



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

JOSÉ VITOR DE AGUIAR VIEIRA

**NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS COM PRECURSORES
ORGANOMETÁLICOS TIPO SILOXANO COMO CARREADORES PARA
FÁRMACOS – BIOCONJUGADOS DE CLORAMBUCILA**

BRASÍLIA, DF

2014

JOSÉ VITOR DE AGUIAR VIEIRA

**NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS COM PRECURSORES
ORGANOMETÁLICOS TIPO SILOXANO COMO CARREADORES PARA
FÁRMACOS – BIOCONJUGADOS DE CLORAMBUCILA**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada
como requisito parcial para obtenção do grau de
Farmacêutico na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Alexandre Chaker

BRASÍLIA, DF

2014

JOSÉ VITOR DE AGUIAR VIEIRA

**NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS COM PRECURSORES
ORGANOMETÁLICOS TIPO SILOXANO COMO CARREADORES PARA
FÁRMACOS – BIOCONJUGADOS DE CLORAMBUCILA**

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Juliano Alexandre Chaker
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Dra. Graziella Anselmo Joanitti
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Dr. Marcelo Henrique Sousa
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2014

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Pedro e Maria, pelo apoio dado neste período, e por proporcionar um ambiente agradável de estudos em todo o desenvolvimento de meu curso.

Quero também agradecer ao meu orientador Juliano Alexandre Chaker, por todo o incentivo e confiança no meu trabalho, e por toda a colaboração dada no decurso desse trabalho, muitas vezes atendendo fora do horário normal de expediente, mas que foi de extrema importância para o alcance dos objetivos propostos, e por todo o seu conhecimento e vontade de ensinar.

Também deixo um muito obrigado a todos os colegas de laboratório, pelas trocas de conhecimentos e auxílio em alguns procedimentos.

Por fim, e não menos importante, um agradecimento muito especial à minha querida e amada namorada Geises Bel Costa Santos, por todo o apoio e incentivo dado ao longo desses anos, pelo amor, paciência, carinho e pela força nos diversos sacrifícios passados ao meu lado. Agradeço imensamente à compreensão e cumplicidade em todos os momentos, e pela ajuda muito importante em diversas análises laboratoriais.

RESUMO

O câncer é um evidente problema de saúde pública cujos tratamentos convencionais resultam em efeitos adversos pronunciados. Nesse contexto, nota-se a necessidade de aplicação de estratégias alternativas para o tratamento oncológico. Uma dessas estratégias é o desenvolvimento de nanomateriais como carreadores de fármacos, visando o aumento da especificidade ao alvo de ação e a redução dos efeitos colaterais dos anticancerígenos. Com tal motivação, realizou-se um estudo comparativo de nanopartículas (NPs) de óxido de ferro recobertas com diferentes precursores tipo siloxanos. Buscou correlacionar a estabilidade da solução coloidal, a nanoestrutura e características superficiais com a porcentagem de incorporação do bioativo Clorambucil. Para atingir os objetivos em uma primeira etapa, sintetizou-se nanopartículas magnéticas de óxido de ferro pela rota de coprecipitação alcalina e realizou-se em uma segunda etapa, a funcionalização da superfície, via reações de hidrólise e condensação de seis diferentes precursores organometálicos, do tipo alcoxissilanos. Na terceira etapa, realizou-se a incorporação do anticancerígeno Clorambucil, e a quantificação da funcionalização com o bioativo, correlacionou-se as características da superfície com diferentes grupamentos orgânicos externos, com a porcentagem de fármaco incorporado. Os ajustes das curvas de espalhamento de raios X a baixo ângulo de suspensões das nanopartículas de óxido de ferro revelaram um raio de giro em torno de 11 nm, que variou em função do tipo do recobrimento utilizado. Foi possível identificar pelos ajustes da curvas experimentais de SAXS das suspensões coloidais um regime tipo fractal, no qual partículas maiores coexistem com partículas menores. Confirmou-se a existência dos precursores organometálicos identificando a absorção do modo vibracional de estiramento da ligação Si-O com o uso da espectroscopia na região do infravermelho. Foi verificado também pela mesma técnica a oxidação da superfície das nanopartículas de óxido de ferro com a funcionalização, indicando que a reação de condensação ocorreu e que os precursores organometálicos deixam os grupamentos orgânicos voltados para interface da suspensão. De fato resultados de espectroscopia de emissão atômica por plasma indutivamente acoplado revelaram funcionalizações superiores a 96% com os precursores organometálicos utilizados no estudo. Os resultados de carga de superfície das suspensões coloidais das nanopartículas de óxido de ferro, em pH = 7,0, obtidas pelo espalhamento de luz visível, revelaram

valores de cargas superficiais diferentes dependendo do recobrimento utilizado na funcionalização. As propriedades magnéticas foram estudadas objetivando a determinação do campo coercivo e magnetização de saturação com função dos diferentes recobrimentos realizados nas nanopartículas secas. Observou-se que as partículas recobertas com precursores alcoxissilanos contendo o grupamento do tipo amina secundária e contendo o grupamento metacrilato apresentaram maiores valores de magnetização de saturação a 300 K. As absorbâncias UV-Vis em 320 nm das absorções relativas ao Clorambucil mostraram baixas taxas de funcionalização do bioativo. A nanopartícula que mostrou maior taxa de funcionalização do bioativo foi a nanopartícula de óxido de ferro recoberta com o precursor alcoxissilano contendo o grupamento tipo amina primária.

Palavras-chave: Nanopartículas, sol-gel, alcoxissilanos, carga de superfície, SAXS, Clorambucil.

ABSTRACT

Cancer is an evident public health problem and conventional treatments result in pronounced adverse effects. In this context, the creation of alternative measures for cancer treatment is required. One such measure is the development of nanomaterials as drug carriers, which provide the increased of specificity and the reduction of adverse effects of anticancer. Based on this, performed a comparative study of nanoparticles (NPs) of iron oxide coated with different siloxanes type precursors. Search correlate the stability of the colloidal solution, the nanostructure and surface characteristics, with the percentage of incorporation of bioactive Chlorambucil. To achieve the aim, in a first stage, was synthesized magnetic nanoparticles of iron oxide in the alkaline coprecipitation route and in a second step, proceeded the surface functionalization through the hydrolysis and condensation reactions of six different organometallic precursors type alkoxy silanes. In the third step, there was the incorporation of anticancer Chlorambucil, and quantification of functionalization with bioactive, correlated with surface characteristics different external organic groups, with the percentage of drug incorporated. The adjustments of the SAXS for suspensions of nanoparticles of iron oxide revealed a turning radius of around 11 nm, which varied depending on the type of coating used. Were identified by adjustments of experimental SAXS curves of colloidal suspensions a mass fractal regime, in which larger particles coexisting with smaller particles. Confirmed the existence of the organometallic precursors related the absorption of the stretching vibration mode of the Si-O bond with the use of infrared spectroscopy. Surface oxidation of the iron oxide nanoparticles with the functionalization was also found by the same technique, indicating that the condensation reaction occurred and organometallic precursors leave the organic groups facing suspension interface. In fact, results of atomic emission spectroscopy by inductively coupled plasma showed higher functionalizations to 96% with the organometallic precursors used in the study. The results of the surface charge of the colloidal suspensions of nanoparticles of iron oxide at pH = 7.0 obtained by the scattering of visible light, revealed different values depending on the coating surface charges used in the functionalization. The magnetic properties were studied to determine the coercive field and saturation magnetization with light of different coatings performed in the dry nanoparticles. It was observed that the coated particles alkoxy silane precursors containing the

grouping of the secondary amine type and containing the grouping methacrylate showed higher saturation magnetization at 300 K. The UV-Vis absorbance at 320 nm absorptions on the Chlorambucil showed low levels of functionalization bioactive. The nanoparticle showed that the highest rate of functionalization was aa bioactive nanoparticle of iron oxide coated with alkoxy silane precursor containing the primary amine type grouping.

Keywords: Nanoparticles, sol-gel, alkoxy silanes, surface charge, SAXS, Chlorambucil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Fórmula estrutural do composto Clorambucil	04
Figura 02. Mecanismo de ação dos alquilantes	05
Figura 03. Metabolização hepática do Clorambucil	06
Figura 04. Representação de uma nanopartícula com a camada superficial de recobrimento	10
Figura 05. Representação do recobrimento de nanopartícula com precursor organometálico tipo alcoxissilano	12
Figura 06. Processo de síntese de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro por coprecipitação alcalina	17
Figura 07. Fórmulas estruturais dos diferentes precursores alcoxissilanos usados para modificação superficial de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro	18
Figura 08. Diagrama esquemático representando o regime de fractal de massa encontrado nos sistemas estudados	23
Figura 09. Curvas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo para nanopartículas recobertas superficialmente com diferentes precursores alcoxissilanos	24
Figura 10. Espectro na região do Infravermelho para amostras de nanopartículas sem recobrimento nanopartículas revestidas com diferentes precursores alcoxissilanos	26
Figura 11. Valores de potencial zeta em função da variação do pH para amostras de ferrofluidos recobertas com APTES e MPTES e comparada com a mesma variação para o ferro fluído sem recobrimento	29
Figura 12. Curvas M. vs H. para máxima saturação a 300 K (a) e 5 K (b) de NPs recobertas com precursores alcoxissilanos	31
Figura 13. Curvas de histerese magnéticas para as nanopartículas recobertas com diferentes precursores alcoxissilanos em 300 K (a) e 5 K (b)	32
Figura 14. Curva de calibração para CLB em álcool	34

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Nome IUPAC dos precursores alcoxissilanos usados nos recobrimentos das nanopartículas de óxido de ferro e suas respectivas abreviações	15
Tabela II. Ajustes teóricos das curvas experimentais de SAXS de acordo com a equação de BEAUCAGE, de suspensões de nanopartículasde óxido de ferro recobertas com diferentes precursores alcoxissilanos	25
Tabela III. Atribuições das absorções na região do infravermelho de amostras de nanopartículas de óxido de ferro recobertas recobertas com diferentes precursores.....	26
Tabela IV. Porcentagem de silício no sobrenadante.....	27
Tabela V. Valores de potencial zeta e tamanho para ferritas funcionalizadas com diferentes recobrimentos (medidas em pH = 6,5).....	30
Tabela VI. Valores de máxima magnetização das nanopartículas magnéticas recobertas com diferentes precursores alcoxissilanos	31
Tabela VII.. Valores para coercividade das nanopartículas magnéticas recobertas com diferentes precursores alcoxissilanos	33
Tabela VIII. Absorbância das nanopartículas incorporadas ao CLB e respectivas porcentagens de incorporação do bioativo	34

LISTA DE ABREVIATURAS

AES - Atomic emission spectroscopy

APTES - 3-(aminopropil)-trimetoxissilano

CLB – Clorambucil

CMTMS - (Clorometil)-trimetoxissilano

FTIR – Fourier Transform Spectroscopy (Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier)

ICP-OES - Espectroscopia de emissão atômica

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

IV – Infravermelho

MAPTES - 3-(metilaminopropil)-trimetoxissilano

MAV - Magnetômetro de amostra vibrante

META - 3-(trimetoxissilil)propil-metacrilato

MPTES - 3(-mercaptopropil)-trimetoxissilano

NPM – Nanopartícula Magnética

NPs - Nanopartículas

OMS – Organização Mundial da Saúde

RES – Sistema Retículo-endotelial

SAXS - Espalhamento de Raios-X a baixo ângulo

TEOS - (Tetraetil)-ortossilicato

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

VSM – Vibrating sample magnetometer

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais sobre o câncer	01
1.2. Tratamentos convencionais	01
1.3. Antineoplásicos e efeitos adversos	02
1.3.1. Clorambucil (CLB)	03
1.4. Nanotecnologia	06
1.4.1. Nanomateriais promissores para aplicação na saúde	07
1.4.2. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro	08
1.5. Procedimentos de obtenção de nanopartículas	09

2. JUSTIFICATIVA	13
-------------------------------	-----------

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais	14
3.2. Objetivos específicos	14

4. MATERIAIS E METODOLOGIA

4.1. MATERIAIS	15
4.2. MÉTODOS	15
4.2.1. Preparo das nanopartículas	15
4.2.2. Recobrimento das Nanopartículas de Óxido de Ferro	16
4.2.3. Incorporação do bioativo Clorambucil às nanopartículas magnéticas	18
4.3. Caracterização dos produtos obtidos	18
4.3.1. Espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)	18
4.3.2. Análise qualitativa do recobrimento e do estado de oxidação das ferritas recobertas por espectroscopia de absorção na região do Infravermelho.....	20
4.3.3. Dosagem da capacidade de recobrimento por Espectroscopia de emissão atômica (ICP-OES)	20
4.3.4. Obtenção da carga superficial por espalhamento dinâmico de luz visível	20

4.3.5. Propriedades magnéticas em função da temperatura com auxílio de magnetômetro de amostra vibrante (MAV)	21
4.3.6. Dosagem da quantidade de clorambucil absorvida nas funcionalizações das nanopartículas recobertas por espectroscopia de absorção na região UV-Vis.....	21

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo da nanoestrutura das nanopartículas	23
5.2. Confirmação da Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR)	26
5.3. Dosagem do rendimento da reação de recobrimento da superfície de óxido de ferro com diferentes alcoxissilanos	27
5.4. Estudo da carga de superfície em função do pH	29
5.5. Estudo das propriedades magnéticas das nanopartículas magnéticas revestidas com diferentes precursores de óxido de silício	29
5.6. Estudo da incorporação do CLB às nanopartículas magnéticas	33
6. CONCLUSÃO	36
7. REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais sobre o câncer

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é definido como a disseminação celular descontrolada, que pode afetar quase qualquer região do corpo. O desenvolvimento da doença apresenta potencial de metástase, fenômeno entendido como a invasão de células tumorais aos tecidos vizinhos, as quais podem, por meio da circulação sanguínea ou dos vasos linfáticos, disseminarem-se a órgãos distantes do local inicial do tumor (ALMEIDA, 2005); (WHO, 2012). Segundo dados da OMS, apresentados no relatório do GLOBOCAN de 2012, o câncer acarretou 8,2 milhões de mortes e 14,1 milhões de novos casos surgiram no ano de 2012 em todo o mundo (WHO, 2012). Os dados para o Brasil também são significantes. Estimativas do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) mostram, para o ano de 2014, 5050 novos casos de leucemias em homens, 57120 novos casos de câncer de mama feminina e 4850 novos casos de Linfoma Hodgkins em mulheres (INCA, 2014).

O diagnóstico do câncer traz mudanças importantes na vida do paciente e leva alterações físicas e emocionais, desconforto, dor, desfiguração e perda da autoestima, provenientes, muitas vezes, da utilização de tratamentos quimioterápicos (SCHLOSSER e CEOLIM, 2012). Tal cenário motiva sempre a necessidade de desenvolvimento de formas mais eficientes e eficazes de tratamento e prevenção da doença.

1.2. Tratamentos convencionais

Apesar dos notáveis avanços obtidos pela medicina convencional, relacionado às terapias com antitumorais, é notória a problemática dos efeitos adversos decorrentes da utilização de com a radioterapia e a quimioterapia (ALMEIDA et. al., 2005).

A radioterapia é um procedimento realizado em tumores malignos utilizando como agente terapêutico a radiação ionizante, o que torna o tecido tumoral eletricamente instável. As radiações podem ser corpusculares ou eletromagnéticas, sendo estas últimas as mais utilizadas. Esse tratamento age sobre o DNA nuclear, o que leva à morte ou à perda da capacidade reprodutiva da célula (JHAM e FREIRE,

2006). O tratamento radioterápico pode ser utilizado isoladamente ou em conjunto com a quimioterapia ou cirurgia, o que dependerá da avaliação de cada caso (SAWADA, 2006). Os efeitos colaterais da radioterapia estão relacionados com a dose da radiação, forma de administração, extensão e a localização da área a ser irradiada, do poder de penetração da radiação e de fatores dos indivíduos tratados. Os efeitos colaterais que mais se destacam são a xerostomia, necrose de tecidos, mucosite e infecções bacterianas, em tecidos propensos (ARISAWA et. al., 2005).

A quimioterapia, na maioria das vezes, quando aplicada ao câncer, consiste na utilização de princípios ativos medicamentosos que atuarão no ciclo celular, atingindo os tecidos tumorais. Esse tratamento, apesar de tornar possível a cura de muitos tumores, além de permitir o tratamento precoce de metástases não detectáveis, geralmente apresenta uma abordagem sistêmica do processo cancerígeno, o que demonstra sua elevada citotoxicidade. Com base nisso, uma vez administrado o agente quimioterápico, todas as células, na maioria dos casos, estarão sujeitas aos efeitos tóxicos, os quais geralmente são graves e devastadores ao paciente (ALVES, 2012). A ação dos quimioterápicos traz inúmeros efeitos adversos como mielossupressão, náuseas, vômitos, diarreia e alopecia (RODRIGUES E POLIDORI, 2012). Esses efeitos costumam ser combatidos com outras drogas, as quais propiciam o desenvolvimento de novos danos ao organismo, o que resulta em mais complicações e efeitos adversos, denominando uma cascata iatrogênica (CRUZ et. al., 2009).

1.3. Antineoplásicos e efeitos adversos

Anticancerígenos podem atuar indiretamente no DNA celular, por meio da inibição das funções metabólicas do ácido nucleico, ou diretamente no DNA (BRANDÃO et. al., 2010). Exemplos importantes de anticancerígenos que atuam indiretamente são os inibidores da enzima Topoisomerase II e bioativos com interações em microtúbulos. Os primeiros induzem as fitas de DNA a permanecerem quebradas por tempo mais longo, o que ativa a via de apoptose. O bioativo pertencente a essa classe é o Etoposídeo, que comumente causa supressão da medula óssea, vômitos, alopecia e, em doses muito altas, hepatotoxicidade. Já os bioativos com interações em microtúbulos podem atuar inibindo a polimerização por ligação à tubulina, ou estimulando a polimerização e inibição da despolimerização.

Vinblastina é um exemplo de fármaco que inibe a polimerização, e apresenta como principais efeitos colaterais a neuropatia periférica e mielossupressão reversível (BRANDÃO et. al., 2010).

Os agentes alquilantes são exemplos de classe de fármacos que atuam diretamente sobre o DNA. Esses agentes apresentam resíduos eletrofílicos que atacam sítios no DNA, o que resulta em fixação covalente de um grupo alquila ao sítio nucleofílico do ácido nucleico. Tipicamente esses agentes apresentam dois grupos reativos fortes, o que confere a capacidade de bis-alquilação, e permite a ligação cruzada do agente à própria molécula de DNA. A alquilação dos resíduos de guanina pode resultar em clivagem do anel, no emparelhamento anormal das bases guanina e timina e excisão de guanina do DNA. Dessa forma, a bis-alquilação parece constituir o principal mecanismo de citotoxicidade dos agentes alquilantes (BARBIE E FRANK, 2009). Dentro dessa classe, as mostardas nitrogenadas são os agentes mais usados na atualidade. O mecanismo de ação consiste na formação de ligações interfilamentares com o DNA. Pode-se citar como exemplos de mostardas nitrogenadas os fármacos Clorambucil (CLB), estudado nesse trabalho, e ciclofosfamida (ALMEIDA et. al., 2005). Mielodepressão, leucopenia, trombocitopenia, anemia e rash cutâneo são alguns dos efeitos colaterais comuns a esses medicamentos (BRASIL, 2014), resultados de seus diferentes mecanismos de ação.

1.3.1. Clorambucil (CLB)

O ácido 4-[4-[bis(2-cloroetil)amino]fenil]butanoico, conhecido como Clorambucil (CLB) (Figura 01), é uma mostarda nitrogenada e um agente alquilante originalmente sintetizado em 1953, por Everett et. al (FLOREA-WANG, 2009). É um bioativo bastante lipofílico, apresentando ponto de fusão entre 64 e 66°C. É solúvel em acetona e álcool. Apesar de sua baixa solubilidade em água, ainda sofre hidrólise em meio aquoso, influenciado pelo pH do meio e pela presença de espécies iônicas ao redor da molécula de CLB. Sua instabilidade química motiva a aplicação em sistemas nanotecnológicos, o que pode melhorar tanto sua estabilidade quanto a especificidade tumoral (SHARMA et. al., 2009).

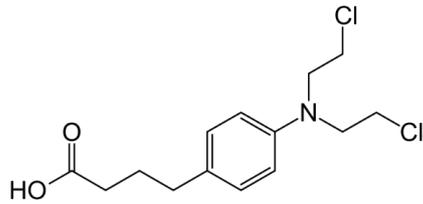


Figura 01. Fórmula estrutural do composto Clorambucil.

Esse bioativo é comumente utilizado em quimioterapia de Leucemia Linfocítica Crônica, mas pode ter outras aplicações clínicas como em Linfoma Hodgkins, carcinoma Ovariano e câncer de mama (FLOREA-WANG, 2009).

Como um agente alquilante, o mecanismo de ação do CLB consiste na ligação direta ao ácido nucleico. Os dois grupos cloro na mostarda nitrogenada facilitam o ataque nucleofílico e formação de um íon altamente reativo, o que promove alquilação no DNA, na posição N7 de guanina, principal local de atuação dos agentes alquilantes no DNA (DI ANTONIO, et al. 2014); (KATZUNG et. al., 2014). A figura abaixo mostra a representação geral do mecanismo de ação dos agentes alquilantes, como o Clorambucil. O mecanismo geral envolve uma reação de substituição nucleofílica ocorrendo um processo de ciclização intramolecular para formar um íon etilenoimônio que, diretamente ou através da formação de um carbocátion, transfere um grupamento alquila para um componente celular. Resultado da alquilação pode se dar em codificação defeituosa através do emparelhamento anormal de bases com timina ou de despurinização através da excisão de radicais de guanina, que pode levar à ruptura do filamento de DNA por meio da clivagem da ligação açúcar-fosfato (KATZUNG, et. al., 2008).

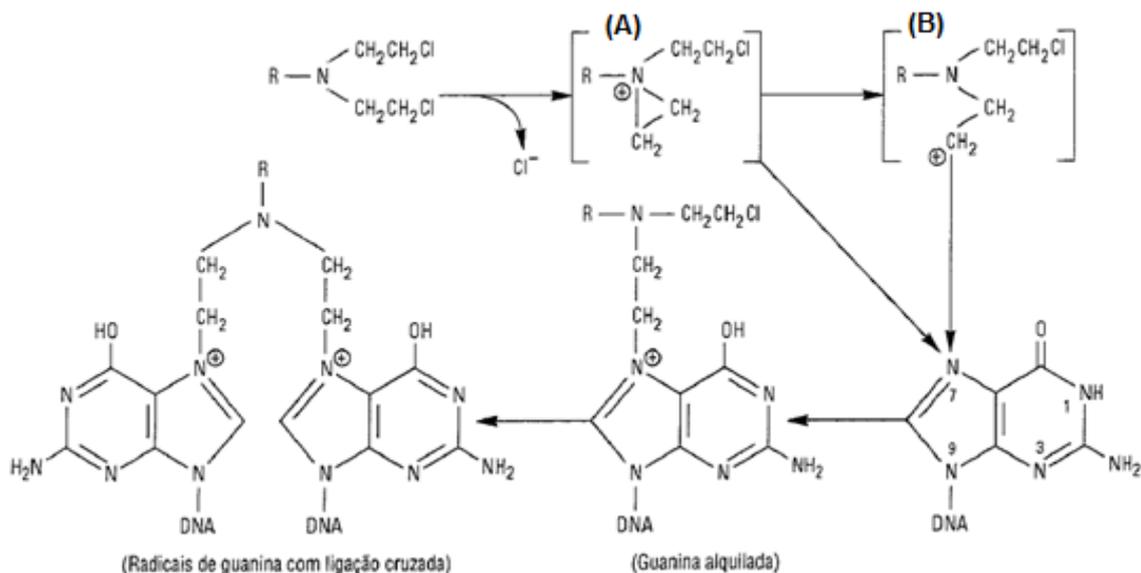


Figura 02. Mecanismo de ação dos alquilantes. Adaptado de: KATZUNG et. al., 2008). O bioativo contendo grupamentos bis-cloroetilamina sofre ciclização intramolecular e forma um íon eilenoimônio (A) e um íon carbocáion (B), que reage no sítio nucleofílico da guanina, frequentemente na posição N7, produzindo uma purina alquilada.

CLB é administrada oralmente e facilmente absorvida no trato gastrointestinal, sendo que seu pico de concentração no plasma, após ingestão, é alcançado em 1 hora (PETTERSSON-FERNHOLM et. al., 1999). Após sua administração, é rapidamente e quase completamente metabolizada no fígado. Sua afinidade às proteínas do plasma pode facilitar o aparecimento de efeitos adversos (BRASIL, 2014). Esse fármaco é metabolizado predominantemente por β -oxidação (Figura 03) da cadeia lateral de ácido butírico, o que origina o intermediário Ácido Acético {4-[bis(2-cloroetil) amino] fenil} que é posteriormente convertido ao metabólito final ácido Ácido (E)-4-{4-[bis (2-cloroetil) amino] fenil}-but-3-enóico. Em seguida, é metabolizado em um grupamento cloroetil (FLOREA-WANG, 2009), conforme o esquema abaixo:

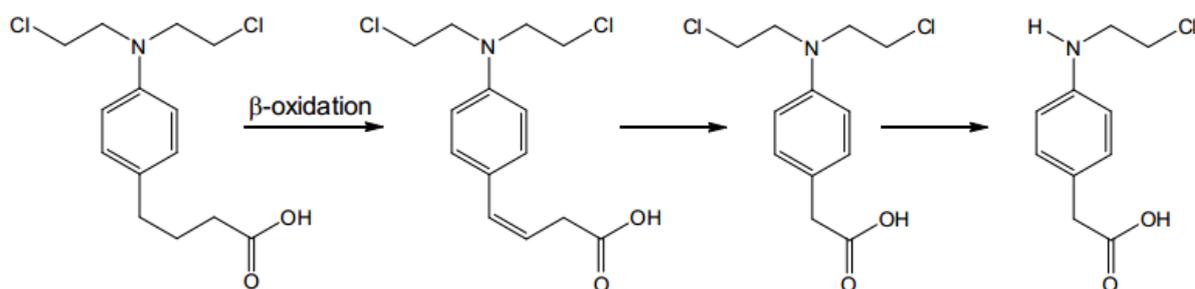


Figura 03. Metabolização hepática do Clorambucil. Fonte: FLOREA-WANG, 2009.

A toxicidade da medula óssea é o efeito adverso mais comum em terapia com Clorambucil, e geralmente é manifestada por anemia, leucocitopenia e trombocitopenia. Náusea, vômito, hepatotoxicidade e anafilaxia são também importantes efeitos adversos da exposição ao CLB (BRASIL, 2014).

Apesar de sua importante atividade antitumoral, apresenta toxicidade tecidual (PETTERSSON-FERNHOLM et. al., 1999) e sua importante instabilidade química é limitação importante para um desempenho terapêutico conclusivo (SHARMA et. al., 2009).

1.4. Nanotecnologia

A nanotecnologia, tornou-se importante aliada na aplicação em diversas áreas como química, engenharia de materiais, computação e dispositivos voltados para a área da saúde (PARREIRA e EUGENIO, 2011). Entende-se como nanotecnologia a abordagem de tecnologias de processamento, fabricação e desenho de dispositivos, nanomateriais nos quais pelo menos um componente funcional possui tamanho nanométrico (FAHNING E LOBÃO, 2011).

Nanomateriais são obtidos por associações de átomos ou moléculas com dimensões variadas, geralmente entre 1 a 100 nm (ALCÂNTARA, 2007). As partículas com estas variações de tamanho têm atraído cada vez mais atenção e têm sido estudadas devido às suas características únicas, não presentes em outros materiais.

Na área da saúde, são evidentes as diversas implicações do uso da nanomedicina, como no desenvolvimento de novos tratamentos e melhoria de processos como vetorização de medicamentos, aumento de contraste em imagens

de ressonância magnética, hipertermia magnética e a detecção rápida e sensível de células malignas, nos casos de terapia oncológica, o que possibilita uma gama de novas soluções para diagnósticos e tratamentos específicos (FALLEIROS et. al., 2011).

1.4.1. Nanomateriais promissores para aplicação na saúde

Um exemplo promissor na área da saúde é a utilização de nanopartículas (NPs) para recobrimento com insumos farmacologicamente ativos, que poderão atuar como sistemas de liberação modificada (PETRIN, 2006). A utilização de nanopartículas aplicadas a esses sistemas de liberação modificada oferece diversas vantagens, como maior eficácia terapêutica; liberação sustentada do fármaco; menores efeitos tóxicos sistêmicos; minimização de reações inflamatórias locais; direcionamento a alvos específicos de ação; redução da inativação do produto utilizado, entre outras (PETRIN, 2006).

Dentre os diferentes tipos de nanopartículas (NPs), as Nanopartículas magnéticas (NPMs), são uma importante classe. Na prática, a aplicação dessas nanopartículas pode se dar de duas formas principais, além da utilização em procedimentos de imagem por ressonância:

- I) Como carreadores de moléculas ou princípios ativos e
- II) Como sistemas de hipertermia localizada.

No primeiro caso, as NPMs revestidas com moléculas ativas anticancerígenas são administradas via parenteral e, com o auxílio de um campo magnético externo, direciona-se os princípios ativos ancorados na superfície das NPs até o local patológico, aumentando a eficácia do tratamento e promovendo a diminuição da dosagem administrada. Nos sistemas de tratamento oncológico por hipertermia, são administradas ao paciente nanopartículas magnéticas que, com o auxílio de um campo externo alternado, promovem aumento da temperatura no local do tumor, o que provoca sua inativação (ALVES, 2012).

Um exemplo muito importante de NPMs são as nanopartículas magnéticas de ferro, as quais são muito estudadas, devido às suas características magnéticas como o superparamagnetismo. Nesse contexto, o comportamento magnético dessas

nanopartículas é similar ao dos materiais com características paramagnéticas, no sentido de que elas perdem sua magnetização quando o campo magnético é removido (ALCÂNTARA, 2007). Estabilidade em sistema coloidal e biodegradação são motivação para aplicação em estudos relacionados ao câncer.

1.4.2. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro

As NPs de Óxido de Ferro, como as estudadas neste trabalho, possuem características superiores quando comparadas a outros metais, pois apresentam estabilidade coloidal em sistemas biológicos e são biodegradáveis, o que tem motivado o estudo para aplicações biomédicas (ALVES, 2012). A extensão da aplicabilidade biomédica destas nanopartículas depende fortemente da estabilidade das soluções em pH fisiológico bem como do grau em que suas superfícies podem ser quimicamente funcionalizadas (LYON et. al., 2004).

Devido às propriedades dessas NPMs, como o superparamagnetismo, é que se motiva a aplicação em diversos procedimentos como hipertermia, diagnóstico por ressonância magnética de imagem e utilização em tratamentos quimioterápicos na forma de bioconjugados (ALVES, 2012), Para tanto, após a introdução no organismo, as nanopartículas de óxido de ferro devem apresentar algumas características, como:

- I) Capacidade de minimização do processo de eliminação pelo sistema mononuclear fagocitário;
- II) Pouca adsorção proteica;
- III) Melhores condições de estabilidade em água a pH neutro e salinidade fisiológica.

Alguns parâmetros também são necessários e críticos para as nanopartículas magnéticas, como: menor tamanho possível, que proporcione melhor difusão nos tecidos, características da superfície que proporcionem melhor facilidade de ligação das NPs à modificadores de superfície, protegendo da biodegradação, e boa resposta magnética, possibilitando menor concentração no sangue, o que reduz os efeitos colaterais (HANNICKEL, 2011).

1.5. Procedimentos de obtenção de nanopartículas

O método de síntese mais utilizado para esses nanomateriais é a coprecipitação alcalina, e geralmente fornece como resultado magnetita (Fe_3O_4) ou maguemita (Fe_2O_3) (ALCÂNTARA, 2007). O produto é geralmente mantido em suspensão coloidal, o que fornece maior estabilidade e ausência de toxicidade. A coprecipitação é realizada para a preparação de ferritas por via úmida, através da mistura de sais em solução aquosa. Após dispersão da solução de ferro no meio escolhido, adiciona-se lentamente o agente precipitante alcalino (por exemplo, NaOH e NH_4OH), promovendo agitação contínua com a finalidade de evitar a supersaturação. Obtido o precipitado, pode-se lavá-lo com eletrólitos, como o $\text{CH}_3\text{COONH}_3$ ou mesmo a água, que ajudam a remover as impurezas adsorvidas (PEGORETTI, 2008). Algumas variáveis neste processo devem ser de intenso controle para a obtenção do colóide com fase cristalina específica, maior distribuição de pesos moleculares (polidispersão) e um grau de magnetização adequado. Parâmetros como pH da solução de precipitação, ordem de adição dos reagentes, temperaturas de precipitação, velocidade de agitação, são algumas dessas variáveis (FERREIRA, 2009).

Associado a isto, o entendimento e a compreensão das propriedades das dispersões das nanopartículas de óxido de ferro se tornou bastante importante devido às aplicações biomédicas. De maneira ideal, cada domínio paramagnético nas dispersões de nanopartículas de óxido de ferro deve estar isolado sem sofrer interferências de superfície e de vizinhos, para que os momentos magnéticos de cada partícula estejam orientados na mesma direção com a aplicação do campo.

Este fenômeno, caracterizado pela ausência dos ciclos de histerese nas curvas de magnetização (causado pela magnetização remanescente e campo coercivo nulo) (GOYA et. al., 2008) é importante e visa minimizar os processos de agregação das partículas depois da remoção do campo magnético, ideal em aplicações biomédicas como: carreadores de fármaco, ressonância magnética por imagem, hipertermia magnética, biosseparação e biossensores (MIKHAYLOVA et. al., 2004); (GUPTA et. al., 2005); (ZHANG et. al., 2008); (ZHANG et. al. 2007).

Essas características de magnetização podem ser explicadas pela proporção de tamanho superfície-núcleo das nanopartículas. À medida que o tamanho das nanopartículas diminui, o volume de área superficial aumenta significativamente, resultando em grande porção de átomos na superfície, se comparada ao núcleo da partícula. Por exemplo, para uma partícula com 1 μm de diâmetro, aproximadamente 0,15% de seus átomos estão na superfície, enquanto que em uma partícula de 6 nm de diâmetro, cerca de 20% de seus átomos estão na superfície. Essa proporção superfície-volume de nanopartículas é fator chave para estudo das propriedades físicas, químicas e mecânicas, em comparação aos materiais a granel (ISSA et. al., 2013).

A estabilidade coloidal é um parâmetro necessário para utilização de nanopartículas de óxido de ferro. Dessa forma, utiliza-se de modificação superficial das nanopartículas visando à prevenção da formação de agregados. Além de aumentar a estabilidade coloidal, as modificações de superfície de óxido de ferro também encontram utilização em aplicações biomédicas como ao proporcionar uma superfície de ligação adequada de princípios ativos e aumentar a eficiência dos processos de hipertermia e imagens de ressonância magnética (SREEJA e JOY, 2011). O interesse nos métodos de tratamento de superfície de nanomateriais é grande devido à simplicidade de síntese, controle da estabilidade das nanopartículas em suspensões coloidais e aumento da especificidade com a absorção de ligantes ativos (BINI et. al., 2012). Nanopartículas magnéticas funcionalizadas ou quimicamente modificadas constituem-se basicamente por um núcleo (core) magnético – no caso de nanopartículas de óxido de ferro, geralmente apresentam núcleo de magnetita – envolvido por uma camada contendo sítios que podem ancorar metais ou compostos orgânicos (CAMILO, 2006). A figura 04 abaixo representa uma nanopartícula com suas principais estruturas, contendo um núcleo (core) magnético e uma camada superficial que não é magnética, mas que interfere nas propriedades magnéticas do núcleo.

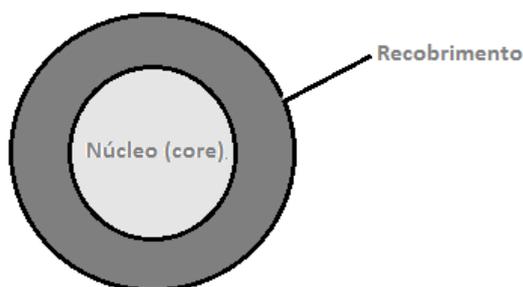


Figura 04. Representação de uma nanopartícula com a camada superficial de recobrimento.

A utilização de alcoxissilanos como agentes modificadores de superfície, conforme utilizado nesse trabalho, é interessante devido à variedade de grupamentos terminais que podem ser usados com alcoxissilanos modificados (BINI et. al., 2012). O recobrimento da superfície das partículas de óxido de ferro com a utilização de precursores tipo alcoxissilanos é resultante das reações de hidrólise e condensação desses precursores, extremamente dependentes do pH (HIRATSUKA et. al., 1995).

No caso de soluções de alcoxídeos metálicos o recobrimento se dá através de duas reações principais. Em uma primeira etapa alcoxídeos metálicos de silício sofrem reações de hidrólise que pode ser descrita por uma substituição nucleofílica do tipo:



onde M representa um elemento metálico e R um ligante orgânico.

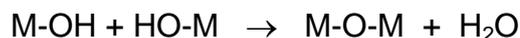
Após esta etapa inicial ocorre a propagação de reações de condensação. As espécies metálicas hidrolisadas sofrem policondensação de acordo com reações de oxidação ou oxidação ligando os precursores na superfície do óxido:

a) oxidação: onde o ataque nucleofílico de um grupo OH negativamente carregado sobre um cátion metálico, leva à saída de um grupo aquo ligante da esfera de coordenação do metal, e à formação de pontes entre os metais do tipo "OH":



Esse processo ocorre em aquo-precursores, com o número de coordenação máximo.

b) oxolação: envolve a reação de espécies hidroxiladas onde há formação de moléculas de água e pontes "oxo", como segue:



O avanço dessas reações resulta no recobrimento da superfície de óxido de ferro e formação de agregados entre os próprios precursores com diferentes probabilidades de interconecções entre os mesmos (HIRATSUKA et. al., 1995). Na figura abaixo tem-se a representação do recobrimento da nanopartícula, considerando R um radical contendo os grupamentos orgânicos supracitados.

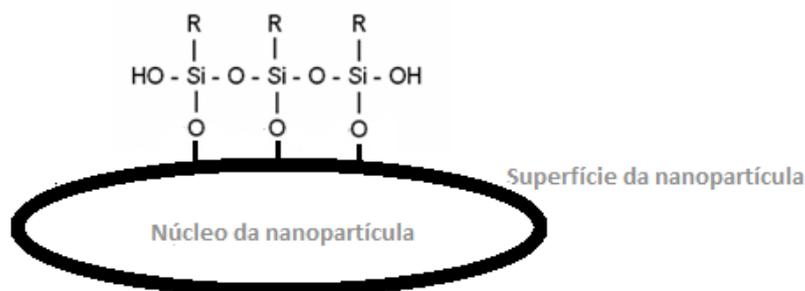


Figura 05. Representação do recobrimento de nanopartícula com precursor organometálico tipo alcoxissilano.

A biocompatibilidade desses compostos e as suas capacidades de ajuste das propriedades justificam a utilização de alcoxissilanos como agentes modificadores de superfície, possibilitando a alteração de cargas superficiais e promovendo a estabilidade coloidal e a especificidade na absorção de compostos ativos (BINI et. al., 2012).

Neste trabalho procurou-se fazer um estudo comparativo das propriedades magnéticas, das estruturas atômicas e moleculares, de nanopartículas de óxido de ferro, recobertas com precursores alcoxissilanos contendo diferentes grupos terminais. Buscou-se obter a correlação entre os diferentes precursores usados nos recobrimentos e a capacidade de adsorção da molécula com atividade anticancerígena, Clorambucil.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando a necessidade de desenvolvimento de tratamentos alternativos com anticancerígenos, visando aumentar a eficácia e reduzir os efeitos colaterais dos tratamentos com antitumorais, revela-se a justificativa deste estudo. O desenvolvimento de bioconjugados de nanopartículas magnéticas com agentes cancerígenos deve promover um grande avanço no entendimento desses dispositivos tecnológicos. Espera-se aprimorar o entendimento das propriedades de superfície de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro e correlacionar tais propriedades com as características de superfície, como carga, morfologia da interface e a capacidade de formação de bioconjugados. Espera-se que o desenvolvimento deste trabalho estabeleça condições ótimas para obtenção de bioconjugados contendo nanopartículas magnéticas e o antitumoral Clorambucil.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Sintetizar nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com diferentes precursores organometálicos tipo alcoxissilanos funcionalizando sua superfície. Posteriormente, incorporar o anticancerígeno Clorambucil. Estudar os produtos obtidos em cada etapa de preparação.

3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas magnéticas de óxido de ferro
- Recobrir as superfícies das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro com os precursores organometálicos: Tetraetil-ortossilicato; 3(-mercaptopropil)-trimetoxissilano; 3-(aminopropil)-trimetoxissilano; 3-(metilaminopropil)-trimetoxissilano; (Clorometil)-trimetoxissilano; 3-(trimetoxissilil)propil-metacrilato.
- Caracterizar as nanopartículas no sentido de certificar o recobrimento com os precursores organometálicos. Quantificar o rendimento das reações de recobrimento.
- Incorporar o bioativo Clorambucil às nanopartículas magnéticas recobertas com cada um dos precursores alcoxissilanos e quantificar a taxa de funcionalização.
- Correlacionar as características da superfície com as propriedades magnéticas dos materiais
- Correlacionar os diferentes recobrimentos com as taxas de funcionalização do bioativo.

4. MATERIAIS E METODOLOGIA

4.1. MATERIAIS

A síntese das nanopartículas de Óxido de Ferro consistiu na utilização de Cloreto de ferro III hexahidratado, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck), Cloreto de ferro II tetra hidratado, $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Merck), Hidróxido de Amônio, NH_4OH (Vetec), Ácido Clorídrico Fumegante a 37% (Vetec), Álcool etílico absoluto (Vetec) e água destilada.

No processo de funcionalização das NPMs de Óxido de Ferro seis precursores alcoxissilanos foram utilizados, tendo como procedência o fabricante Sigma Aldrich, os quais estão citados na tabela abaixo:

Tabela I. Nome IUPAC dos precursores alcoxissilanos usados nos recobrimentos das nanopartículas de óxido de ferro e suas respectivas abreviações:

Nome IUPAC	ABREVIACÃO UTILIZADA	Nome IUPAC	ABREVIACÃO UTILIZADA
(Tetraetil)-ortossilicato	TEOS	3-(metilaminopropil)-trimetoxissilano	MAPTES
3(-mercaptopropil)-trimetoxissilano	MPTES	(Clorometil)-trimetoxissilano	CMTMS
3-(aminopropil)-trimetoxissilano	APTES	3-(trimetoxissilil)propil-metacrilato	META

4.2. MÉTODOS

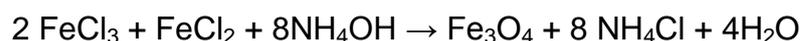
Análise de espalhamento dinâmico de luz visível foi utilizada para avaliação da formação de nanopartículas magnéticas, por meio da obtenção do raio hidrodinâmico das mesmas. Espectroscopia de emissão atômica foi utilizada como forma de estudo indireto da taxa de recobrimento das nanopartículas com precursores alcoxissilanos. Posteriormente, realizou-se caracterização por espectroscopia na região do Infravermelho para verificação da presença do precursor nas nanopartículas, e espalhamento de raios X a baixo ângulo para análise morfológica. Os aspectos de magnetização foram analisados por

magnetômetro de amostra vibrante (MAV). Posteriormente à ancoragem de CLB às nanopartículas, mediu-se as absorvâncias em equipamento de leitura na região do Ultravioleta-visível (UV-Vis).

A síntese, funcionalização e incorporação das Nanopartículas de Óxido de Ferro magnéticas ao bioativo Clorambucil realizou-se no Laboratório de Química do Instituto de Química da Universidade de Brasília (UnB), Campus Darcy Ribeiro.

4.2.1. Preparo das nanopartículas

As NPs foram obtidas por meio da coprecipitação alcalina em meio aquoso com solução de Cloreto de Ferro II (FeCl_2) e Cloreto de Ferro III (FeCl_3) em Hidróxido de Amônio (2 mol/L), segundo a seguinte reação:



Inicialmente, preparou-se uma solução de Cloreto de Ferro III (0,5 mol/L) seguida da adição de Cloreto de Ferro II, sob agitação vigorosa. Feito isso, uma solução de Hidróxido de Amônio (2 mol/L) foi colocada sob agitador magnético em funcionamento, e a solução preparada anteriormente adicionada ao Hidróxido de Amônio, para que ocorresse a precipitação, sob controle da temperatura a 60°C, por 60 minutos. Após a realização destes procedimentos, o produto foi precipitado com magneto, descartou-se o resíduo e lavou-se as nanopartículas por três vezes, com água destilada. Por fim, adicionou-se água destilada para obtenção de estabilidade coloidal, o que deu origem ao fluido magnético contendo as ferritas (nanopartículas magnéticas de óxido de ferro). A figura esquemática abaixo mostra o processo de síntese de nanopartículas magnéticas por coprecipitação alcalina, em que ocorre a condensação dos íons Fe^{3+} em solução aquosa com íons Fe^{2+} em forma sólida, com a posterior precipitação em solução básica de hidróxido de amônio.

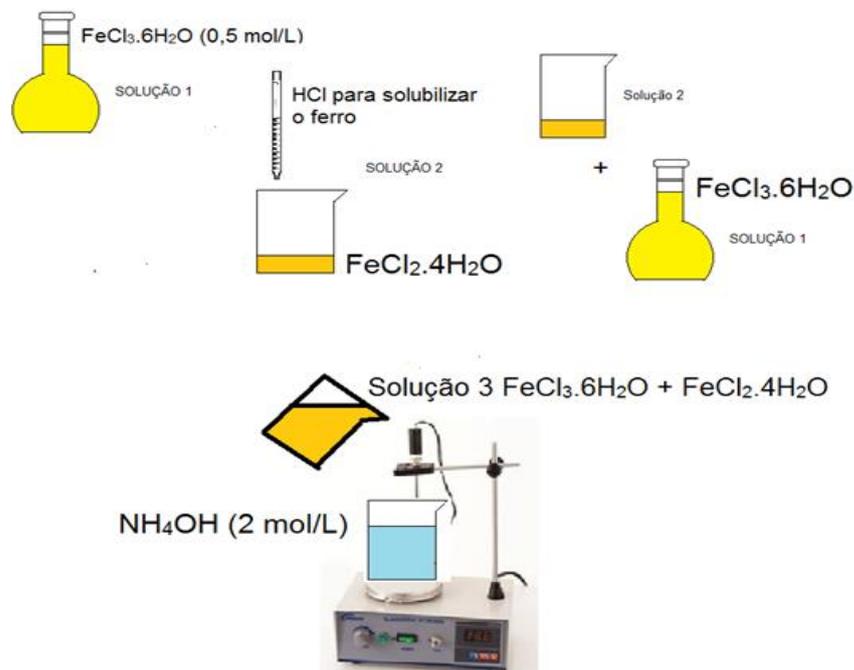


Figura 06. Processo de síntese de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro por coprecipitação alcalina. Posteriormente a isso, lavou-se o produto com água destilada e ressuspendeu-se em álcool etílico absoluto.

4.2.2. Recobrimento das Nanopartículas de Óxido de Ferro

A modificação da superfície das NPMs foi realizada em etanol visando à hidrólise e posterior condensação mediada por equipamento de ultrassom. Nesta etapa preparou-se solução de HCl (0,1M) em álcool que foi utilizada para todos os revestimentos. O procedimento de funcionalização foi dividido em duas etapas: Preparo de solução de ferrita pura com suspensão em álcool etílico absoluto e Hidrólise do reagente de funcionalização. Para todos os revestimentos, procedeu-se à adição de 4 mL de ferrita em 40 mL de álcool etílico absoluto e separou-se essa solução. Posteriormente, para a hidrólise do reagente de funcionalização, adicionou-se 1,2 mL do precursor utilizado a 4 mL da solução de HCl em álcool e 0,4 mL de água. Por fim, a solução de ferrita foi submetida ao ultrassom por 20 minutos, procedendo-se à lenta adição da solução de hidrólise nesse intervalo de tempo, para condensação das nanopartículas com o precursor. As fórmulas estruturais dos siloxanos utilizados estão representadas abaixo:

<p>TEOS (CH₃CH₂O)₄Si</p>	<p>MAPTES (CH₃O)₃Si-CH₂-CH₂-CH₂-NHCH₃</p>
<p>MPTES (CH₃CH₂O)₃Si-CH₂-CH₂-CH₂-SH</p>	<p>CMTMS (CH₃O)₃Si-CH₂-Cl</p>
<p>APTES (CH₃O)₃Si-CH₂-CH₂-CH₂-NH₂</p>	<p>META (CH₃O)₃Si-CH₂-CH₂-CH₂-O-C(=O)-C(CH₃)=CH₂</p>

Figura 07. Fórmulas estruturais dos diferentes precursores alcoxissilanos usados para modificação superficial de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro.

4.2.3. Incorporação do bioativo Clorambucil às nanopartículas magnéticas

Partindo das nanopartículas funcionalizadas com os diferentes alcoxissiloxanos, procedeu-se à incorporação do bioativo Clorambucil. O procedimento consistiu na preparação de uma solução alcoólica de CLB de concentração 5 mg/mL e posterior adição às soluções de ferro fluido. Com os pHs das nanopartículas regulados em 6,5, adicionou-se 1 mL da solução estoque de CLB à 1 mL de nanopartículas recobertas com os precursores siloxanos e deixou-se em ultrassom à 45 °C, por 60 minutos em intervalos pausados de 20 segundos, visando não degradar o bioativo. Feito isso, o sobrenadante foi obtido por centrifugação para proceder às análises espectroscópicas de absorção eletrônica do CLB na região do UV-Vis.

4.3. Caracterização dos produtos obtidos

4.3.1. Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

A técnica de espalhamento de raios X a baixo ângulo possibilita o estudo de diferentes formas da nanoestrutura. Podem ser obtidas informações do tamanho, forma, correlações espaciais entre partículas por meio dessa técnica (MAMANI, 2009).

A natureza da interface entre as nanopartículas de óxido e o recobrimento com os diferentes precursores alcoxissilanos bem como o tamanho e distribuição do tamanho das nanopartículas em solução coloidal foram avaliadas por espalhamento de raios X a baixo ângulo (do inglês, Small Angle X-ray Scattering, SAXS). As medidas de SAXS foram realizadas na linha de luz D11A do Laboratório Nacional de

Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, Brasil). A linha de SAXS é equipada com um monocromador de W/B₄C em multicamadas com substrato de silício gerando um feixe monocromático ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$). Um detector Pilatus 2D em modo de contagem de fótons, localizado a 540 mm da amostra foi usado para registrar a intensidade dos raios X espalhados, $I(q)$, em uma área de 172 x 172 pixels em função do módulo do vetor de espalhamento, $q = (4\pi/\lambda)\sin(\xi/2)$, sendo ξ o ângulo do espalhamento. Devido ao tamanho pequeno da secção transversal do feixe incidente no plano de detecção, não foram necessárias deconvoluções matemáticas no processo de tratamento dos dados.

As amostras das suspensões coloidais foram preparadas em um suporte de 1 milímetro de espessura protegidos com janelas de Kapton. Os dados de SAXS experimentais foram ajustados com o modelo descrito por Beaucage (BEAUCAGE, 1995), que considera a coexistência de partículas e subpartículas em regime de fractal de massa. Essa análise é frequentemente utilizada para descrever nanopartículas magnéticas e é descrita pela equação abaixo:

$$\begin{aligned}
 I(q) = & G \exp\left(-\frac{q^2 R_g^2}{3}\right) \\
 & + B \exp\left(-\frac{q^2 R_{sub}^2}{3}\right) \left(\frac{[erf(q k R_g / \sqrt{6})]^3}{q}\right)^P \\
 & + G_s \exp\left(-\frac{q^2 R_s^2}{3}\right) \\
 & + B_s \left(\frac{[erf(q k_s R_s / \sqrt{6})]^3}{q}\right)^{P_s}
 \end{aligned}$$

Nessa equação, o primeiro termo (R_g) descreve um sistema nanométrico composto pela escala de partículas com maior tamanho, em coexistência com partículas subunitárias de menor tamanho, identificadas pelo termo R_s . Já o termo R_{sub} é definido entre dois regimes estruturais de fractal de massa. Os dois últimos termos da equação descrevem parâmetros subestruturais das partículas estudadas (BEAUCAGE, 1995).

4.3.2. Análise qualitativa do recobrimento e do estado de oxidação das ferritas recobertas por espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (FTIR)

A FTIR é uma técnica de grande importância utilizada na análise orgânica qualitativa, amplamente aplicada nas áreas de química de produtos e sínteses de compostos, sendo um dos principais recursos para identificação estrutural de substâncias (LOPES e FASCIO, 2004).

As caracterizações por Infravermelho foram realizadas visando à identificação de grupamentos químicos atribuídos as absorções moleculares dos precursores alcoxissilanos bem como das nanopartículas de óxido de ferro. Procurou-se confirmar a presença dos agentes de recobrimento nas nanopartículas e verificar o estado de oxidação das ferritas com e sem recobrimentos.

Os espectros no infravermelho foram registrados no modo absorbância intervalo de 1150 a 500 cm^{-1} a partir das amostras secas e trituradas, prensadas na forma de pastilhas com brometo de potássio em diluições de 1:300.

4.3.3. Dosagem da capacidade de recobrimento por Espectroscopia de emissão atômica (ICP-OES)

A técnica de ICP-OES foi utilizada para dosar o rendimento das reações de recobrimento. Após o término da reação de funcionalização dos diferentes precursores o sobrenadante reacional foi separado e dosado a fim de determinar a quantidade de silício em solução. Sabendo a concentração molar dos precursores de alcoxissilanos utilizado na reação pode-se determinar a taxa de recobrimento por diferença da concentração dos precursores remanescentes no sobrenadante após a reação.

As análises elementares por emissão quantitativas elementares foram realizadas após diluição das amostras de sobrenadante com diluição de 1:500, com a finalidade de obter a intensidade emitida de acordo com a curva de calibração utilizada.

4.3.1. Obtenção da carga superficial por espalhamento dinâmico de luz visível

O Potencial Zeta é função da carga superficial da partícula, de qualquer camada adsorvida na interface com o meio e da natureza e composição do meio que

a circunda. A técnica utilizada para medição dessa carga é por meio da mobilidade eletroforética, a qual consiste na introdução de uma suspensão coloidal diluída em uma cuba com dois eletrodos e posteriormente aplica-se um potencial elétrico à solução (MAINARDES, 2007).

Foram realizadas medidas de mobilidade eletroforética em função do pH para as nanopartículas de magnetita pura, revestidas com APTES e revestidas com MPTES, sendo mantidas as concentrações utilizadas para todos os pHs, as quais foram diluídas em água ultrapura, para análise do pH neutro; em ácido clorídrico 0,01 mol/L nas análises ácidas; e em Hidróxido de Amônio (NH₄OH) 0,01 mol/L, para os pHs acima de 7. O aparelho utilizado foi Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK), realizando as medidas em cela universal com as soluções coloidais de nanopartículas diluídas em proporção 1:1000 em água.

Foram obtidos também os valores da carga de superfície e tamanho para suspensões coloidais na mesma diluição, das amostras de óxido de silício recobertas com APTES, MAPTES, MPTES, TEOS, META, CMTMS com pHs ajustados em 6,5 (mesmo pH utilizado nas funcionalizações com CLB).

4.3.5. Propriedades magnéticas em função da temperatura com auxílio de magnetômetro de amostra vibrante (MAV)

Para a análise das propriedades magnéticas das nanopartículas recobertas com os diferentes alcoxissilanos foi utilizado um magnetômetro de amostra vibrante. As curvas de magnetização foram normalizadas pela massa e obtidos valores da saturação de magnetização (Ms), saturação remanescente (Mr) e campo coercivo (Hc) em temperaturas de 300 e 5 K.

4.3.6. Dosagem da quantidade de clorambucil absorvida nas funcionalizações das nanopartículas recobertas por espectroscopia de absorção na região UV-Vis

A fim de avaliar o processo de funcionalização das nanopartículas recobertas com diferentes alcoxissilanos da molécula de Clorambucil foram efetuadas análises de espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis. Os espectros de absorção foram obtidos utilizando-se espectrofotômetro UV-Vis de duplo feixe,

modelo 3900H, da marca Hitachi®, adotando-se cubetas de quartzo, e mantendo-se a temperatura constante em 25 °C. A análise consistiu, primeiramente, na obtenção de uma curva de calibração da solução alcoólica de CLB. Posteriormente, partindo do sobrenadante da reação com diluição de 1:100 em etanol absoluto realizou-se as medições das absorvâncias. Para o cálculo da concentração absorvida considerou-se a concentração inicial no coloide de 2,5 mg/ml e mediu-se a absorvância do sobrenadante reacional. Com o uso da curva de calibração obteve-se a concentração de CLB remanescente, e por diferença, calculou-se a concentração absorvida nas nanopartículas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo da nanoestrutura das nanopartículas

Com o intuito de realizar o estudo da nanoestrutura e da interface das suspensões coloidais de nanopartículas de óxido de ferro, foram realizadas medidas de espalhamento de raios x a baixo ângulo (SAXS) para as diferentes amostras de nanopartículas de óxido de ferro recobertas com precursores siloxanos.

A Figura 09 mostra as curvas de SAXS para as amostras estudadas. O aspecto geral do formato das curvas experimentais de SAXS para todas as amostras estudadas sugere partículas esféricas como objetos espalhadores em um regime típico fractal de massa. Esse resultado pode confirmar a presença de nanopartículas nas suspensões coloidais. As curvas experimentais foram ajustadas segundo a Lei Exponencial de Beaucage (BEAUCAGE, 1995) que considera um regime nanométrico hierárquico composto por nanopartículas maiores de raio de giro R_g coexistindo com subunidades de nanopartículas de raios menores com raios de giro R_s e R_{sub} .

Os resultados dos ajustes das curvas experimentais podem ser verificados por linhas contínuas mostradas na Figura 09 e os resultados de tais ajustes na Tabela II. Para todas as amostras estudadas com os diferentes recobrimentos, observa-se valores de R_g variando entre 12 e 18 nm, dependendo do tipo de recobrimento utilizado. Esse resultado está de acordo com valores de raio das nanopartículas obtidos por difração de raios x para sistemas similares (FEITOZA et. al., 2014). Outro aspecto importante dos ajustes das curvas experimentais de SAXS são os valores de R_s e R_{sub} que caracterizam a fractalidade de massa desses sistemas com nanopartículas maiores (R_g) coexistindo com partículas menores de raios médios 6 e 1,5 nm., conforme já descrito por autores (HYEON-LEE et. al., 1998)..A Figura abaixo mostra um esquema do comportamento das nanopartículas em suspensão com um regime típico fractal de massa. Pode-se observar na figura partículas maiores e menores.

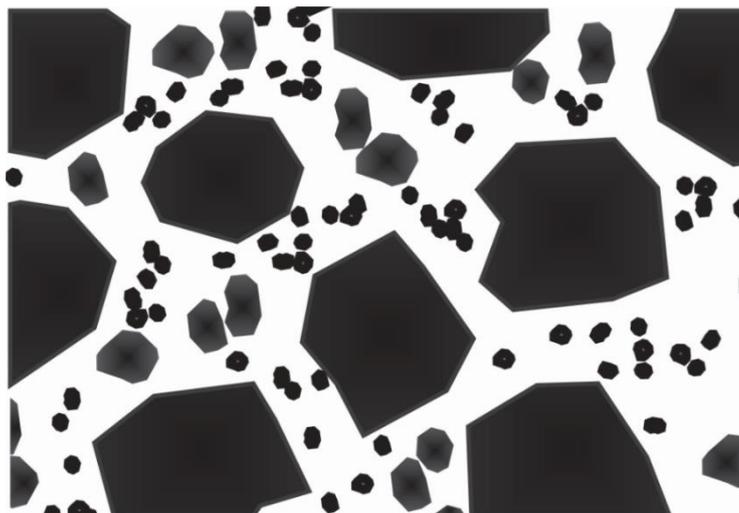


Figura 08. Diagrama esquemático representando o regime fractal de massa encontrado nos sistemas estudados. Observa-se a coexistência de partículas maiores com partículas menores.

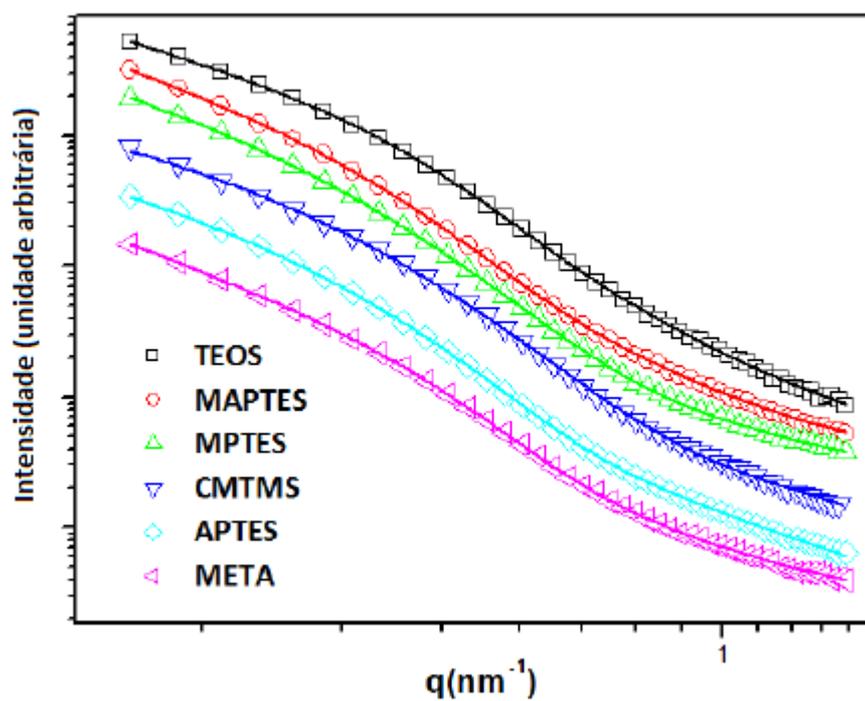


Figura 09. Curvas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo para nanopartículas recobertas superficialmente com diferentes precursores alcossilanos. Os pontos mostram as curvas experimentais e as linhas contínuas os ajustes teóricos, segundo a equação de Beaucage.

Tabela II. Ajustes teóricos das curvas experimentais de SAXS de acordo com a equação de Beaucage, de suspensões de nanopartículas de óxido de ferro recobertas com diferentes precursores alcoxissilanos

	Rg	Rs	Rsub
APTES	15,9	6,01	3,73
TEOS	16,07	6,11	2,62
MPTES	13,45	2,14	3,68
MAPTES	15,41	6,39	0,014
CMTMS	11,95	1,53	3,75
META	18,4	5,99	1,15

5.2. Confirmação da Espectroscopia na região do Infravermelho (FTIR)

A Figura 10 apresenta os espectros de absorção na região do Infravermelho no intervalo de comprimento de onda entre 1150 e 500 cm^{-1} para amostras de nanopartículas de óxido de ferro preparadas com diferentes recobrimentos e comparadas com a absorção de nanopartículas sem recobrimento.

Pode-se confirmar que o processo de recobrimento das nanopartículas de óxido de ferro foi eficiente, uma vez que é possível observar a banda de absorção em 1040 cm^{-1} frequentemente atribuída à ligação Si-O-Si (AL-OWEINI e EL-RASSY, 2008), para todas as amostras recobertas. Esse resultado indica que houve condensação das nanopartículas com os precursores alcoxissilanos.

Para todas as amostras estudadas observa-se a presença das bandas de absorção em 600 cm^{-1} e em 570 cm^{-1} , frequentemente atribuídas às vibrações Fe-O (COSTA et.al., 2008). Segundo autores (MORCELI, 2009), o estado de oxidação das partículas de óxido de ferro pode ser caracterizado pelas diferentes intensidades das bandas em 600 e 570 cm^{-1} . É descrito que as absorções relativas às vibrações Fe-O da maguemita ocorrem em 600 cm^{-1} , enquanto que da magnetita em 570 cm^{-1} . Observa-se na Figura 10 que os espectros de absorção das nanopartículas recobertas contêm as contribuições de absorção em 600 e 570 cm^{-1} , indicando a coexistência dos dois estados de oxidação para essas amostras, ou seja, maguemita e magnetita. Para amostra sem recobrimento, observa-se apenas a

contribuição da absorção em 570 cm^{-1} . Esse resultado mostra que a funcionalização com os diferentes precursores de siloxanos resultaram em uma oxidação superficial, gerando a fase maguemita do óxido de ferro.

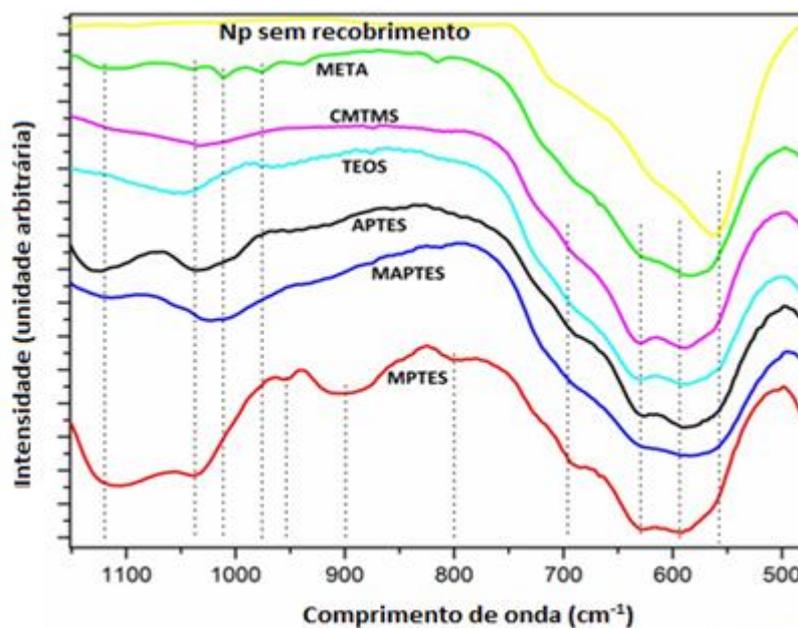


Figura 10. Espectro na região do Infravermelho para amostras de nanopartículas magnéticas sem recobrimento e nanopartículas revestidas com diferentes precursores alcoxissilanos.

Outras absorções são possíveis de se observar nos espectros e caracterizam a presença dos precursores organometálicos junto com as nanopartículas de óxido de ferro, conforme observado na tabela abaixo.

Tabela III. Atribuições das absorções na região do Infravermelho de amostras de nanopartículas de óxido ferro recobertas com diferentes precursores

Recobrimento utilizado	Comprimento de onda (cm^{-1})	Unidade estrutural	Modo vibracional	Referência
NPM sem recobrimento	570	Fe-O	V_s	(FERREIRA, 2009)
MPTES	2950	C-H	V_{as}	(FILHA, 2011)
	1080	Si-O-Si	V_s	(AL-OWEINI e EL-RASSY, 2008)
	898	C-S-H	δ	(CRUZ, 2009)
	600	Fe-O	V_s	(CAMILO, 2006)
APTES	3430	O-H	V_s	(FILHA, 2011)
	1620	H-O-H	δ	(AL-OWEINI e

				EL-RASSY, 2008)
	1080	Si-O-Si	V_s	AL-OWEINI e EL-RASSY, 2008
TEOS	3430	O-H	V_s	(FILHA, 2011)
	1630	H-O-H	δ	AL-OWEINI e EL-RASSY, 2008)
	1040	Si-O-Si	V_{as}	(WEN-BIG e CHAO-CAN, 2009)
	570	Fe-O	V_s	(FERREIRA, 2009)
MAPTES	1630	O-H-O	δ	(AL-OWEINI e EL-RASSY, 2008)
	1040	Si-O-Si	V_s	(WEN-BIG e CHAO-CAN, 2009)
	570	Fe-O	V_s	(FERREIRA, 2009)
META	3430	O-H	V_s	(LENZA e VASCONCELOS, 2002)
	1710	C=O	V_s	(VALLÉE et.al., 2000)
	1190	Si-O-CH ₃	δ	MÉNDEZ-VIVAR e MENDOZA-MANDALA, 2000)
	1000	C=C	V_s	(AL-OWEINI e EL-RASSY, 2008)
	570	Fe-O	V_s	(FERREIRA, 2009)
CMTMS	1630	O-H-O	δ	(AL-OWEINI e EL-RASSY, 2008)
	1040	Si-O-Si	V_s	(WEN-BIG e CHAO-CAN, 2009)
	570	Fe-O	V_s	(FERREIRA, 2009)

5.3. Rendimento da reação de recobrimento dos diferentes alcoxissilanos com a superfície das nanopartículas de óxido de ferro.

A fim de se quantificar o rendimento das reações de recobrimento superficial das nanopartículas de óxido de ferro, após a reação dos precursores alcoxissilanos com as nanopartículas de óxido de ferro, separou-se o sobrenadante reacional e procedeu-se à medida de emissão atômica do Silício.

A tabela abaixo mostra o resultado do cálculo de porcentagem de silício em relação à massa de silício presente em cada um dos precursores siloxanos. Observa-se que os resultados de quantificação de silício no sobrenadante não ultrapassam 4% da massa de silício adicionada inicialmente em cada uma das reações de recobrimento. Esse resultado revela que o rendimento das reações de recobrimento para todos os precursores utilizados foi superior a 95%.

Tabela IV. Porcentagem de silício no sobrenadante.

Grupamento ligado ao Silício (Si)	Precursor utilizado	Porcentagem em massa de silício no sobrenadante em relação à massa inicial
ETIL	TEOS	2,87
	APTES	3,26
METIL	MPTES	1,27
	MAPTES	2,84
	CMTMS	0,96
	META	1,87

Observa-se ainda que o rendimento das reações com TEOS e APTES foi o mais baixo dentre os alcoxissilanos estudados, atingindo valores de rendimento de 97,1% e 96,9%, respectivamente. Esses resultados podem estar relacionados à menor capacidade de hidrólise dos etilalcoxissilanos comparados aos metilalcoxissilanos, que apresentaram maior rendimento reacional, conforme observado na tabela IV.

5.4. Estudo da carga de superfície em função do pH

O estudo da carga de superfície é um importante parâmetro para analisar a estabilidade físico-química da suspensão coloidal das nanopartículas de óxido de ferro. Segundo autores (MAINARDES, 2007), valores elevados de potencial zeta indicam alta carga elétrica na superfície das NPs, gerando forças de repulsão entre as partículas de modo a prevenir agregação das mesmas.

A figura abaixo mostra a variação dos valores de potencial zeta estudadas por espalhamento dinâmico de luz visível em função do pH para suspensões coloidais de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro sem recobrimento comparada às suspensões de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro recobertas com APTES e MPTES. Pode-se observar na Figura 11 que a variação da carga de superfície com o pH das suspensões das amostras recobertas mostram uma tendência de cargas superficiais negativas para o intervalo de pH estudado. Por outro lado, a suspensão coloidal da amostra sem recobrimento revelou cargas superficiais positivas do pH 2 até pH 10. As diferenças dos valores de pH podem estar relacionadas com as diferentes capacidades de protonação para as diferentes superfícies de nanopartículas em suspensão, conforme já observado por autores (FEITOZA et. al., 2014).

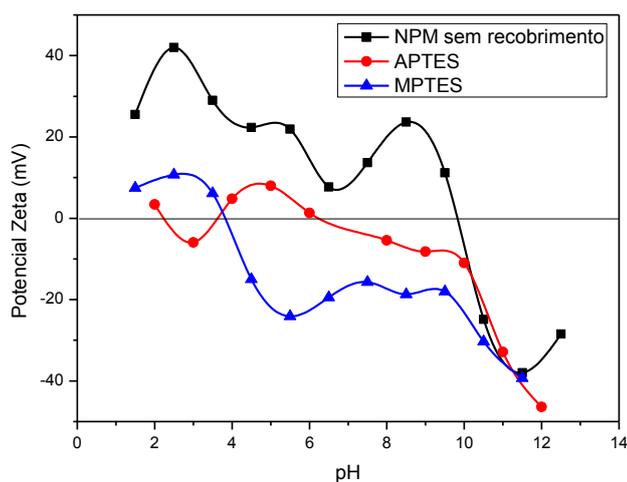


Figura 11. Valores de potencial zeta em função da variação do pH para amostras de ferrofluidos recobertas com APTES e MPTES e comparada com a mesma variação para o ferro fluido sem recobrimento.

A tabela abaixo mostra os valores de carga de superfície e do raio hidrodinâmico das NPs em suspensão coloidal estudadas por espalhamento de luz visível para as seis amostras funcionalizadas com os precursores siloxanos, medidas em pH 6,5. De maneira geral, as cargas superficiais apresentaram valores negativos para todas as composições estudadas neste pH. As amostras recobertas com TEOS, MPTES e CMTMS, revelaram valores de cargas superficiais superiores aos outros recobrimentos estudados. De fato, ao observar as estabilidades das suspensões coloidais estocadas, observa-se maior estabilidade para tais recobrimentos. Este efeito é igualmente verificado pelos valores de raio hidrodinâmico, ou seja, observa-se uma relação direta do módulo do valor da carga de superfície com o raio. Pode-se inferir que no pH estudado, valores de carga de superfície menores geram agregados com raio hidrodinâmico menor, resultando em suspensões coloidais mais estáveis.

Tabela V. Valores de potencial zeta e tamanho para ferritas funcionalizadas com diferentes recobrimentos (medidas em pH = 6,5).

AMOSTRA	POTENCIAL ZETA	pH da solução	Raio Hidrodinâmico
APTES	0,979	6,5	590,5
MAPTES	7,58	6,5	472
META	-15,9	6,5	734
TEOS	-18,5	6,5	690
MPTES	-18,9	6,5	612
CMTMS	-18,9	6,5	634

5.5. Estudo das propriedades magnéticas das nanopartículas magnéticas recobertas com diferentes precursores de óxido de silício

A Figura 12 mostra medidas de magnetização em função do campo aplicado (H) de zero a 100 KOe obtidas em 5 e em 300 K para amostras de nanopartículas de óxido de ferro recobertas com diferentes precursores alcoxisilanos. A Tabela VI apresenta os valores de magnetização de saturação para os diferentes recobrimentos estudados.

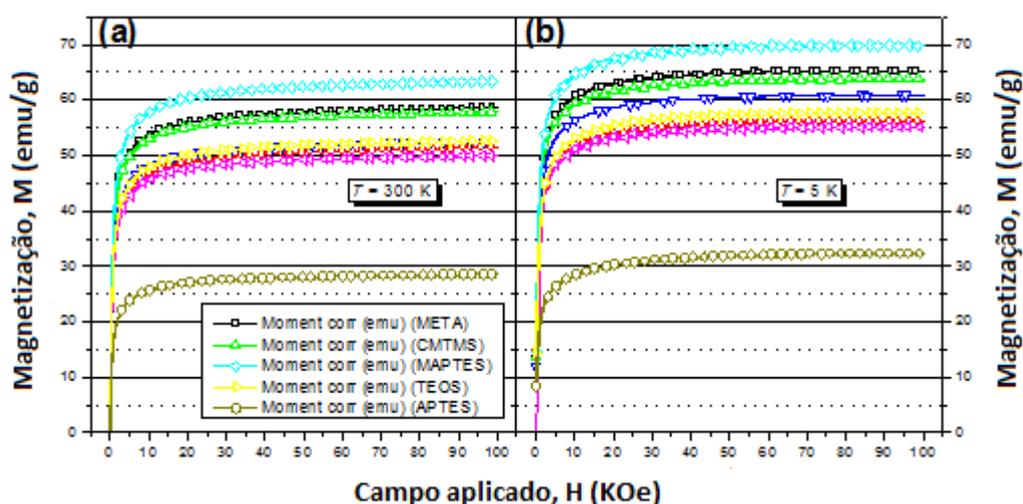


Figura 12. Curvas M. vs H. para máxima saturação a 300 K (a) e 5 K (b) de NPs recobertas com precursores alcoxissilanos.

Tabela VI. Valores de máxima magnetização das nanopartículas magnéticas recobertas com diferentes precursores alcoxissilanos.

	Magnetização de saturação a 300 K	Magnetização de saturação a 5 K	Porcentagem de incremento de magnetização
META	58,81	65,12	9,68
CMTMS	8,00	63,77	9,04
MAPTES	63,39	69,97	9,40
TEOS	52,60	57,83	9,04
APTES	28,32	32,20	12,04

Pode-se observar na Tabela VI que o valor médio de magnetização de saturação para as nanopartículas de óxido de ferro com a superfície recoberta é de 60 emu/g. Esse valor é coerente para ferritas magnéticas sem revestimento, conforme descrito por autores (LEON-FÉLIX, et. al., 2013).

Os valores de magnetização de saturação obtidos para as diferentes amostras estudadas revelam influência dependendo do revestimento. Autores (BINI et. al., 2012) descrevem que o aumento da magnetização de saturação (M_s) em função da temperatura está relacionado a regiões magneticamente instáveis e desordenadas presentes nas superfícies das partículas. Em nosso sistema observa-se que o abaixamento da temperatura de 300 K para 5 K leva a um aumento dos

valores da magnetização de saturação. Esse efeito pode estar relacionado a interações interpartículas superficiais preponderantes em baixas temperaturas. Para todas as amostras estudadas o aumento da magnetização de saturação de 300 K para 5 K foi de aproximadamente 9%, com exceção da amostra com APTES, que mostrou um aumento da magnetização de saturação de 12%. Esse efeito pode estar associado a interações interpartículas mais intensas nessas amostras. De fato, amostras recobertas com grupamentos $-NH_2$ interagem entre si através de interações intermoleculares tipo ligações de hidrogênio.

A Figura 13 mostra as curvas da magnetização em função do campo aplicado de -1 a 1 KOe obtidas em 5 K e em 300 K para amostras de nanopartículas de óxido de ferro recobertas com diferentes precursores alcoxissilanos. A Tabela VII apresenta os valores de campo coercivo e coercividade remanescente obtidos pelas curvas experimentais.

Observa-se para todas as amostras estudadas o comportamento de histerese, o que está relacionado à contribuição antiferromagnética na magnetização total. Ao mesmo tempo, observa-se que os valores de campo coercivo para todas as amostras estudadas diferem de zero, o que, segundo autores (LEON-FÉLIX, et. al., 2013), pode estar associado a interações interpartículas.

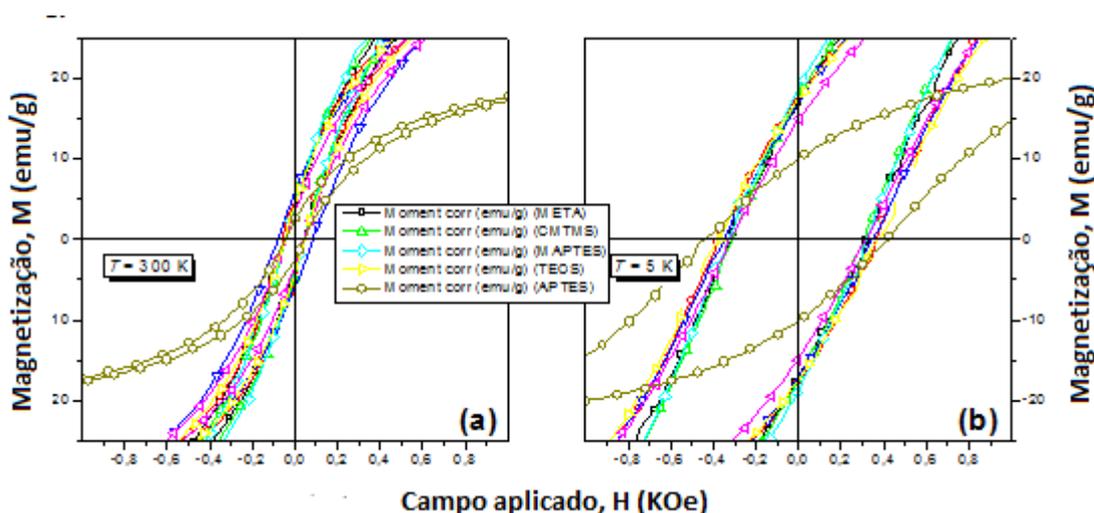


Figura 13. Curvas de histerese magnéticas para as nanopartículas magnéticas recobertas com diferentes precursores alcoxissilanos em 300 K (a) e 5 K (b).

Tabela VII. Valores para coercividade das nanopartículas magnéticas recobertas com diferentes precursores alcoxissilanos.

	Remanência de coercividade a 5K	Coercividade a 5K	Remanência de coercividade a 300 K	Coercividade a 300 K
META	-316,33	323,6	-45,23	35,06
CMTMS	-308,45	314,03	-35,66	36,01
MAPTES	-328,48	309,65	-37,14	39,60
TEOS	-368,85	363,64	-40,84	35,60
APTES	-441,19	411,85	-40,84	35,92

5.6. Estudo da incorporação do CLB às nanopartículas magnéticas

Para determinar a eficiência do processo de ancoragem de CLB às nanopartículas, obteve-se uma curva de calibração para esse bioativo por meio de onze diluições seriadas. O coeficiente angular obtido foi de 5,36692 e o coeficiente linear foi de -0,0074. O coeficiente de correlação (r^2) apresentou valor de 0,99918.

Dessa forma, visando à obtenção das concentrações de CLB nos sobrenadantes das soluções incorporadas com esse bioativo, chegou-se à seguinte equação:

$$\text{CONCENTRAÇÃO (mg/mL)} = \frac{\text{Absorbância} + 0,0074}{5,36692}$$

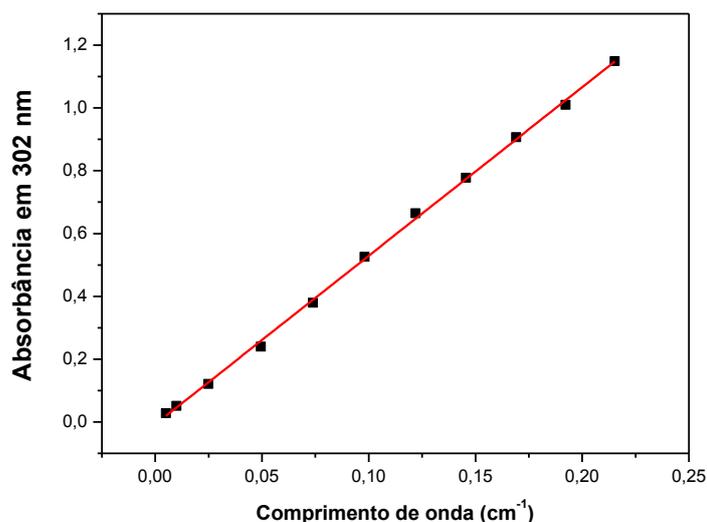


Figura 14. Curva de calibração para CLB em álcool.

Após a curva de calibração de CLB, deu-se procedência às medidas espectroscópicas na região do UV-Vis para as NPs ancoradas com Clorambucil. O método indireto foi utilizado por meio da quantificação da concentração do fármaco presente no sobrenadante da solução, após centrifugação, o que resultou nas absorbâncias listadas na tabela abaixo, relativas ao comprimento de onda de 302 nm, banda característica do CLB (TARIQ e ABDULLAH, 1987), o que confirmou a presença do bioativo nos amostras incorporadas.

Tabela VIII. Absorbância das nanopartículas incorporadas ao CLB e respectivas porcentagens de incorporação do bioativo

	Absorbância em 302 nm	Concentração em diluição 1:100	Concentração indireta (mg/mL)	Porcentagem de incorporação
APTES	0,1205	0,022483	2,2483	10,06
TEOS	0,1326	0,024736	2,4736	1,05
MAPTES	0,1224	0,022832	2,2832	8,67
MPTES	0,1226	0,022867	2,2867	8,53
CMTMS	0,1340	0,025	2,5	0
META	0,1340	0,025	2,5	0

Os resultados mostraram taxas de incorporação inferiores a 0,275 mg/mL (11 %) do bioativo, sendo as nanopartículas com APTES as que mais obtiveram o

fármaco ancorado às suas superfícies. Esse resultado pode estar envolvido à grande reatividade do sítio nucleofílico do 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES), por meio do grupamento amina. Da mesma forma, o precursor MAPTES apresentou resultado de incorporação de 0,22 mg/mL, o que pode indicar que o sítio nucleofílico NH facilita a incorporação, bem como o grupamento SH no precursor MPDES. Já o restante das amostras apresentaram taxas de incorporação próximas ou iguais a zero. As NPs recobertas com CMTMS e META não resultaram em incorporação do fármaco. . A metodologia desenvolvida apresentou resultados de incorporação, mas talvez tais resultados pudessem ter sido maiores com a realização de incorporação de CLB em solução estoque de concentração igual a das nanopartículas recobertas com os precursores tipo alcoxissilanos.

6. CONCLUSÃO

A utilização de nanopartículas magnéticas para tratamentos contra o câncer apresenta-se bastante promissora devido às suas características especiais, não encontradas em outros materiais, e motiva o estudo de novos nanomateriais para aplicação em sistemas fisiológicos.

Com o estudo de SAXS, diferentes raios de giro foram encontrados para as NPs recobertas com diferentes precursores alcoxissilanos.. O aspecto da figura obtida por SAXS sugere a existência de partículas esféricas como objetos espalhadores em um regime típico fractal de massa. Esse resultado pode confirmar a presença de nanopartículas nas suspensões coloidais. Com o estudo de espectroscopia na região do Infravermelho pôde-se confirmar que o processo de recobrimento das nanopartículas de óxido de ferro foi eficiente, uma vez que foi possível observar a banda de absorção em 1040 cm^{-1} frequentemente atribuída à ligação Si-O-Si (AL-OWEINI e EL-RASSY, 2008). Por meio dessa técnica ainda foi possível observar que as amostras recobertas propiciaram oxidação superficial das nanopartículas, o que é observada com a banda em 600 cm^{-1} , referente à fase maguemita, coexistindo nessas amostras as fases magnetita e maguemita.

Com a espectroscopia de emissão atômica foi possível observar que os diferentes grupamentos ligados ao silício interferem no processo de hidrólise do precursor. Dessa forma, os precursores com grupamentos metilalcoxissilanos apresentam maiores taxas de funcionalização se comparados aos grupamentos etilalcoxissilanos.

Com o estudo de espalhamento dinâmico de luz visível notou-se que as diferenças dos valores de pH podem estar relacionadas com as diferentes capacidades de protonação para as diferentes superfícies de nanopartículas em suspensão. De maneira geral, as cargas superficiais apresentaram valores negativos para todas as composições estudadas em pH 6,5.

Os valores de magnetização de saturação obtidos para as diferentes amostras estudadas revelam influência dependendo do revestimento. Observou-se que o abaixamento da temperatura de 300 K para 5 K leva a um aumento dos

valores da magnetização de saturação. Esse efeito pode estar relacionado a interações interpartículas superficiais preponderantes em baixas temperaturas.

Destarte, as medidas em espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis mostraram taxas de porcentagem de funcionalização inferiores a 11 % para o bioativo Clorambucil. As amostras recobertas com APTES obtiveram maior taxa de incorporação, o que pode ser explicado pela maior facilidade de realização de ligações de hidrogênio com grupamentos $-NH_2$.

7. REFERÊNCIAS

- AL-OWEINI, R. EL-RASSY, H. Synthesis and characterization by FTIR spectroscopy of silica aerogels prepared using several $\text{Si}(\text{OR})_4$ and $\text{R}_0\text{Si}(\text{OR})_3$ precursors. Department of Chemistry, American University of Beirut. 2008.
- ALCÂNTARA, G. B. Nanopartículas de maguemita complexadas com ácido oleico. Instituto de Física. UnB. 2007.
- ALMEIDA, et. al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não-específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. *Quim. Nova*, Vol. 28, No. 1, 118-129, 2005.
- ALVES, A. M. R. Desenvolvimento de nanopartículas magnéticas para tratamento de cancro: estudo da síntese e estabilização das soluções coloidais de Fe_3O_4 . Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. 2012.
- ARISAWA E. A. L. et. al. Efeitos colaterais da terapia antitumoral em pacientes submetidos à químico e à radioterapia. *Rev. biociên*, Taubaté, v11, n.1-2. p 55-61, jan./jun. 2005.
- BARBIE, D. A.; FRANK, D. A. **Farmacologia do Câncer: Síntese, Estabilidade e Manutenção do Genoma**. In: GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.; ARMSTRONG, E. J.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios de farmacologia – As bases fisiopatológicas da farmacologia** 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 37 - p. 631-653, 2009.
- BEAUCAGE, G. Approximations leading to a unified exponential/power-law approach to small-angle scattering, *Journal of Applied Crystallography*, 28 (1995) 6, 717–728.
- BRANDÃO, H. N. et. al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 6, 1359-1369, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Fármacos Utilizados em Neoplasia. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/livro_eletronico/neoplasia.html. Acesso em 10 de abril de 2014.
- BINI, R. A. Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxysilanes. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 324 (2012) 534–539.
- CAMILO, R. L. Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto recobertas por 3-aminopropiltriétoxissilano para uso como material híbrido em nanotecnologia. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. 2006.
- COSTA, T. P. et al. Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro: funcionalização de superfície com alcoxissilanos para controle de densidade de amina. Departamento de Físico-Química. UNESP. 2008.
- CRUZ, A. M. F. Utilização de sílica gel organofuncionalizada para adsorção de íons metálicos em solução aquosa. Centro de Ciências Exatas e da Terra. UFRN. 2009.

CRUZ, C. T. Et. al. Evidências sobre o Uso de Práticas Alternativas e Complementares no Tratamento Convencional de Neoplasias Mamárias. Laboratório de Pesquisa Qualitativa em Saúde. Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP. 2009.

DI ANTONIO et al. Reprogramming the Mechanism of Action of Chlorambucil by Coupling to a G-Quadruplex Ligand. *Journal of the American Chemical Society*. 2014, 136, 5860–5863.

FAHNING, B. M. LOBÃO E. B.. Nanotecnologia aplicada a fármacos. Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo. 2011.

FALLEIROS et. al. Aplicações da nanotecnologia no diagnóstico e tratamento de câncer. *Nucleus*, v.8, n.1, abr. 2011.

FEITOZA, N. C. et. al. Fabricação das nanopartículas de maghemita funcionalizada-glicina para remoção magnético de cobre a partir de águas residuais. *Journal of Hazardous Materials*. [Volume 264](#) , 15 de janeiro de 2014, Pages 153-160.

FERREIRA. R. V. Síntese e Caracterização de Nanopartículas Magnéticas Funcionalizadas com Núcleo Magnético de Magnetita. Departamento de Química. UFMG. 2009.

FLOREA-WANG, D. Reactions of Chlorambucil and its main metabolite, Phenylacetic Acid Mustard, with 2'-deoxyribonucleosides and Calf Thymus DNA; Turun Yliopisto. University of Turku, 2009.

GOYA, G. F. et. al. Magnetic nanoparticles for cancer therapy. *Current nanoscience*, Volume 4, Number 1, February 2008, pp 1-16(16).

GUPTA, A. K. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 2005. Jun;26(18):3995-4021.

HANNICKEL, A. Estudo de nanopartículas de magnetita obtidas pelos métodos de coprecipitação, biossíntese e moagem. Instituto Militar de Engenharia. Ministério da Defesa. 2011.

HIRATSUKA et. al. O processo SOL-GEL: Uma visão físico-química. *Química Nova*, 18(2); 1995.

HYEON-LEE, J. et al. Small angle X-ray Analysis of Nano-Powders. *Langmuir* 1998 , 14 , 5751-5756.

INCA. Instituto Nacional do Câncer; Ministério da Saúde. Incidência de Câncer no Brasil – Estimativa 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>>. Acesso em 02 de julho de 2014.

ISSA, B. Magnetic Nanoparticles: Surface Effects and Properties Related to Biomedicine Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2013 , 14 (11), 21266-21305.

JHAM, B. C; FREIRE, A. R. S. Complicações bucais da radioterapia em cabeça e pescoço. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* 72 (5), Setembro/Outubro. 2006.

KATZUNG, B. G. ***Farmacologia Básica e Clínica***. 10. ed. São Paulo: Editora Mcgraw-Hill Brasil, 2008.

KATZUNG, B. G et. al. ***Farmacologia básica e clínica***. 12. ed. Rio de Janeiro: Artmed/McGraw-Hill, 2014. 955 p.

LEON-FÉLIX, et. al., Synthesis and characterization of uncoated and gold-coated magnetite nanoparticles. Springer Science+Business Media Dordrecht 2013.

LYON, J. L. et. al. Synthesis of Fe Oxide Core/Au Shell Nanoparticles by Iterative Hydroxylamine Seeding. - *J. Am. Chem. Soc.* 2004;4 (4) 719-723. 2004.

MAINARDES, R. M. Desenvolvimento de nanopartículas de PLA e PLA-PEG para administração intranasal de zidovudina. Universidade Estadual Paulista. 2007.

MAMANI, J. B. Estrutura e Propriedades de Nanopartículas Preparadas via Sol-Gel. Instituto de Física, Universidade de São Paulo. 2009.

MÉNDEZ-VIVAR, J. MENDOZA-MANDALA, A. Spectroscopic study on the early stages of the polymerization of hybrid TEOS \pm RSi (OR)₃ sols. *Journal of Non-Crystalline Solids* 261 (2000) 127 \pm 136.

MORCELI, C. H. S. Síntese e caracterização de fluidos magnéticos à base de nanopartículas de óxidos dopadas com gadolínio e funcionalizadas com ADMS. Instituto de Química. UnB. 2009.

MIKHAYLOVA, M. et. al. BSA immobilization on amine-funcionalized superparamagnetic iron oxid nanoparticles. (2004) *Chemistry of Materials* 12(16).

PARREIRA, D. B; EUGENIO, J. Nanopartículas para aplicação oncológica. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. 2011.

PEGORETTI, V. C. Síntese e caracterização de ferritas dopadas com estanho. Departamento de Química – ICEX. UFMG. 2008.

PETRIN, M. R. A nanotecnologia e suas aplicações na área farmacêutica. Centro Universitário Feevale – Novo Hamburgo. 2006.

PETTERSSON-FERNHOLM, T. et. al. Reactions of 4-bis(2-chloroethyl)aminophenylacetic acid(phenylacetic acid mustard) in physiological solutions. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1999, 2183–2187.

RODRIGUES, F. S. S; POLIDORI, M. M. Enfrentamento e Resiliência de Pacientes em Tratamento Quimioterápico e seus Familiares. *Revista Brasileira de Cancerologia*; 58(4): 619-627. 2012.

SHARMA, P. et. al. Formulation and pharmacokinetics of lipid nanoparticles of a chemically sensitive nitrogen mustard derivative: Chlorambucil. *International Journal of Pharmaceutics* 2009; 367:187-194.

SCHLOSSER, T. C. M. CEOLIM, M. F. Qualidade de vida de pacientes com câncer no período de quimioterapia. Texto e contexto enferm. vol.21 no.3 Florianópolis jul/set 2012. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0104-07072012000300015&script=sci_arttext>. Acesso em 18 de julho de 2013.

SREEJA, V. JOY, P. A. “Effect of inter-particle interactions on the magnetic properties of magnetite nanoparticles after coating with dextran” Int. J. of Nanotechnology, 2011 Vol.8, No.10/11/12, pp.907 – 915.

TARIQ, M. ABDULLAH, A. A. **Analytical Profiles of Drug Substances**. Vol. 16. Pages 85-118. Ed. Harry G. Brittain. 1987.

WHO. Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso em 01 de maio de 2014.

ZHANG, C. et. al. Silica and alkoxysilane coated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles: a promising tool to label cells for magnetic resonance imaging. Langmuir (2007) Jan 30,23,(3):1427-34.

ZHANG, D. et. al. Fabrication and characterization of hollow Fe₃O₄ nanospheres in a microemulsion. Materials letters (2008). Vol 62(64):4053-4055.

