄ and 24 emu g⁻¹ to MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA.

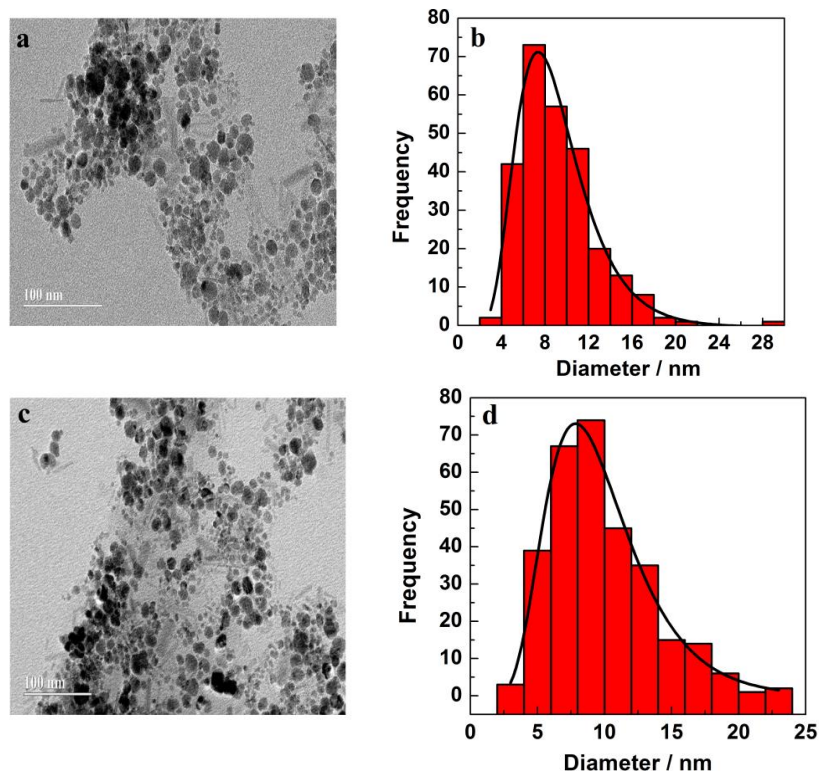


Figure 4. Transmission electron micrographs and corresponding log-normal particle size distributions for LA bilayer/Rh₂(suc)₄-coated maghemite NPs (a and b) and LA bilayer/Rh₂(suc)₄/BSA-coated maghemite NPs (c and d).

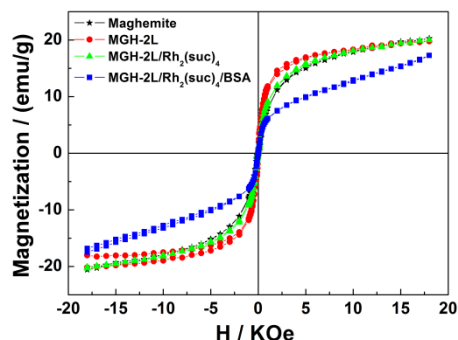


Figure 5. Magnetization curve for maghemite NPs, MGH-2L, MGH-2L/Rh₂(suc)₄ and MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA.

3.3. Adsorption of Rh₂(suc)₄ onto MGH-2L

Equilibrium adsorption isotherms of Rh₂(suc)₄ by MGH-2L were investigated, and adsorption isotherm data follow an evident growing trend (Fig. 6(a)), even at high concentrations of the rhodium complex. The adsorption levels remained constant at virtually all points, approximately $69.41 \pm 2.58\%$, which made MGH-2L an excellent carrier platform for the complex. Physisorption between Rh₂(suc)₄ and the nanosystem is more expected to occur than chemisorption, as was already demonstrated by Rutnakornpituk et al.⁴³ and Zaloga et al.²⁷ in a fatty acid-coated NP system as a carrier of hydrophobic drugs via physical interaction. Thus, the rhodium complex adsorption equilibrium data were better fitted to the Freundlich isotherm as shown in Figure 6(b) (Eq. (1)), $R^2 = 0.985$, rather than the Langmuir isotherm model (Eq. (2)), $R^2 = 0.057$. The Freundlich isotherm parameters, sorption coefficient K and exponential coefficient n , were 0.396 and 0.93, respectively.

$$q_{\text{ads}} = KC_e^{1/n} \quad (1)$$

$$\log q_{\text{ads}} = \log K + \frac{\log C_e}{n} \quad (2)$$

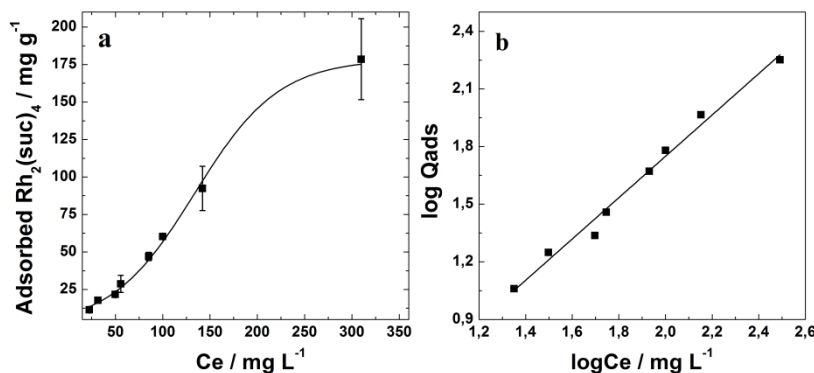


Figure 6. (a) Isotherm adsorption of Rh₂(suc)₄ on MGH-2L dispersion at 25 °C and pH = 7.2. The complex adsorbed (Q_{ads}) expressed in mg of complex per g of maghemite, against the equilibrium concentration (C_e); (b) the linear plot of the Freundlich linearized equation.

3.4. Evaluation of the Colloidal Stability of Functionalized NPs

The D_H is a useful measurement that defines the final biological application of the material studied. Dynamic light scattering size measurements were performed for the four samples: MGH, MGH-2L, MGH-2L/Rh₂(suc)₄ and MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA, in water, saline solution and DMEM culture medium, and the results are shown in Table I. We evaluated different saline concentrations (range from 0.09 to 0.9% v/w), but the material underwent intense agglomeration above 0.45%, so we chose the concentration of 0.45% to perform the studies.

In the aqueous medium, the subtle decrease in D_H with the addition of coatings was observed, as became more apparent from bare SPIO to SPIO with the LA bilayer. The explanation for this unusual behavior resides in aggregate decrease, likely during the synthesis of the MGH-2L. A significant increase in the D_H , in 0.45% sodium chloride solution, was observed for practically all samples except for MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA, which did not have a very significant increase in size. In fact, the D_H of the MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA dispersion was the sample that showed high colloidal stability in the three different media.

The MGH-2L dispersion presented negative ζ due to the carboxyl groups of the surfactant, and it was slightly less negative after functionalization, showing that Rh₂(suc)₄ and BSA in the LA bilayer did not significantly affect the ζ . In saline media, ζ did not change except for MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA, from -33.5 to -19 mV, for which D_H also increased. However, in DMEM, ζ decreased in all dispersions by very close values. This reduction of ζ and increase of D_H indicates destabilization of the dispersions. Pavlin et al.⁴⁴ and Sabuncu et al.⁴⁵ obtained a similar result. This suggests an interaction between components of the culture medium and NPs. One hypothesis described by Sabuncu et al.⁴⁵ is that there is an electrostatic interaction between the charged residues on the surface of proteins present in the culture medium, and negatively charged groups of the ligands. Brewer et al.⁴⁶ reported the same.

Table I. Hydrodynamic size (D_H), polydispersity index (PDI) and zeta potential (ζ) for maghemite NPs, MGH-2L, MGH-2L/Rh₂(suc)₄ and MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA in aqueous media, NaCl 0.45% and DMEM. All solutions were diluted to 5.88 mmol L⁻¹ iron content.

Dispersion	Water		Saline NaCl 0.45 %		DMEM	
	$D_H \pm SD/nm$	PDI /mV	$D_H \pm SD/nm$	PDI /mV	$D_H \pm SD/nm$	PDI /mV
Maghemite	98.7 ± 0.47	56.8 ± 1.9	1,219 ± 112	19 ± 0.31	–	–
MGH-2L	0.255 ± 0.008		0.396 ± 0.04			
	76.4 ± 0.23	-38.7 ± 1.11	418 ± 102	-37 ± 0.34	130 ± 2.1	-13.6 ± 0.57
MGH-2L/Rh ₂ (suc) ₄	0.227 ± 0.004		0.428 ± 0.05		0.234 ± 0.02	
	55.88 ± 0.05	-35.3 ± 1.21	631 ± 120	-35.7 ± 1.6	99 ± 0.62	-14.5 ± 0.58
MGH-2L/Rh ₂ (suc) ₄ /BSA	0.174 ± 0.006		0.407 ± 0.04		0.264 ± 0.04	
	53.76 ± 0.03	-33.5 ± 2.72	91.2 ± 2.8	-19 ± 0.76	84.1 ± 1.6	-14.2 ± 1.51
	0.176 ± 0.011		0.169 ± 0.012		0.393 ± 0.01	

D_H was also evaluated in DMEM media as a function of time (Fig. 7). For all dispersions, D_H increased compared to aqueous media, but did not vary considerably for five days at least. On the last day, D_H was 326 nm, 139 nm and 154 nm for MGH-2L, MGH-2L/Rh₂(suc)₄ and MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA, respectively. D_H highest values indicate destabilization of NPs and subsequent aggregation. Nevertheless, this effect was less pronounced for functionalized dispersions. D_H increase was greater for MGH-2L dispersion than MGH-2L/Rh₂(suc)₄ and MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA dispersions, which means that BSA coating prevents aggregation more than LA bilayer coating.

3.5. Cytotoxicity *In Vitro* Assay

The free Rh₂(suc)₄ was nontoxic to the breast carcinoma MCF-7 cell line at 1000 μM after 24 or 48 h of treatment (Fig. 8). Distinctively, lower doses of Rh₂(suc)₄ (5, 10 and 20 μM), when associated with maghemite NPs coated with LA bilayer (MGH-2L/Rh₂(suc)₄ and BSA (MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA), induced a pronounced decrease in the viability of MCF-7 cells and fibroblasts after 24 and 48 h treatment (Fig. 9). In relation to the period of 24 h, both induced a more cytotoxic effect in breast carcinoma cells than in fibroblasts, showing that MGH-2L/Rh₂(suc)₄ and MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA

enhanced Rh₂(suc)₄ cytotoxicity. However, after 48 h, this cytotoxic effect was similar for both cell types. In summary, we observed that MGH-2L/Rh₂(suc)₄ and MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA were more cytotoxic at higher doses and longer incubation time, especially at 20 μM and after 48 h. Moreover, MGH-2L/Rh₂(suc)₄ and MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA treatments showed higher cytotoxicity in comparison to free Rh₂(suc)₄, and this effect was more pronounced in MCF-7 carcinoma cells than in fibroblasts.⁴⁷

Several studies have demonstrated the cytotoxic effect of several rhodium(II) carboxylates such as acetate, methoxyacetate, propionate, butyrate and citrate in many tumor cell models, including in mice bearing Ehrlich breast carcinoma,^{12–48} in Y-1 adrenocortical carcinoma cells,⁴⁹ in L1210 and K562 leukemia cells,¹¹ and in 4T1 and MCF-7 breast carcinoma.¹⁴ Although these compounds may have a higher chemotherapeutic potential, their clinical use has been limited because they also showed toxicity in normal cells. The cytotoxicity among these rhodium(II) carboxylates, which presented distinct lipophilicity and hydrophilicity characteristics, are attributed to the differences among their properties, such as chain length and hydrophilicity of parts of the molecules.¹²

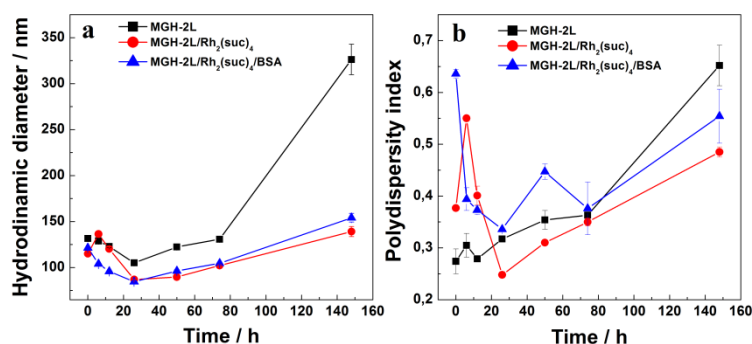


Figure 7. (a) Hydrodynamic size (D_H) and (b) polydispersity index (PDI) for MGH-2L, MGH-2L/Rh₂(suc)₄ and MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA versus time.

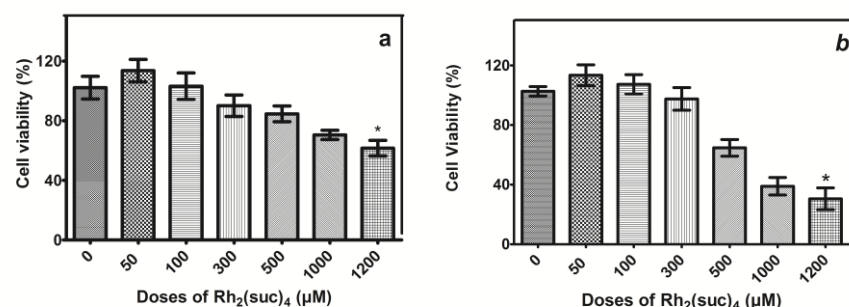


Figure 8. Cytotoxic effect of $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ on breast carcinoma cells (MCF-7) after (a) 24 and (b) 48 hours. Data were expressed as mean \pm standard error. At least two independent experiments were performed in triplicate. Asterisks indicate statistically significant differences determined between cell viability percentages of MCF-7 cells ($*p < 0.0001$).

In this work, we developed a new rhodium(II) complex. Further, we developed a dispersion containing maghemite NPs coated with LA bilayer and BSA. Some studies have demonstrated the cytotoxic efficiency of rhodium(II) complexes associated with magnetic NPs.^{14,50} Notwithstanding this, dispersions based on $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ and maghemite NPs, and its association with BSA and LA, have never been reported before. In this work, we showed that MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ and MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ /BSA treatments showed a higher cytotoxic effect in comparison to free $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$.

It is described that maghemite NPs with appropriate surface functionalization/encapsulation are considered an attractive platform as carriers in DDS, because they can act more specifically in tumor cells⁵¹ due to their high surface area, capacity to pass through tumor cell membrane and retention in the tumor tissue.⁵² Thus, maghemite is suitable for clinical applications due to its magnetic properties and low toxicity.⁵³ Still, BSA has been extensively employed as a drug carrier due to its excellent properties such as aqueous solubility, stability in the pH range of 4–9, preferential uptake in tumor tissue, biodegradability and nontoxicity.^{21,28}

In this context, the association between drugs and functionalized magnetic NPs represents a strategy for enhancement of the therapeutic action of drugs. Therefore, our findings are in agreement with the literature, since we showed that the association of maghemite NPs with $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ enhanced cytotoxic effect in comparison to the free complex. Several antitumor drugs associated with magnetic NPs such as doxorubicin,⁵⁴ methotrexate,⁵⁵ tamoxifen,⁵⁶ paclitaxel⁵⁷ and cisplatin⁵⁸ have presented potential for chemotherapy use.

Our group has been intensely studying other rhodium(II) complexes associated with maghemite NPs. We showed that $\text{Rh}_2(\text{cit})_4$ had enhanced efficacy in carcinoma therapy when it was loaded to maghemite NPs, thus representing a promising strategy to enhance specificity of the rhodium(II) complex and enhanced cytotoxicity to tumor cells.^{14,15,50} This specific effect of the compound on tumor

cells can be explained by the fact that metabolism is faster in tumor cells than in normal cells with regard to iron uptake, due to the presence of more transferrin receptors, which results in higher retention of maghemite NPs by tumor cells.⁵⁹ Thus, the association between antitumor drugs and maghemite NPs represents a promising alternative for minimizing the nonspecific toxicity of rhodium(II) complexes.

In a previous study, we reported that the functionalization of maghemite NPs with BSA successfully provided the production of biocompatible and stable dispersions based on $\text{Rh}_2(\text{cit})_4$.⁵⁰ Here, MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ /BSA, our albumin-based dispersion, was able to stabilize our magnetic NPs and was nontoxic for MCF-7 cells. This protein is an attractive DDS approach, since it is the most abundant plasma protein. Albumin-based DDSs have been considered a promising strategy for treating cancer,⁶⁰ especially because of the high capacity of this protein to bind to various drugs and also because it is pharmacologically safe.²¹ Moreover, coating with the LA bilayer was also able to stabilize our magnetic NPs and enhance the cytotoxic effect on breast carcinoma cells. MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ and MGH-2L/ $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ /BSA dispersions induced similar cytotoxicity when compared to the same treatment time and cell type. With regard to the control groups, after 24 h, we observed that MGH-2L was more cytotoxic than MGH-2L/BSA (at iron doses of 1.3 and 2.6 μM) in MCF-7 cells. However, after 48 h, this effect was similar when considered at the same doses.

In another study, a hybrid-coated SPIO system was developed and showed great biocompatibility with primary human endothelial cells. Furthermore, it enhanced the *in vitro* therapeutic potential of mitoxantrone in comparison to the free form of this drug.²⁷ Here, we developed a similar SPIO system which was associated with $\text{Rh}_2(\text{suc})_4$ and demonstrated that this dispersion reduced the viability in MCF-7 breast carcinoma cells more efficiently than in normal fibroblasts. Thus, our results are in agreement with Zaloga et al.²⁷ since our SPIO system induced cytotoxicity.

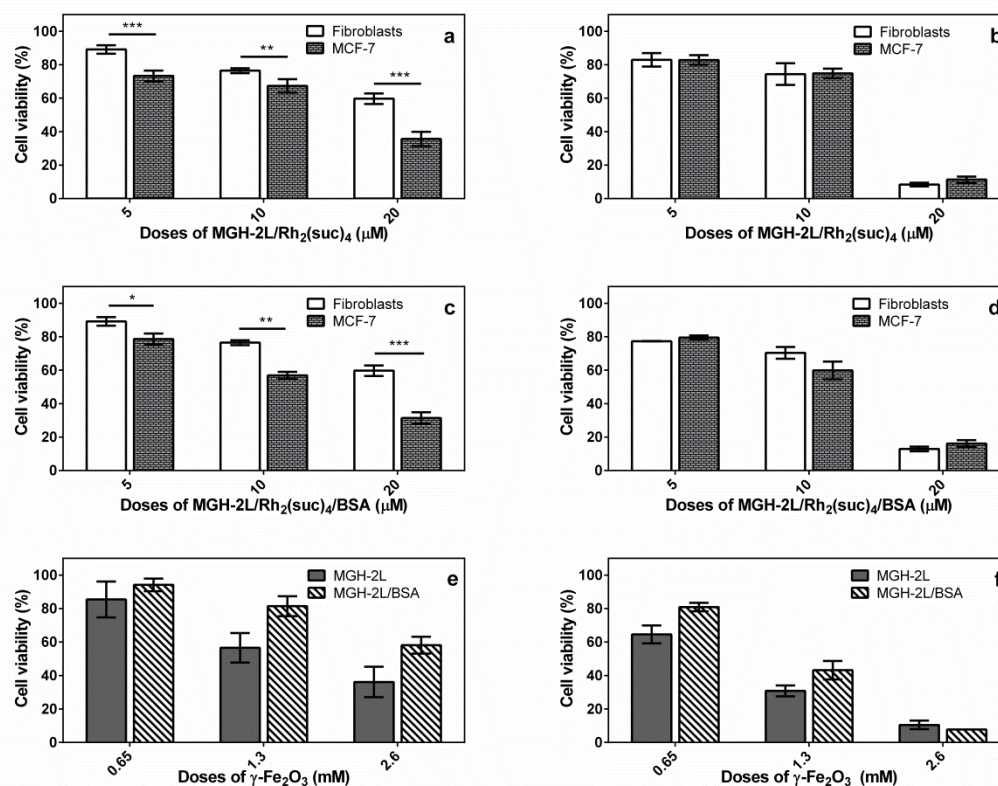


Figure 9. Cytotoxic effect of maghemite NP associated with Rh₂(suc)₄ and coated with LA bilayer (MGH-2L/Rh₂(suc)₄ or with LA bilayer and BSA (MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA) in breast carcinoma cells (MCF-7) and in fibroblasts (primary culture of human dental pulp) after 24 and 48 hours. Cells were treated for (a) 24 and (b) 48 h with MGH-2L/Rh₂(suc)₄; (c) 24 and (d) 48 h with MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA and (e) 24 and (f) 48 h with MGH-2L (LA bilayer coated-maghemite NP) and MGH-2L/BSA (BSA/LA-coated maghemite NP). The concentrations of Rh₂(suc)₄ used for treatments with MGH-2L/Rh₂(suc)₄ and MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA were 5, 10 and 20 μM, which correspond to 0.65, 1.3 and 2.6 mM iron oxide doses, respectively. MGH-2L and MGH-2L/BSA were used as negative controls and adopted the same equimolar iron doses as used in MGH-2L/Rh₂(suc)₄ and MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA treatment groups. Data were normalized with the control (cells without treatment) and expressed as mean ± standard error. At least two independent experiments were performed in triplicate. Asterisks indicate statistically significant differences determined between cell viability percentages of fibroblasts and MCF-7 cells (**p* < 0.05, ***p* < 0.005 and ****p* < 0.0001).

It has been reported in the literature that LA presents antimicrobial,⁶¹ cytostatic and cytotoxic activity in alga and cyanobacterium⁶² and in colon cancer cells.⁶³ In the present study, we evaluated the cytotoxic effect of MGH-2L dispersion, and it was used as a control group. We noticed that MGH-2L was toxic for MCF-7 cells. In another work, SPIO-based systems without coating were shown to be non-toxic.²⁴ Thus, the cytotoxic effect found for MGH-2L may be related to the cytotoxicity of the LA. This fatty acid presented the capacity to induce apoptosis by reducing glutathione levels, increasing the generation of superoxide radicals, and causing arrest in the S and G2/M phases of the cell cycle in intestinal cells.⁶³ Moreover, LA was used together with recombinant human tumor necrosis factor (rh TNF) to enhance the antitumor effect in mice.⁶⁴ Therefore, our findings are in agreement with previous

reports, since MGH-2L presents LA and also showed a cytotoxic effect.

4. CONCLUSION

In this work we prepared a LA/BSA hybrid-coated SPIO and evaluated its association with Rh₂(suc)₄ for desirable physicochemical properties and colloidal stability in clinical applications. Results obtained through various techniques confirm that the nanosystem had a high adsorption rate of Rh₂(suc)₄, ca. 70% and retained the saturation magnetization, which determines a bio-relevant system for efficient use as magnetic carriers.

We also demonstrated that MGH-2L/Rh₂(suc)₄ and MGH-2L/Rh₂(suc)₄/BSA reduced the viability of MCF-7 breast carcinoma cells more efficiently than free Rh₂(suc)₄. Interestingly, this effect was more pronounced in MCF-7

than in fibroblast cells. This fact indicated that these dispersions have an excellent potential for application in DDSs and, thus, they should be considered as a platform to enhance Rh₂(suc)₄ cytotoxicity, specifically in breast carcinoma.

Acknowledgments: The authors are grateful for financial support from the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) and Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF). We are grateful to Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LaCEM) for MS analysis.

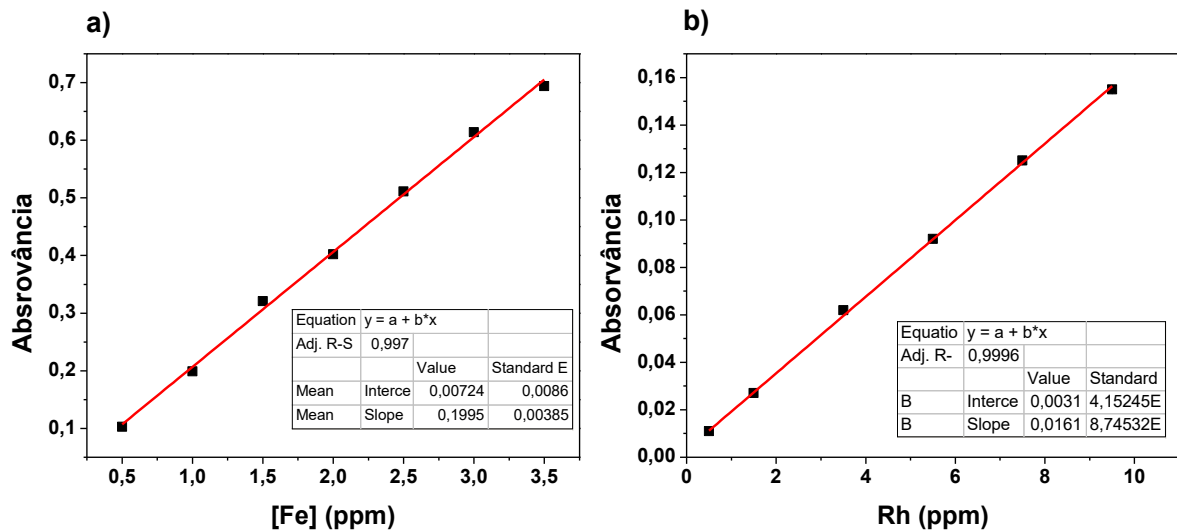
References and Notes

- B. Rosenberg, L. V. Camp, and T. Krigas, *Nature* 205, 698 (1965).
- N. J. Wheate, S. Walker, G. E. Craig, and R. Oun, *Dalton Trans.* 39, 8113 (2010).
- S. Medici, M. Peana, V. M. Nurchi, J. I. Lachowicz, G. Crisponi, and M. A. Zoroddu, *Coordin. Chem. Rev.* 284, 329 (2015).
- W. M. Motswainyana and P. A. Ajibade, *Adv. Chem.* 2015, 1 (2015).
- S. Hirohara, Y. Kawasaki, R. Funasako, N. Yasui, M. Totani, H. Alitomo, J. Yuasa, T. Kawai, C. Oka, M. Kawaichi, M. Obata, and M. Tanihara, *Bioconjugate Chem.* 23, 1881 (2012).
- A. R. Azzouzi, S. Lebdai, F. Benzaghrou, and C. Stief, *World J. Urol.* 33, 937 (2015).
- A. E. Burgos, C. K. Y. A. Okio, and R. D. Sinisterra, *Química Nova* 35, 762 (2012).
- H. T. Chifotides and K. R. Dunbar, *Multiple Bonds Between Metal Atoms*, Springer Science and Business Media, New York (2005).
- A. Erck, E. Sherwood, J. L. Bear, and A. P. Kimbalp, *Cancer Res.* 36 (1976).
- R. A. Howard, A. P. Kimball, and J. L. Bear, *Cancer Res.* 39, 2568 (1979).
- A. R. De Souza, R. Najjar, S. Glikmanas, and S. B. Zyngier, *J. Inorg. Biochem.* 64, 1 (1996).
- N. Katsaros and A. Anagnostopoulou, *Crc. Cr. Rev. Oncol-Hem.* 42, 297 (2002).
- H. T. Chifotides, J. M. Koomen, M. Kang, S. E. Tichy, K. R. Dunbar, and D. H. Russell, *Inorg. Chem.* 43, 6177 (2004).
- M. L. Carneiro, E. S. Nunes, R. C. Peixoto, R. G. Oliveira, L. H. Lourenço, I. C. R. da Silva, A. R. Simioni, A. C. Tedesco, A. R. de Souza, Z. G. M. Lacava, and S. N. Bão, *J. Nanobiotechnol.* 9, 11 (2011).
- R. C. A. Peixoto, A. L. Miranda-Vilela, J. S. Filho, M. L. B. Carneiro, R. G. S. Oliveira, M. O. Da Silva, A. R. De Souza, and S. N. Bão, *Tumor Biol.* 36, 3325 (2015).
- M. L. B. Carneiro, R. C. A. Peixoto, G. A. Joanitti, R. G. S. Oliveira, L. A. M. Telles, A. L. Miranda-Vilela, A. L. Bocca, L. M. S. Vianna, I. C. R. Da Silva, A. R. De Souza, Z. G. M. Lacava, and S. N. Bão, *J. Nanobiotechnol.* 11, 4 (2013).
- S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. V. Elst, and R. N. Muller, *Chem. Rev.* 108, 2064 (2008).
- D. H. Everett, *Basic Principles of Colloid Science*, Royal Society of Chemistry, London (1988).
- A. M. G. C. Dias, A. Hussain, A. S. Marcos, and A. C. A. Roque, *Biotechnol. Adv.* 29, 142 (2011).
- S. Singh and H. S. Nalwa, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7, 3048 (2007).
- A. O. Elzoghby, W. M. Samy, and N. A. Elgindy, *J. Control. Release* 157, 168 (2012).
- D. Li, D. Jiang, M. Chen, J. Xie, Y. Wu, S. Dang, and J. Zhang, *Mater. Lett.* 64, 2462 (2010).
- J. B. Mamani, A. J. Costa-Filho, D. R. Comejo, E. D. Vieira, and L. F. Gamarra, *Mater. Charact.* 81, 28 (2013).
- P. Pradhan, J. Giri, R. Banerjee, J. Bellare, and D. Bahadur, *J. Magn. Magn. Mater.* 311, 282 (2007).
- J. L. Kinderlerer, *Int. Biodeterioration and Biodegradation* 33, 345 (1994).
- J. Zaloga, M. Pöttler, G. Leitinger, R. P. Friedrich, G. Almer, S. Lyer, E. Baum, R. Tietze, R. Heimke-Brinck, H. Mangge, F. Dörje, F. Lee, and C. Alexiou, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 101, 152 (2016).
- J. Zaloga, C. Janko, J. Nowak, J. Matuszak, S. Knaup, D. Eberbeck, R. Tietze, H. Unterweger, R. P. Friedrich, S. Duerr, R. Heimke-Brinck, E. Baum, I. Cicha, F. Dörje, S. Odenbach, S. Lyer, G. Lee, and C. Alexiou, *Int. J. Nanomed.* 9, 4847 (2014).
- F. Kratz, *J. Control. Release* 132, 171 (2008).
- S. A. Johnson, H. Hunt, and H. Neumann, *Inorg. Chem.* 2, 960 (1963).
- J. L. Bear, J. Kitchens, and M. R. Willcott, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 33, 3479 (1971).
- Y. S. Kang, S. Risbud, J. F. Rabolt, and P. Stroeve, *Chem. Mater.* 8, 2209 (1996).
- G. L. S. Sun, H. Zeng, D. B. Robinson, S. Raoux, P. M. Rice, S. X. Wang, and G. Li, *J. Am. Chem. Soc.* 126, 273 (2004).
- L. Fu, V. P. Dravid, and D. L. Johnson, *Appl. Surf. Sci.* 181, 173 (2001).
- G. H. Jeffery, J. Basset, J. Mendham, and R. C. Denney, *Vogel's Textbook of Quantitative Chemical Analysis*, Longman Scientific and Technical, New York (1989).
- J. G. Norman and H. J. Kolari, *J. Am. Chem. Soc.* 100, 791 (1978).
- M. Suzuki and T. Shimanouchi, *J. Mol. Spectrosc.* 28, 394 (1968).
- L. Shen, P. E. Laibinis, and T. A. Hatton, *J. Magn. Magn. Mater.* 194, 37 (1999).
- L. Li, K. Y. Mak, C. W. Leung, K. Y. Chan, W. K. Chan, W. Zhong, and P. W. T. Pong, *IEEE T. Mag.* 48, 3299 (2012).
- S. Zhao, D. K. Lee, C. W. Kim, H. G. Cha, Y. H. Kim, and Y. S. Kang, *Bulletin of the Korean Chemical Society* 27, 237 (2006).
- K. Yang, H. Peng, Y. Wen, and N. Li, *Appl. Surf. Sci.* 256, 3093 (2010).
- J. Grdadolnik and Y. Maréchal, *Biopolymers* 62, 40 (2001).
- A. H. Lu, E. L. Salabas, and F. Schüth, *Angew. Chem. Int. Edit.* 46, 1222 (2007).
- M. Rutnakornpituk, S. Meerod, B. Boontha, and U. Wichai, *Polymer* 50, 3508 (2009).
- M. Pavlin and V. B.regar, *Dig. J. Nanomater. Bios.* 7, 1389 (2012).
- A. C. Sabuncu, J. Grubbs, S. Qian, T. M. Abdel-Fattah, M. W. Stacey, and A. Beskok, *Colloid. Surface B* 95, 96 (2012).
- S. H. Brewer, W. R. Glomm, M. C. Johnson, M. K. Knag, and S. Franzen, *Langmuir* 21, 9303 (2005).
- Y. L. Zhao and H. S. Nalwa (eds.), *Nanotoxicology: Interactions of Nanomaterials with Biological Systems*, American Scientific Publishers, Los Angeles (2007).
- A. R. De Souza, E. P. Coelho, and S. B. Zyngier, *Eur. J. Med. Chem.* 41, 1214 (2006).
- S. Zyngier, E. Kimura, and R. Najjar, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 22, 397 (1989).
- E. S. Nunes, M. L. B. Carneiro, R. G. S. De Oliveira, S. N. Bão, and A. R. De Souza, *J. Nanopart. Res.* 15, 1683 (2013).

51. M. Namdeo, S. Saxena, R. Tankhiwale, M. Bajpai, Y. Mohan, and S. Bajpai, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 8, 3247 (2008).
52. H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, *J. Control. Release* 65, 271 (2000).
53. L. Douziech-Eyrolles, H. Marchais, K. Hervé, E. Munnier, M. Soucé, C. Linassier, P. Dubois, and I. Chourpa, *Int. J. Nanomedicine* 2, 541 (2007).
54. B. Asadishad, M. Vossoughi, and I. Alamzadeh, *Biotechnol. Lett.* 32, 649 (2010).
55. N. Kohler, C. Sun, J. Wang, and M. Zhang, *Langmuir* 21, 8858 (2005).
56. E. C. Dreaden, S. C. Mwakwari, Q. H. Sodji, A. K. Oyelere, and M. A. El-Sayed, *Bioconjug. Chem.* 20, 2247 (2009).
57. G. Ma, J. Yang, L. Zhang, and C. Song, *Anticancer Drugs* 21, 261 (2010).
58. M. Kettering, H. Zorn, S. Bremer-Streck, H. Oehring, M. Zeisberger, C. Bergemann, R. Hergt, K. J. Halbhuber, W. A. Kaiser, and I. Hilger, *Phys. Med. Biol.* 54, 5109 (2009).
59. J. C. Kwok and D. R. Richardson, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42, 65 (2002).
60. M. T. Larsen, M. Kuhlmann, M. L. Hvam, and K. A. Howard, *Mol. Cell. Ther.* 4, 3 (2016).
61. J. J. Kabara, D. M. Swieczkowski, A. J. Conley, and J. P. Truant, *Antimicrob. Agents Ch.* 2, 23 (1972).
62. J. Wu, Y. Chiang, H. Huang, and W. Jane, *Aquat. Toxicol.* 80, 338 (2006).
63. J. K. Fauser, G. M. Matthews, A. G. Cummins, and G. S. Howarth, *Chemotherapy* 59, 214 (2013).
64. E. Amtmann and G. Sauer, *Int. J. Cancer* 45, 1113 (1990).

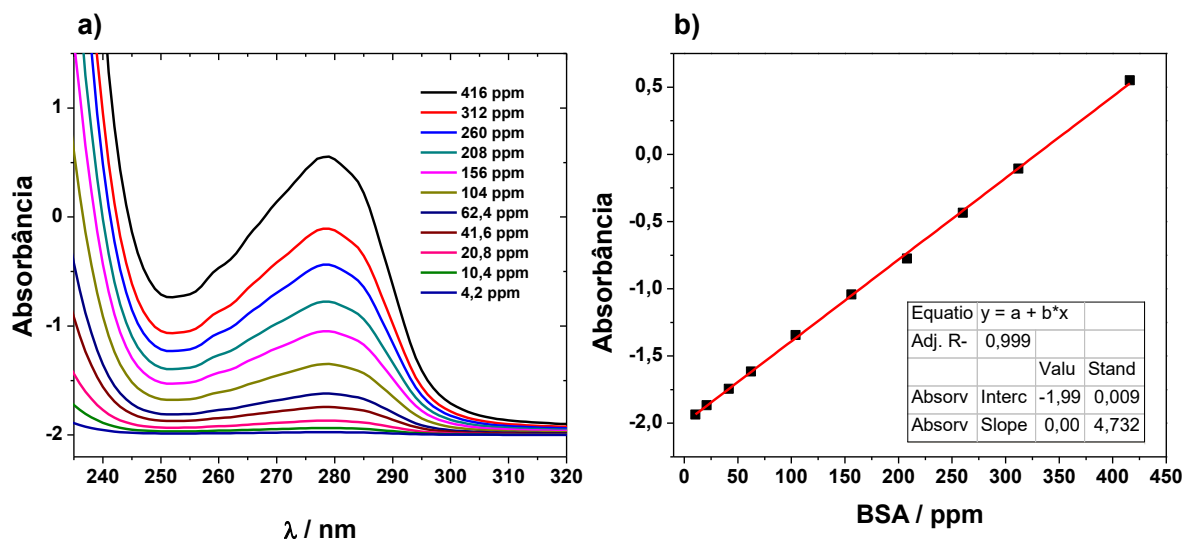
Received: 14 December 2016. Accepted: 13 May 2017.

ANEXO A



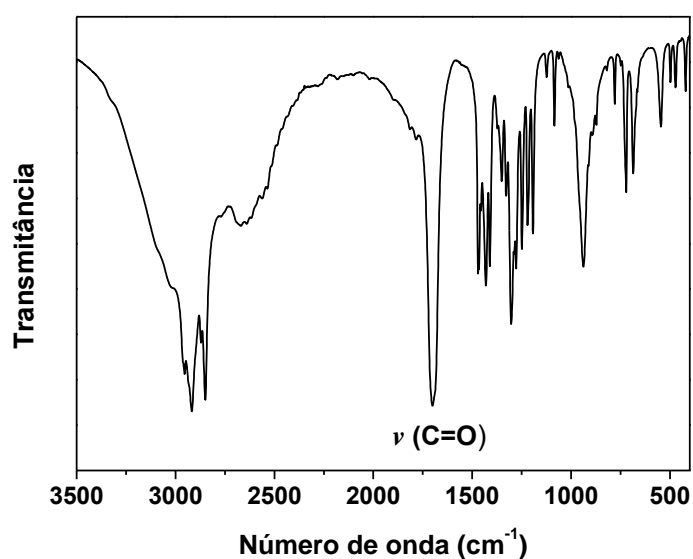
Curvas de calibração para determinação da a) [Fe] por UV-VIS, e b) [Rh] por meio de AAS.

ANEXO B



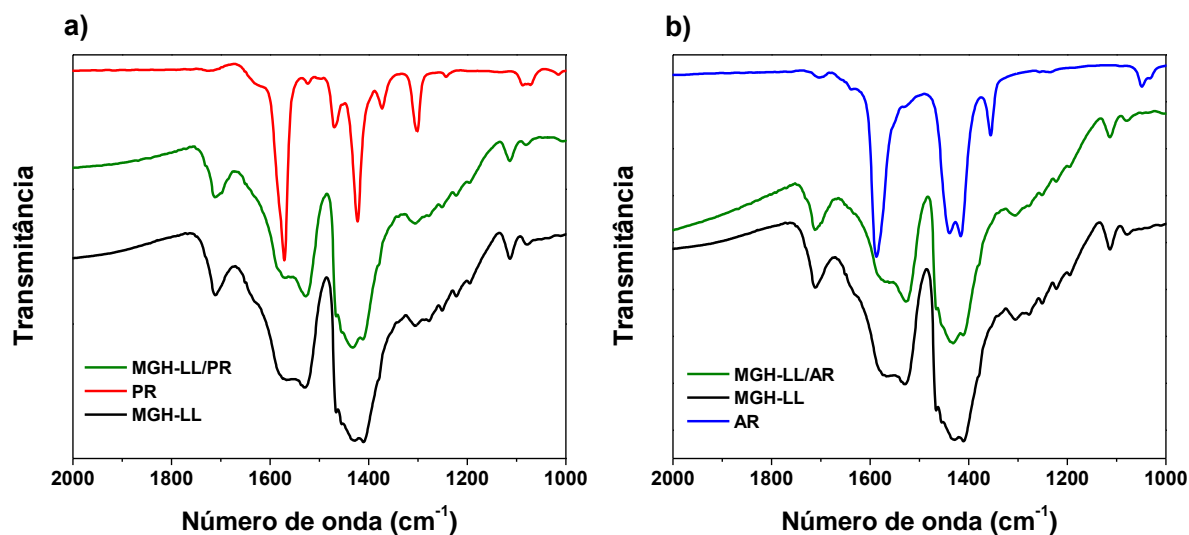
a) Espectros na região do Ultravioleta obtidos para uma solução de BSA de 230 a 320 nm, e b) curva de calibração obtida colocando a absorbância máxima registrada em 279 nm em função da concentração de BSA. Os valores obtidos para a água de lavagem de MGH-LL/SR/BSA ficaram abaixo de 10 ppm nesta curva.

ANEXO C



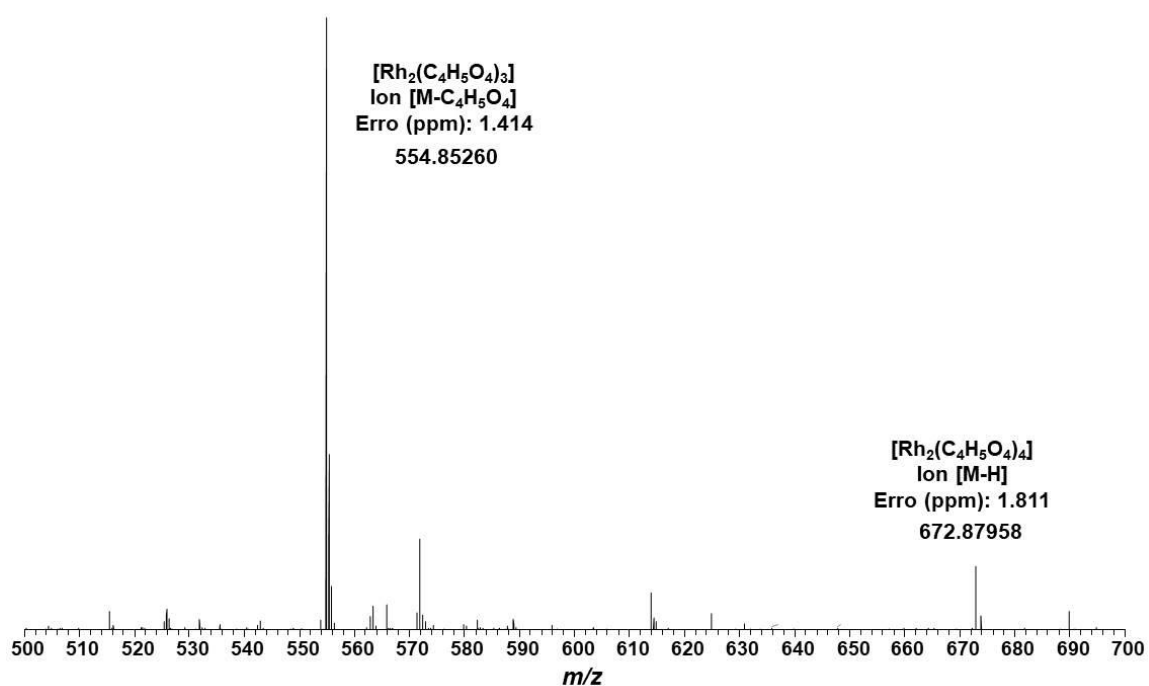
Espectro de infravermelho obtido para LA destacando a banda de estiramento $\nu(\text{C=O})$ em 1700 cm⁻¹.

ANEXO D



Espectros de infravermelho para a) MGH-LL-PR com MGH-LL e PR, e para b) MGH-LL/AR com MGH-LL e AR. As bandas mais intensas de AR e PR não foram vistas nos espectros de MGH-LL/AR e MGH-LL-PR, respectivamente.

ANEXO E



Espectro de Massas para o SR ($\text{Rh}_2(\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_4)_4$). Os picos em $m/z = 672,88$ e $554,85$ correspondem a $[\text{Rh}_2(\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_4)_4 - 1\text{H}]^-$, e $[\text{Rh}_2(\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_4 - 1(\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_4)]$, respectivamente.