**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)**

TATIANA APARECIDA VERISSIMO PEREIRA

# Nanopartículas de óxidos de ferro e de nióbio com diferentes recobrimentos: síntese, caracterização e avaliação do potencial biológico

**Versão Corrigida da Tese**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

**05/10/2018**

TATIANA APARECIDA VERISSIMO PEREIRA

# Nanopartículas de óxidos de ferro e de nióbio com diferentes recobrimentos: síntese, caracterização e avaliação do potencial biológico

*Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências biológicas (Bioquímica)*

Orientador: Prof. Dr Mauricio da Silva Baptista
Co orientadora: Prof.ª Drª Liane Marcia Rossi

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

P436n

Pereira, Tatiana aparecida Verissimo
Nanopartículas de óxidos de ferro e de nióbio com diferentes recobrimentos: síntese, caracterização e avaliação do potencial biológico / Tatiana aparecida Verissimo Pereira. - São Paulo, 2018.
104 p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador: Baptista, Maurico da Silva
Coorientador: Rossi, Liane Marcia

1. Nanopartículas. 2. Nanopartículas. 3. Óxido de Nióbio. 4. Potencial Biológico. 5. Citotoxicidade.. I. T. II. Baptista, Maurico da Silva, orientador. III. Rossi, Liane Marcia, coorientador.

Dedico este trabalho à minha mãe, aquela quem realmente somos uma só, estamos unidas por toda a eternidade. Seu amor, amizade e companheirismo são essências para a minha vida.
Ao meu pai, quem me deu oportunidade da vida.

*“O sucesso não tem a ver com quanto dinheiro você ganha, mas com a diferença que você faz na vida de outras pessoas.”*

Michelle Obama

## AGRADECIMENTOS

Os meus primeiros e sinceros agradecimentos sempre serão para Deus e meu anjo da guarda, aqueles que não dormem, sempre estão de olhos voltados para meu auxilio e proteção.

Para minha mãe, só nós sabemos o quanto foi difícil chegarmos aqui (sim, chegarmos porque esse momento também é dela), poderia passar uma tese toda falando sobre nossa relação e ainda assim, poucos entenderiam.

Para meus orientadores, professor Dr. Maurício e professora Drª Liane, meu pais científicos, sempre quando um faltou, o outro esteve presente. Sou eternamente grata pela confiança, apoio e compreensão comigo. Vocês foram verdadeiros orientadores e formadores para que eu hoje seja uma profissional ainda mais completa na formação científica, crítica e mais ainda como ser humano, vocês me mostraram que ainda é possível encontrar pessoas boas em meio a situações adversas.

Ao professor Juan (Tito) Scaiano, pela oportunidade de aprender ainda mais sobre o mundo das nanopartículas, além do aprendizado cultural.

Ao meu pai, minha irmã (Alessandra) e minha sobrinha (Ana Carolina) obrigada pela oportunidade da vida, sei o quanto ficam felizes pelas minhas vitórias.

Ao Leandro, meu amor, foram momentos muito difíceis e você, ao seu modo, o qual às vezes não compreendendo me ajudou e me impulsionou. Não me deixou estacionar, esse momento também é um pouco seu.

Aos meus amigos do laboratório e da vida, Marco, Fernanda, Tiago Rosa, obrigada pelas risadas, pelos churrascos e compartilharem de momentos difíceis seus e meus também, sei que estamos unidos por um laço muito fraterno e de muito carinho.

As técnicas de laboratório da prof.ª Drª Liane, Fabiane e Suzana, vocês eram minhas companheiras todas as manhãs, sempre me impulsionando e não me deixando esmorecer.

Ao meu amigo/parceiro Jhonatan, você é um vencedor, sua humildade e alegria eram bênçãos que eu recebia ao chegar no laboratório nesses últimos tempos. Você sabe que sempre poderá contar comigo, suas conquistas são minhas porque eu fico feliz como você!!! O céu não será o limite para você.

Aos colegas do grupo da professora Drª Liane, Ofélia, Rerison, Karla, Adriano, Camila, aproveitem muito todo conhecimento que a nossa orientadora tem, vejam o lado humano dela e se inspirem nas possibilidades. Vejo em vocês a continuidade de alegria e conhecimento do grupo.

Ao grupo do professor Dr. Mauricio, Waleska, Cristiane, Orlando, Naíra, Alice, Dani, Raoult, Tayana, Mariana, Isabel, Cleidiane, Larissa, Ingrid, Luana, Tiago, Paulo, Felipe, Carol, Helena e Alessandra muito obrigada pelo apoio e pelo incentivo. Angela e Aline em especial vocês foram muito importantes nesses tempos finais.

Ao todo corpo técnico-administrativo do Instituto de Química - USP, em especial ao Milton e Cibele que sempre me ajudaram com toda documentação e com dicas, antecipando possíveis problemas.

Meu carinho especial para Doris, técnica sempre com palavras de incentivo e amor.

Ao grupo do professor Scaiano, Christopher, Spencer, Has, Daniela, Michel, muito obrigada pelos ensinamentos e descoberta de um país maravilhoso que é o Canadá. Estar no Canadá foi um período mágico e indispensável na minha formação profissional e pessoal.

Aos meus amigos de UNESP/Araraquara, Rodolfo (Pelé), Alan (Jatobá), Tiago Varão, Leonardo (Chuck), Marcelo, Renan (Tico), vocês são minha família, podemos estar distantes, mas as risadas são garantidas e apoio também, a universidade me trouxe vocês e sou muito grata por ter estudado em Araraquara, esse lugar realmente é especial pra mim.

Aos meus familiares tia Bela, tio Neto, primos Renata, André somos parceiros de vida, sou muito grata a vocês.

Aos meus amigos/familiares do período de Canadá, Jéssica, Thais, Andrey, Mário Lopez, Ryann, Gustavo Freire, Sol, Mayra, Felipe, Andres e Loretto, vocês me ajudaram a me sentir em casa e fizeram a minha adaptação mais fácil.

Obrigada às agências de fomento, Fundo de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPQ/INCT), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Ciências Sem Fronteiras (CNPQ/CsF), por tornar essa pesquisa possível.

## RESUMO

**Pereira, T.A.V. Nanopartículas de óxidos de ferro e de nióbio com diferentes recobrimentos: síntese, caracterização e avaliação do potencial biológico.** 2018. 104p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nanopartículas (NPs) tem ganhado notoriedade crescente em aplicações biomédicas. Podendo ser constituídas de diversos materiais, NPs tem sido empregadas como agentes de contraste, na liberação direcionada e controlada de fármacos, em terapia para tratamento de câncer, em catálise heterogênea, entre outras aplicações. As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (MNP) destacam-se pela multiplicidade de aplicações, apesar de serem pouco caracterizadas quanto à toxicidade celular. Outras nanopartículas com excelente potencial são as constituídas de óxido de nióbio (NbONPs), as quais merecem atenção especial, pois o Brasil é detentor de 98% das reservas comercialmente viáveis deste elemento. Neste trabalho NPs destes dois metais de transição (ferro e nióbio) foram sintetizadas, almejando entender suas interações com materiais, biomoléculas e meios biológicos. Diversas metodologias foram desenvolvidas e testadas com intuito de otimizar a morfologia e o rendimento da preparação, resultando na escolha de decomposição térmica para MNP e, para NbONPs, escolheu-se a impregnação do óxido de nióbio sobre uma matriz de MNPs recobertas com sílica. No caso das MNPs, procedeu-se ao recobrimento das mesmas com lipídeos zwitteriônicos (Dioleilfosfatidilcolina (DOPC)) e carregados positivamente (Brometo de dioctadecildimetilamônio (DODAB)). Foram inicialmente caracterizadas as suas propriedades em diversos ambientes biológicos para posteriormente realizarmos ensaios de citoxicidade em queratinócitos humanos (HaCaT). Avaliamos também a degradação das NPs em diferentes pH, bem como, a interação das mesmas com membranas miméticas de vesículas gigantes unilamelares (GUVs - *Giant Unilamellar Vesicles*), com visualização microscópica. As MNPs recobertas com DODAB mostraram-se mais tóxicas para os queratinócitos em cultura e também causaram lise das GUVs. No caso das NbONPs, avaliou-se a acidez proveniente do $Nb_2O_5$ e o seu potencial em catálise heterogênea, bem como a avaliação da citotoxicidade em HaCaT revelou um potencial uso biomédico.



**Palavras-chave: Nanopartículas. Nanopartículas. Óxido de Nióbio. Potencial Biológico. Citotoxicidade.**

## ABSTRACT

Pereira, T.A.V. **Iron oxide nanoparticles with different coatings and niobium oxide nanoparticles: synthesis, characterization and assessment of biological potential.** 2018. 104p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nanoparticles (NPs) have received increasing attention in biomedical applications. NPs can be constituted by different materials and have been used as contrast agents, in drug delivery, in cancer therapy, in heterogeneous catalysis, among other applications. Magnetic iron oxide nanoparticles (MNP) are notable for their multiplicity of applications, although they are poorly characterized for cellular toxicity. Other nanoparticles with excellent potential are made of niobium oxide (NbONPs), which deserve special attention, since Brazil holds 98% of the commercially viable reserves of this element. In this Thesis, NPs of these two transition metals (iron and niobium) were synthesized, aiming to understand their interactions with materials, biomolecules and media biological. Several methodologies were developed and tested to optimize the morphology and yield of the preparation, resulting in the choice of thermal decomposition for MNPs and, for NbONPs, the impregnation of niobium oxide on a matrix of silica-coated MNPs. In the case of MNPs, they were also coated with lipid zwitterionics (Dioleoyl phosphocholine (DOPC)) and positively charged (Dimethyldioctadecylammonium bromide (DODAB)) lipids. Its properties were initially characterized in several biological environments for later cytotoxicity assays in human keratinocytes (HaCaT). It evaluated the degradation of the NPs in different pH, as well as their interaction with giant unilamellar vesicle (GUVs) mimetic membranes, with microscopic visualization. MNPs coated with DODAB were more toxic to keratinocytes in culture and caused lysis of GUVs. In the case of NbONPs, acidity from $Nb_2O_5$ was evaluated in heterogeneous catalysis, as well as the evaluation of HaCaT cytotoxicity revealed a potential biomedical use.



**Keywords: Nanoparticles. Iron Oxide. Niobium Oxide. Biological Potential. Cytotoxicity.**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| $\gamma$-$Fe_2O_3$ | Magnemita |
| ACAC | Acetilacetonato |
| ACN | Acetonitrila |
| AO | Ácido Oleico |
| APT | Aspartame |
| BA | Álcool Benzílico |
| $C_4H_4NNbO_9.xH_2O$ | Oxalato de Nióbio (V) e Amônio Hidratado |
| CA | Calceína |
| CDE | Endocitose Dependente da Mediação por Clatrina |
| CF | Carboxifluoresceína |
| $CHCl_3$ | Clorofórmio |
| CHOL | Colesterol |
| CIE | Endocitose Independente da Mediação por Clatrina |
| COMPO | Modo de aquisição de imagem de elétron retroespalhado |
| Cup | N-nitrosofenilhidroxilamina |
| DA | Dopamina |
| DDO | Deoxigenação Direta |
| DLS/ELD | Espalhamento de Luz Dinâmico |
| DLVO | Teoria de Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek |
| DMEM | Meio de Cultura Modificado da Dulbecco |
| DMSO | Dimetil Sulfóxido |
| DODAB | Brometo de dioctadecildimetilamônio |
| DOPC | Dioleilfosfatidicolina |
| EDTA | Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético |
| EL | Energia de Ligação |
| etOH | Etanol |
| eV | Elétron Volt |
| Fe | Ferro |
| $Fe(SO_4)NH_4$ | Sulfato Ferroso Amoniacal |
| $Fe_3O_4$ | Magnetita |
| $FeCl_2.4H_2O$ | Cloreto de Ferro (II) Tetraidratado |
| FRS | Fator relativo de sensibilidade |

| | |
|---|---|
| GTP | Guanina Trifosfato |
| GUV | Vesículas Unilamelares Gigantes |
| $H_2O_2$ | Peróxido de Hidrogênio |
| HaCaT | Queratinócitos Normais Imortalizados Humano |
| HDO | Hidrodeoxigenação |
| HEPES | Ácido 2-[(4-(Hidroxietil)1-Piperazina]-Etanosulfônico |
| HNE | 4-Hidroxi-2-Nonenal |
| I-907 | Irgacure 907 |
| $IC_{50}$ | Concentração Inibitória de 50% das células |
| $KH_2PO_4$ | Fosfato Monopotássio |
| $\vec{M}$ | Campo Magnético Externo |
| M | mol/L |
| MDA | Malondialdeido |
| MET | Microscopia Eletrônica de Transmissão |
| Meu | Sistema Magnético de Unidade |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| min | Minutos |
| mJ | Mili Joules |
| ML | Magnetolipossomo |
| mM | Mili Molar |
| MNPs | Nanopartículas Superparamagnéticas de Ferro |
| Ms | Magnetização de Saturação |
| MTT | Brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-Ddiazolil)-2,5-Difenil-2H-Tetrazolio) |
| mV | Mili Volt |
| $Na_2HPO_4$ | Fosfato Dissódico |
| $Na_3C_6H_5O_7$ | Citrato de sódio |
| $Na_3C_6H_5O_7$ | Citrato de Sódio |
| $NaBH_4$ | Boroidreto de Sódio |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NaOH | Hidróxido de Sódio |
| Nb | Nióbio |
| $Nb(acac)_5$ | Acetilacetonato de Nióbio |

| | |
|---|---|
| $Nb(OEt)_5$ | Etóxido de nióbio (V) |
| $Nb_2O_5$ | Pentóxido de Nióbio |
| $NbCl_5$ | Cloreto de Nióbio (V) |
| NbONPs | Nanopartículas de Óxido de Nióbio |
| NbONPs | Nanopartículas de Pentóxido de Nióbio |
| $NH_4OH$ | Hidróxido de Amônia |
| NPIs | Nanopartículas Inorgânicas |
| NPs | Nanopartículas |
| OC | Onda de Choque |
| $OH^{\bullet}$ | Radicais Hidroxilas |
| OLA | Oleilamina |
| PBS | Tampão Fosfato |
| PEG | Polietilenoglicol |
| POPC | 1-Palmitoil-2-Oleioil-*SN*-Glicero-3-Fosfocolina |
| R58 | Cumarina |
| RE | Retículo Endoplasmático |
| ROs | Espécies Reativas de Oxigênio |
| RPM | Rotações por Minuto |
| SANS | Espalhamento de Nêutrons |
| SAX | Espalhamento de Raios X a Baixo Ângulo |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| T | Tempo |
| TEOS | Tetraetilortosilicato |
| XPS | Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X |
| $\zeta$ | Potencial Zeta |

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de endocitose e suas etapas: endocitose dependente de clatrina (CDE), endocitose independente de clatrina (CIE) e fagocitose. 1) Iniciação, 2,3) Seleção de Cargas e Fusão dos endossomas iniciais e tardios; 4) Envio das partículas endocitadas para o exterior celular e , 5) Chegada do endossoma tardio ao lisossomo. .....22
Figura 2. Estrutura cristalina da Magnetita .....25
Figura 3. Momento dipolar de materiais paramagnéticos macroscópicos (esquerda) e nanométricos com comportamento de mono domínio. .....26
Figura 4. Esquema de degradação das NPs de Fe no lisossomo e possíveis alvos para reativos para os íons de Fe liberados pós degradação lisossomal .....27
Figura 5. Esquema da utilização do método de *laser ablation.* (A) Material usado para a preparação de NPs por *laser ablation*. (B) Suspensão de NPs estabilizadas em água obtidas após *laser ablation*. (C) Esquema e instrumentação empregada na preparação de NPs por *laser ablation* seguida por (D) *laser drop*.....31
Figura 6. Representação de magnetolipossomos (MLs). (A) MLs clássicos e (B) MLs extrudido. A cor cinza escura representa a bicamada lipídica e a cor cinza claro representa nanopartículas de óxido de ferro .....33
Figura 7. Estrutura cristalina das formas do $Nb_2O_5$. Pseudohexagonal TT-$N_2O_5$ (a); Ortorrômbica T- $Nb_2O_5$ (b,d); Monoclínica H- $Nb_2O_5$ (c,e). .....35
Figura 8. Estrutura e organização de lipídios (esquerda) e lipossomos (direita) .....37
Figura 13. Perfil de comportamento das cargas líquidas superficiais das MNPs em função do pH realizadas em solução de NaCl 0,1 mM, sendo tituladas com NaOH. 55
Figura 19. Curva de decaimento da intensidade de fluorescência da calceína em função da quantidade de íons Fe livre .....65
Figura 21. Redução do MTT ao cristal de Formazan .....68
Figura 22. Curva de viabilidade celular. a) MNP@DOPC em meio com 1% (linha preta) e 10% (linha vermelha) de SFB; b) MNP@DODAB em meio com 1% (linha preta) e 10% (linga vermelha) de SFB.....69
Figura 23. Esquema da síntese pela metodologia fotoquímica .....71
Figura 24. Imagem obtida por MEV das NbONPs sintetizadas por método fotoquímico. Imagem por método COMPO (B), método SEM (A), histograma (abaixo). .....73

Figura 25. Imagens de microscopia eletrônica; a) usando citrato de sódio como agente redutor (TEM) e (b) usando boroidreto de sódio, como agente redutor (SEM) .....75
Figura 31. Etapas de reação de hidrodeoxigenação (HDO).....85
Figura 32. Curva de viabilidade celular das $Fe_3O_4$@$SiO_2$ em cultivo de células com meio 1% SFB (linha vermelha) e 10% SFB (linha preta).....87
Figura 33. Curva de viabilidade celular das $Fe_3O_4$@$SiO_2$@NbONPs em cultivo de células com meio 1% SFB (linha vermelha) e 10% SFB (linha preta).....87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de DLS das MNPs sintetizadas por *laser drop* estabilizadas em água .....62
Tabela 2. Dados de DLS das MNPs sintetizadas por *laser drop* estabilizadas em solução APT 8 µM .....62
Tabela 3. Dados de concentração de Fe livre a partir das MNP@DOPC e MNP@DODAB em função do tempo de incubação em pH 4,5 e 7,4 .....65
Tabela 4. Energias de ligação obtidas a partir do espectro de XPs analisando no programa CasaXPs .....73
Tabela 5. Energias de ligação obtidas a partir do espectro de XPs analisando no programa CasaXPs .....75
Tabela 6. As medidas de DLS realizadas em triplicadas.....81
Tabela 7. As medidas de DLS realizadas em triplicadas quando se usou DA como molécula estabilizante .....82
Tabela 8. As medidas de DLS realizadas em triplicadas calcinadas.....82
Tabela 9. As medidas de DLS realizadas em triplicadas quando se usou DA como molécula estabilizante e pós calcinação.....83
Tabela 10. Resultados da reação de hidrodeoxigenação (HDO) com uso de diferentes catalisadores. .....86

**SUMÁRIO**

1 INTRODUÇÃO ..... 19
1.1 Interação de NP com sistemas biológicos 20
1.2 Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (MNPs) 25
1.3 Métodos de obtenção de nanopartículas de óxido de ferro 28
1.3.1 Coprecipitação ..... 28
1.3.2 Microemulsão ..... 29
1.3.3 Decomposição térmica ..... 29
1.3.4 Método físico: *laser ablation* ..... 30
1.4 Magnetolipossomos (MLs) 31
1.5 Nanopartículas de óxido de nióbio (NbONPs) 34
1.6 Sistema miméticos de membranas 36
2 OBJETIVOS GERAIS ..... 39
2.3 Objetivos específicos 39
3 MATERIAIS E MÉTODOS ..... 40
3.3 Materiais reagentes 40
3.4 Equipamentos 41
3.4.2 Equipamentos utilizados para a síntese e caracterização das MNPs e NbONPs 41
3.4.3 Equipamentos de cultura celular ..... 42
3.4.4 Equipamentos usados na síntese de nanopartículas por ablação a laser .. 42
3.4.5 Equipamento usado na síntese de nanopartículas por metodologia fotoquímica 43
3.5 Síntese das nanopartículas magnéticas (MNPs) 43
3.5.2 Síntese de MNPs pela metodologia de decomposição térmica ..... 43
3.5.3 Síntese de MNPs por laser ablation seguidas por *laser drop* ..... 43
3.5.4 Síntese das MNPs pela metodologia de coprecipitação ..... 44
3.6 Transferência de MNPs de meio orgânico para meio aquoso 44
3.7 Funcionalização das MNPs provenientes da metodologia de coprecipitação 45
3.7.2 Funcionalização das MNPs com $SiO_2$ (MNP@$SiO_2$) ..... 45

3.8 Degradação das MNPs em diferentes pHs 45

3.9 Interação das MNPs com membranas miméticas 46

3.10 Cultivo celular 46

3.11 Viabilidade celular pela metodologia de MTT 47

3.12 Síntese de nanopartículas de pentóxido de nióbio (NbONPs) 47

3.12.1 Síntese de NbONPs pela metodologia fotoquímica ..... 47

3.12.2 Síntese de NbONPs pela metodologia sol-gel ..... 48

3.12.3 Síntese de NbONPs pela metodologia de controle de pH ..... 48

3.12.4 Síntese de NbONPs pela metodologia solvotérmico ..... 48

3.13 Depositando NbONPs em suporte de magnetita recobertas com sílica ($Fe_3O_4$@$SiO_2$@NbONPs) 49

3.14 Avaliação da presença de sítios ácidos nas $Fe_3O_4$@$SiO_2$@NbONPs 49

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....50

4.1 Óxido de Ferro 50

4.1.1 Síntese, funcionalização e estudo das nanopartículas de óxido de ferro (MNP) 50

4.1.2 Funcionalização das MNPs provenientes da decomposição térmica e estabilidade das MNP@DODAB e MNP@DOPC ..... 53

4.1.3 Estabilidade das MNPs sintetizadas por *laser ablation* quando utilizada a metodologia do *laser drop* ..... 59

4.1.4 Degradação das MNPs em pH fisiológicos ..... 62

4.1.5 Interação das MNPs com modelos de membrana (membranas miméticas) 66

4.1.6 Estudos de viabilidade celular..... 68

4.2 Pentóxido de Nióbio 70

4.2.1 Preparação de nanopartículas de pentóxido de nióbio (NbONPs) pela metodologia fotoquímica..... 71

4.2.2 Síntese de NbONPs usando o método sol-gel..... 74

4.2.3 Preparação de NbONPs pela metodologia de controle de pH..... 77

4.2.4 Preparação de NbONPs pela metodologia solvotérmico..... 79

4.2.5 Síntese das NbONPs suportadas em nanopartículas de óxido de ferro (MNPs) recobertas com sílica ($Fe_3O_4$@$SiO_2$)..... 83

4.2.6 Viabilidade celular das NbONPs suportadas em $Fe_3O_4$@$SiO_2$..... 86

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....89

5.2 Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (MNPs) 89

5.3 Nanopartículas de Óxido de Nióbio 90

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....92

# 1 INTRODUÇÃO

Embora o uso do termo seja recente, a preparação de nanopartículas (NPs) já era conhecida desde o século IV quando estas eram usadas para pigmentar adornos domésticos, como, por exemplo, vasos sofisticados de decoração que mudavam de cor dependendo da condição, ou seja, normalmente eram verde mas, quando iluminados pelo sol, mudavam sua coloração para vermelho. No entanto, foi somente no final da década de 1950 que as NPs ganharam notoriedade para fins tecnológicos. A aula seminal do físico Richard Feynman, na *American Physical Society*, intitulada *"There's Plenty of Room at the Bottom"* causou uma mudança de paradigma e estabeleceu condições para que cientistas começassem a considerar a manipulação de átomos e moléculas para construir máquinas na escala nanométrica (FEYNMAN, 1992). Para fins biológicos, as primeiras NPs estudadas foram a base de acrilato visando a produção de vacinas e entrega de drogas (KREUTER, 2007).

NPs são definidas como materiais com pelo menos uma das suas dimensões na escala de tamanho entre 1-100 nm, embora mais do que o tamanho, há um consenso com relação à definição de NPs como sendo materiais que apresentam propriedades únicas e distintas do material mássico de origem. NPs podem ser constituídas de materiais poliméricos, cerâmicos e metálicos. As aplicações são muito diversas incluindo catálise, biosensores, entrega de fármacos, mobilizadores de proteínas, etc. (BHATTACHARYYA et al., 2018; GALDINO et al., 2017; LIU; CHEN; SHI, 2018).

Na esfera das ciências básicas, a revolução da nanotecnologia tem impulsionado muitos estudos sobre as propriedades das NPs em ambientes biológicos. A aplicação de nanopartículas inorgânicas (NPIs), tais como nanopartículas de óxido de ferro, na medicina aumentou enormemente devido à grande diversidade de estruturas, propriedades e as diferentes aplicações possíveis (BAGHERPOUR et al., 2008; CHAN et al., 2002; HAN; GHOSH; ROTELLO, 2007). De fato, há uma grande versatilidade em aplicações biomédicas, sendo extensivamente utilizadas como agentes de contraste não invasivo (imageamento em medicina), liberação direcionada e controlada de fármacos, ou mesmo em terapia para tratamento de câncer (HAHN et al., 2011; RAO et al., 2015). Desta forma, neste trabalho foram escolhidos dois tipos principais de NPs constituídas de dois metais de transição diferentes, Ferro (Fe) e Nióbio (Nb), almejando entender suas interações com sistemas biológicos.

As nanopartículas de óxido de ferro estão entre as mais comumente empregadas em nanotecnologia por permitirem a construção de materiais magnéticos que são facilmente sintetizados. Mesmo assim, muito pouco tem sido caracterizado quanto à toxicidade destas NPs. Grande parte das publicações de NPs de óxido de ferro são para o estudo de hipertermia magnética (LIAO et al., 2011; HEDAYATNASAB et al., 2017), ou para aplicações como marcadores biológicos, entrega de fármacos, imobilização de drogas, terapia fotodinâmica (TADA; BAPTISTA, 2015; WANG et al., 2018).

Já o nióbio tem um interesse particular para o Brasil que é detentor de 98% das reservas comercialmente viáveis conhecidas de nióbio e, consequentemente, é responsável pela grande maioria da produção deste metal (>90% ou 58.000 toneladas). A demanda global por nióbio tem sido impulsionada pela necessidade de aço de alta qualidade nas indústrias de construção, petróleo, automotiva, construção naval e aeronáutica (CORDEIRO et al., 2011). O nióbio é um dos ácidos de Lewis mais fortes que se tem conhecimento, permitindo a sua utilização em nanomateriais para catálise (MALYSHEV et al., 2013; LUISA MARIN et al., 2014). Devido à sua estabilidade, especialmente a frente dos fluidos e células corporais, o nióbio também tem possibilitado o desenvolvimento de próteses, fios cirúrgicos, joias e *piercings* melhoradas(TSANG et al., 2012). Encontrar novas aplicações para o nióbio beneficiaria enormemente o nosso país, criando novos mercados, de tal forma que estudos nesta linha têm interesse estratégico.

## 1.1 Interação de NP com sistemas biológicos

Antes de apresentar as especificidades dos dois materiais escolhidos para serem modelos de NPs, devemos primeiramente definir aspectos genéricos da interação de NPs com células.

Uma das primeiras dificuldades da internalização das NPs nas células é sua interação com biomoléculas presentes no ambiente biológico (incluindo os meios de cultura utilizados em estudos *in vitro*). Biomoléculas tendem a interagir com a superfície das NPs auxiliando e criando um ambiente favorável ou desfavorável para as NPs. As proteínas coronas, assim chamadas aquelas que se ligam à superfície das NPs, aumentam o diâmetro hidrodinâmico ao serem adsorvidas ao redor das NPs e

modificam suas características superficiais, induzindo a captação pelas células por uma via diferente do que poderia ser predito (ALBANESE et al., 2014; LESNIAK et al., 2013).

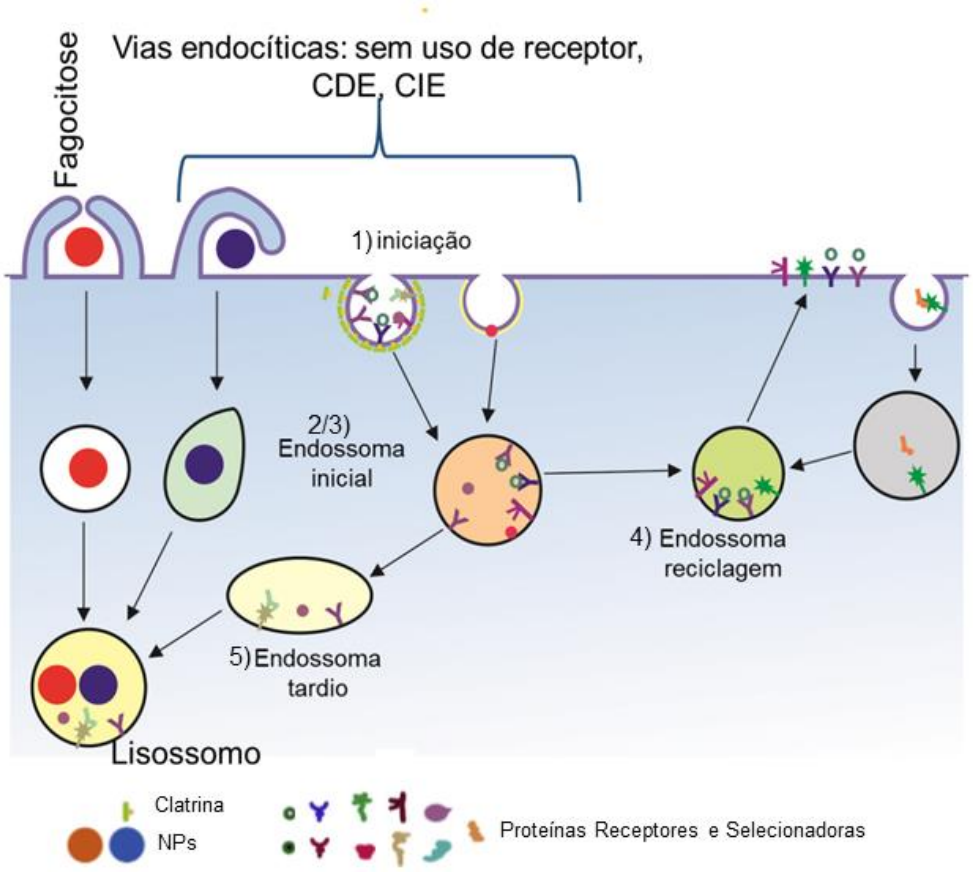
As propriedades químicas das NPs não são alteradas apenas por conta das proteínas corona, mas também pela concentração de íons ali presentes, uma vez que a força iônica blinda as cargas superficiais e diminui o raio de ação do potencial de superfície, que estabilizam as NPs em solução (MOORE et al., 2015a).

A internalização celular, genericamente chamadas de endocitose, é conhecida como o processo de trazer para o interior das células substâncias que podem ser tanto NPs quanto nutrientes diversos e, em certos casos, até de outras células , baseia-se em mecanismos celulares que são fundamentais para a manutenção da homeostase celular (OH; PARK, 2014).

Os estudos sobre este processo tiveram início nos anos 80 e 90, em particular com estudos de receptores de células tumorais (XU et al., 2013). Inicialmente foi um processo descrito somente para células do sistema imune (macrófagos) o qual se denominou fagocitose. Porém, mais recentemente, se estabeleceu que esse mecanismo está presente na grande maioria das células eucarióticas (HAUCKE, 2015; KAKSONEN; ROUX, 2018). Neste processo, o material a ser ingerido é progressivamente incluso por uma pequena porção da membrana citoplasmática, a qual primeiro invagina-se para formar a vesícula endocítica contendo a partícula ou célula a ser ingerida (GEVENSLEBEN et al., 2010). A via endocítica depende dos receptores (proteínas transmembranas) contidos na membrana plasmática quem estabelece a seleção das substâncias a serem internalizadas em função do tamanho, carga, toxicidade e afinidade. Dentre as múltiplas vias existentes (Figura 1) destaca-se:

- Endocitose independente da mediação por clatrina (CIE)
- Endocitose dependente da mediação por clatrina (CDE)
- Fagocitose/Pinocitose

Figura 1. Vias de endocitose e suas etapas: endocitose dependente de clatrina (CDE), endocitose independente de clatrina (CIE) e fagocitose. 1) Iniciação, 2,3) Seleção de Cargas e Fusão dos endossomas iniciais e tardios; 4) Envio das partículas endocitadas para o exterior celular e , 5) Chegada do endossoma tardio ao lisossomo.




Fonte: Adaptado de XU et al., 2013.

Os processos de internalização podem ser ou não seletivos, como no caso da CIE que tem sido largamente estudada nos últimos anos devido à entrada de muitas toxinas bacterianas e outras proteínas de superfícies. A endocitose consiste basicamente em 5 fases (MCMAHON; BOUCROT, 2011):

**1) Iniciação**: a ligação do substrato a um receptor presente na membrana citoplasmática ativa a sinalização para que seja formada a vesícula que englobará o substrato. Esta vesícula poderá ser revestida por uma rede composta por uma proteína denominada clatrina, no caso da CDE ou não (CIE).

**2) Seleção de cargas:** as proteínas do suposto módulo de nucleação recrutam os adaptadores específicos da carga da molécula ingerida, que se agrupam a outras proteínas adaptadoras de carga específica mediando a seleção de cargas. O lúmen das vesículas passa a ser acidificado pela ATPase-$H^+$ e incorporado no interior das vesículas. Na CDE, quando os adaptadores AP2 são impedidos de se ligarem ao complexo das vesículas, as mesmas não se formam e as vesículas ficam colocalizadas no complexo de nucleação, porém sem maturação.

**3) Cisão das vesículas:** acontece através das proteínas de choque térmico. Este mecanismo não está totalmente claro, mas sabe-se que quando ocorre a hidrólise das GTP ocorre uma mudança conformacional na enzima que auxilia na mediação da cisão. Nesta fase, para a via CDE, uma vez que o revestimento de clatrina foi separado das vesículas ele será enviado de volta ao estado monomérico por choque térmico ATPase, permitindo a vesícula fundir-se para o endossoma inicial. Assim, desrevestidas as vesículas são fusionadas ao endossoma inicial, a primeira grande organela pós-via endocítica.

**4) Classificação das cargas das membranas e classificação das proteínas pós-endocitose:** neste momento, no endossoma inicial com baixo pH (próximo de 6), ocorre a dissociação de alguns receptores dos seus ligantes e as proteínas serão classificadas entre as que serão recicladas (enviadas ao endossoma de reciclagem) ou degradadas (enviadas ao endossoma final para então se fundir aos lisossomos ou exportada da célula).

**5) Chegada dos endossomas iniciais aos endossomas de tardios:** nesta fase o endossoma inicial e o endossoma tardio são fusionados, sendo feita a triagem da substância endocitada para o destino; seja para o exterior, para o complexo de Golgi ou para o lisossomo.

Um exemplo importante da via CIE, é a internalização de glicose, estudada em células musculares e adiposas, que utiliza receptores de glicose, GLUT4. Embora possa ser vista a internalização de glicose em CDE, em CIE a GLUT, que em níveis basais se encontra em vesículas no interior celular, é ativada por insulina e é transcolada para a membrana plasmática para a obtenção de açúcares (AL-HASANI; HINCK; CUSHMAN, 1998; AOH; GRAVES; DUNCAN, 2011). Em células cancerosas essas proteínas são super expressadas devido ao

seu alto estado de proliferação e necessidade de geração de energia (GANAPATHY; THANGARAJU; PRASAD, 2009).

Para estudos de endocitose, as NPs devem ser obtidas com elevado controle de morfologia (tamanho, forma e distribuição de tamanhos), composição e propriedades de superfície. A presença e o tipo de cargas superficiais podem determinar os ligantes na superfície da membrana e a via pela qual a célula fará a internalização. De fato, diversos artigos mostraram que as cargas podem determinar a via endocítica através da qual a NP será internalizada (HARUSH-FRENKEL et al., 2008; SAHAY; ALAKHOVA; KABANOV, 2010). Geralmente, as cargas negativas seguem a via dependente e independente de clatrina com velocidades de captação menores, enquanto que as NPs de carga positiva como aminas, seguem exclusivamente a via CDE e têm apresentado melhores taxas para captação celular quando comparadas com NPs cargas neutras (HARUSH-FRENKEL et al., 2007, 2008). Quando se trata de NPs com cargas neutras ainda não está elucidada qual via será preferencial.

Quanto ao tamanho, para que as NPs sejam captadas via endocitose é necessário que elas possuam entre 10 e 100 nm, porém, há indícios que o efeito de tamanho ainda é menor do que o da composição química (HARUSH-FRENKEL et al., 2007, 2008; OH; PARK, 2014).

A citotoxicidade das NPs também está relacionada a seu material de constituição. Muitas vezes, NPs constituídas de materiais inertes (como sílica, por exemplo), que deveriam atuar apenas como suporte para imobilização, acabam causando toxicidade inesperada devido o modo de interação com os tecidos biológicos (NAPIERSKA et al., 2010).

Para diferentes tipos de recobrimentos a toxicidade também varia conforme descrito de forma abrangente no artigo de revisão de BAHADAR et al. (2017). O estudo da nano-toxicologia deve sempre ter em mente os diversos momentos em que as NPs podem desencadear processos toxicológicos.

De fato, pouco se sabe sobre as vias de entrada de NPs e das respectivas consequências toxicológicas, o que torna muito importante os estudos dos mecanismos de internalização de NPs em células e dos efeitos na homeostase celular. Estudos em células e em outros sistemas miméticos têm trazido dados relevantes para o desenvolvimento de NPs otimizadas (HIMMELREICH; DRESSELAERS, 2009). Neste trabalho, realizamos estudos de avaliação de

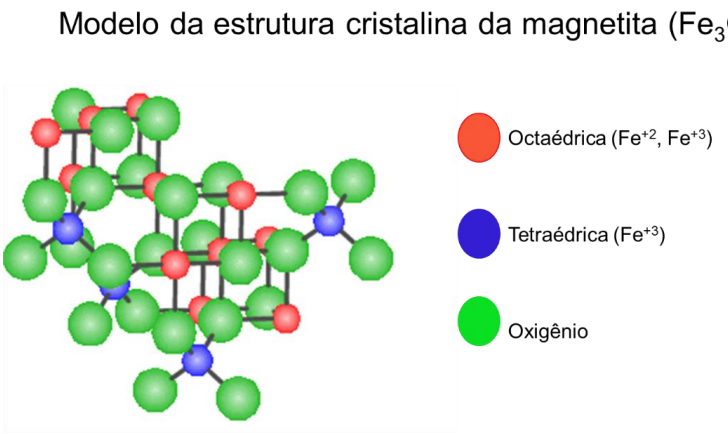
inibição do crescimento celular quando tem-se NPs com diferentes cargas superficiais, bem como com composição variada.

## 1.2 Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (MNPs)

O Fe é um dos metais essenciais para a vida humana e também de grande utilidade tecnológica. Está envolvido desde as funções básicas do nosso metabolismo, como o transporte de oxigênio através da hemoglobina (eritrócitos) e mioglobina (células musculares), constituintes de algumas enzimas e participantes na síntese de neurotransmissores, até ao processo de envelhecimento por ser um dos metais mais ativos em química redox (GUPTA, 2014; HÖHN; GRUNE, 2013; PUNTARULO, 2005; TERMAN; BRUNK, 2004)(CRIELAARD; LAMMERS; RIVELLA, 2017; PHILPOTT, 2018; WALDVOGEL-ABRAMOWSKI et al., 2014).

O óxido de ferro, produto vindo da oxidação natural do Fe ou sintetizado, possui diversas formas cristalinas, porém, será tratado nesta tese apenas o óxido também conhecido como magnetita ($Fe_3O_4$), por ser o que apresenta a maior magnetização de saturação (Ms = 92 emu/g) e, portanto, ser o óxido de ferro que recebe maior atenção em aplicações biológicas ou biomédicas (NEDELKOSKI et al., 2017). A estrutura cristalina deste óxido de ferro que possui número de coordenação 6, é a de um espinélio invertido, devido aos íons de $Fe^{3+}$ ocuparem posições tanto no centro octaédricos como tetraédricos enquanto que, os íons $Fe^{2+}$ ocupam posição central apenas octaédrica (Figura 2).

Figura 2. Estrutura cristalina da Magnetita

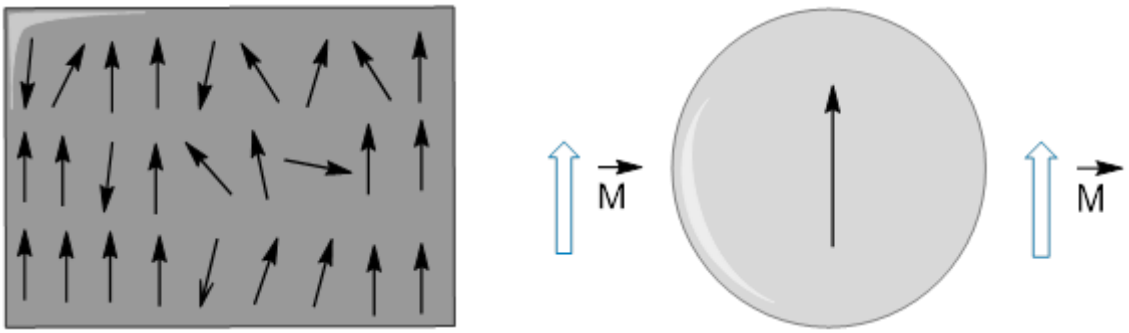



Fonte: Adaptado de MCKENZIE, 2010.

As nanopartículas superparamagnéticas de ferro (MNPs) têm aparecido em um número crescente de publicações com aplicações biológicas nos últimos anos, por possuírem tamanho controlável, e seus constituintes (Fe e O) estarem normalmente presentes em tecidos biológicos, sendo conhecidos seus danos em caso de desbalanço intracelular.

As MNPs podem ser manipuladas por um campo magnético externo. Cada MNP atua como um átomo paramagnético gigante com um momento dipolar muito maior do que materiais de mesma composição em escala macroscópica, com uma rápida resposta ao campo magnético aplicado e, quando o campo magnético externo é retirado não há magnetismo residual no material. Para que possa ser compreendido o comportamento deste tipo de material altamente magnético, deve-se saber que a propriedade magnética de qualquer material provém do momento magnético associado aos elétrons componentes do material. Alguns materiais podem apresentar ou não algum momento dipolar magnético resultante que, está relacionado aos elétrons existentes e seus momentos dipolares. Quando um campo magnético é aplicado, os momentos magnéticos individuais podem responder a favor ou contra a direção do campo externo. Alinhados contra o campo magnético aplicado e com uma baixa amplitude, são chamados de materiais de diamagnéticos. Já alguns materiais, os elétrons possuem um momento de dipolo permanente e quando se aplica um campo magnético externo ($\vec{M}$) estes se alinham aumentando assim sua magnetização sendo conhecidos por materiais paramagnéticos (MACHLIN, 2006).

Figura 3. Momento dipolar de materiais paramagnéticos macroscópicos (esquerda) e nanométricos com comportamento de mono domínio.

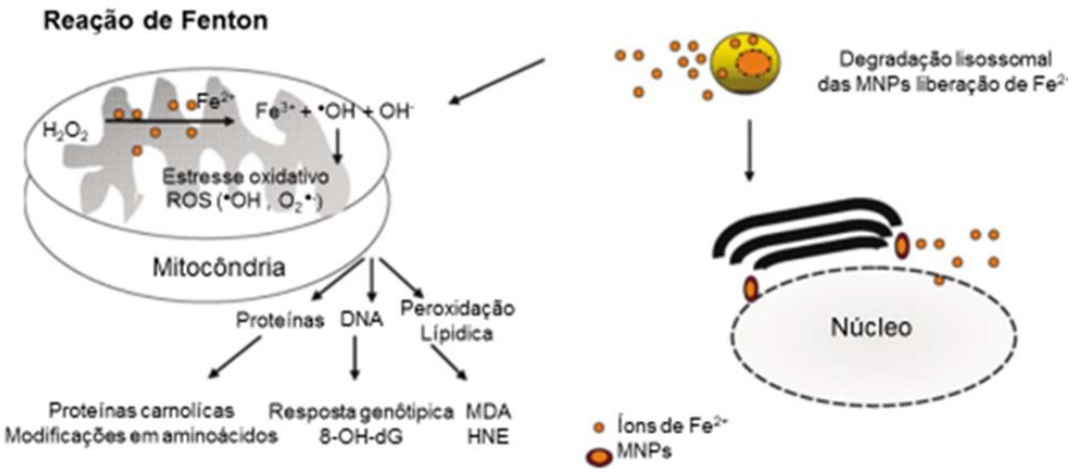



Fonte: Organizado pelo autor.

As MNPs, uma vez preparadas, precisam ser mantidas estáveis e livres de agregação. Sua estabilidade está vulnerável devido às forças de Van de Waals que ocorrem entre as MNPs provido do próprio magnetismo presente em cada NP, que contribui para agregação. Assim, se faz necessário encontrar estabilizantes ou surfactantes que interajam de diversas maneiras entre si e com a superfície da NP, como ligação de hidrogênio, dipolo-dipolo ou interação de Van der Waals, trazendo a estabilidade necessária para as NPs no ambiente.

O mecanismo de toxicidade das MNPs ocorre com a sua degradação nos lisossomos, com bombeamento de prótons por ATPases, em baixo pH (~6). Os íons de Fe liberados podem atravessar tanto o núcleo quanto a membrana mitocondrial onde reagem com peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) produzindo radicais hidroxilas ($OH^{\bullet}$), via reação de Fenton, conforme demonstrado em vários modelos celulares (Figura 4) (YANG et al., 2015; YING; HWANG, 2010). Essa sobrecarga de radicais hidroxilas reagirá com proteínas e membranas lipídicas, acarretando na quebra das moléculas e produção de lipídios truncados bem como aldeídos, por exemplo, o malondialdeido (MDA) e o 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), produtos que podem difundir-se até o núcleo celular e reagir com a fita do DNA produzindo 8-hidroxiguanina (8-OH-dG) (KAMIYA et al., 2010; SINGH et al., 2010).

Figura 4. Esquema de degradação das NPs de Fe no lisossomo e possíveis alvos para reativos para os íons de Fe liberados pós degradação lisossomal




Fonte: Adaptado de SINGH et al., 2010.

O resultado de oxidações da proteína citocromo C e da ferritina contendo em sua composição sítios de ligação para metais, principalmente o Fe, gera a lipofuscina, que é

uma lipoproteína pigmentada, resultado da degradação de proteínas contidas nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático (RE) e que está relacionada ao envelhecimento celular e a outros processos como a fotossensibilização por luz visível de células da pele (PHILPOTT, 2018; TONOLLI et al., 2017). Por não ser degradável pelas enzimas lisossomais, os grânulos de lipofuscina vão gradualmente aumentando e ocupando o compartimento lisossomal, impossibilitando que novas organelas danificadas sejam degradadas levando as células à morte (HÖHN; GRUNE, 2013; TERMAN; BRUNK, 2004).

## 1.3 Métodos de obtenção de nanopartículas de óxido de ferro

São muitos os métodos utilizados para a preparação de MNPs, cada um com sua especificidade, adequação e limitações (ALI et al., 2016; INDIRA, 2010). Abaixo segue uma breve descrição dos principais métodos para a obtenção de magnetita ($Fe_3O_4$).

### 1.3.1 Coprecipitação

Este método é provavelmente o mais simples, fácil e rápido de se obter MNPs. Em meados de 1980, René Massart (MASSART, 1981), usou cloretos de Fe no estado 2+ e 3+ em determinada proporção Fe(II)/Fe(III) e promoveu a precipitação simultânea em soluções alcalinas e ácidas (Equação 1). A precipitação simultânea do Fe (II) e Fe (III), em solução alcalina, pode ocorrer em diversas proporções, embora geralmente a proporção 1:2, deva ser rigorosamente mantida (CASILLAS; GONZALEZ; PÉREZ, 2009). A coloração preta indica a formação das MNPs que é sintetizada sem funcionalização, tornando-se mais suscetíveis a reagirem entre si, bem como com moléculas tanto orgânica como inorgânicas.

Equação 1. Etapas de síntese das nanopartículas de magnetita pela metodologia de coprecipitação

$$(Fe(H_2O)_6)^{3+} \rightarrow FeOOH + 3H^+ + 4H_2O$$

$$Fe^{2+} + 2OH^- \rightarrow Fe(OH)_2$$

$$2\ FeOOH + Fe(OH)_2 \rightarrow \underset{\textbf{(Magnetita)}}{\mathbf{FeO.Fe_2O_3\ (Fe_3O_4)}} + 2H_2O$$

Embora essa seja uma das metodologias mais simples de síntese, ela não permite um controle fino do tamanho das NPs e, pelo fato do ferro ser facilmente

oxidado, é difícil fazer um controle refinado da composição das NPs. Porém, talvez pela simplicidade do método e potencial de aplicação das NPs magnéticas resultantes, muitos estudos têm sido feito em relação a melhor relação entre as proporções de Fe (II) e Fe(III), a funcionalização da superfície das NPs e presença de estabilizantes (BAGHERPOUR; KASHANIAN; EBRAHIMI, 2018; BEZBRADICA et al., 2013; FILIPPOUSI et al., 2014).

### 1.3.2 Microemulsão

As NPs sintetizadas por esta metodologia apresentam um bom controle de tamanho, pois, seu crescimento ocorre num ambiente altamente controlado (CAPEK, 2004; LAKSHMANAN et al., 2008; ZIELINSKA-JUREK et al., 2012). Este método pode ser visto como uma metodologia de coprecipitação de precursores por consistir na formação de compartimentos altamente confinados (micelas) com auxílio de surfactantes e mantendo a mesma proporção de Fe em cada micela, controlando, assim, o tamanho das MNPs.

Uma das desvantagens desse método está no alto custo do uso de surfactante e solventes para uma baixa produção, e na dificuldade em separar e remover o surfactante dos solventes e da superfície das NPs (CAPEK, 2004).

### 1.3.3 Decomposição térmica

A metodologia de decomposição térmica é conhecida por apresentar maior grau de controle de tamanho, reprodutibilidade e monodispersividade. Esta técnica consiste no uso de um precursor de Fe (III) apenas e um solvente orgânico com elevadas temperaturas de ebulição (>200ºC). O precursor se decompõe em alta temperatura e forma as NPs em presença de estabilizantes.

Até 2002, a síntese que havia sido reportada utilizava como precursor o complexo $FeCup_3$ (Cup = N-nitrosofenilhidroxilamina) ou $Fe(CO)_5$, que resultava em NPs provenientes da oxidação da magnetita, chamadas de magnemita ($\gamma$-$Fe_2O_3$), com tamanhos acima de 20 nm (TAEGHWAN HYEON, SU SEONG LEE, JONGNAM PARK, 2001). Neste mesmo ano, SUN e ZENGE (2002), publicaram uma síntese usando como precursor o complexo $Fe(acac)_3$ (acac = acetilacetonato) e obtendo magnetita sem oxidação. A partir deste processo inicial, diversos outros estudos têm sido publicados,

como a mudança do precursor de Fe (CAO et al., 2012), a variação da quantidade de precursores e de agentes estabilizantes, com intuito de se obter diversos tamanhos de MNPs (AN et al., 2012; SUN; ZENG, 2002; UNNI et al., 2017).

Embora ainda não se conheça o exato mecanismo de síntese, evidências sugerem que a redução do Fe (III) para Fe (II) ocorre a uma temperatura elevada., sendo esta etapa já separada e caracterizada por difração de raio X após um tempo de refluxo curto (5 min) (PENG et al., 2006). Estudos evidenciam a necessidade do uso do par ácido oleico (AO) e oleilamina (OLA) na obtenção e estabilidade das NPs recém-formadas. O AO libera prótons para o ambiente tornando-o rico em prótons livres que inicialmente auxilia na formação das MNPs, porém, se não houvesse OLA esse excesso de prótons livres aumentaria a pressão eletrostática, favorecendo a aglomeração e a formação de MNPs grandes. Logo, OLA auxilia a pressão eletrostática por protonar alguns de seus grupos aminos a uma quantidade que essa pressão diminua, mas não chegue a zero, permitindo que o AO se ligue à superfície das MNPs auxiliando no controle do tamanho (HARRIS; SHUMBULA; VAN DER WALT, 2015; HU et al., 2015).

O inconveniente desta síntese para aplicações biológicas é o tipo de recobrimento das MNPs ao final da síntese, pois o AO é uma molécula com uma cauda hidrofóbica que não possibilita que as MNPs se estabilizarem em meio aquoso. Hoje, já são possíveis algumas metodologias pós-síntese, para transferência de fase orgânica para fase aquosa (CAI et al., 2017; NINJBADGAR; BROUGHAM, 2011), ou através do uso de precursores que podem ser recobertos com moléculas com caráter anfótero (GILLILAND; CARPENTER; SHULTZ, 2014; NAGESHA et al., 2009; YU et al., 2004).

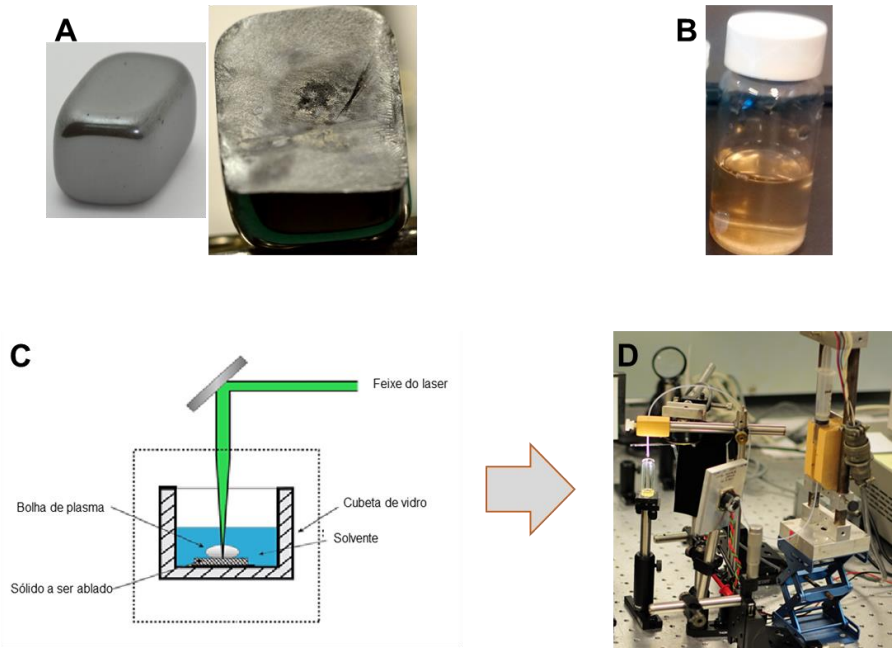
### 1.3.4 Método físico: *laser ablation*

A ablação por laser, ou *laser ablation*, define-se por um processo de remoção de um material de um sólido ou líquido usando a irradiação de um laser pulsado, com pulso ultracurto. Durante este processo, o sólido imerso em um líquido quando incidido com fluxo de fótons, toma contato com uma grande quantidade de energia térmica em uma escala de tempo muito curto (Figura 5). Como consequência, um aumento rápido de pressão e de temperatura na interface líquido-sólido acontece. O plasma induzido pelo laser age como um pistão contra o meio líquido, gerando uma onda de choque (OC)

que, geralmente, se expande a uma velocidade comparável com da velocidade do som através do líquido. Atrás da parte dianteira da OC, o gradiente de pressão e a rápida troca de calor do laser com o líquido circundante, induz a formação de microbolhas, que contém gases e vapores que ajudam a formar as NPs. As microbolhas acabam formando clusters de NPs e podem interagir umas com as outras dando origem a NPs de estrutura policristalina (DE BONIS et al., 2015).

A síntese das NPs de óxido de ferro a partir de um alvo de hematita ($Fe_2O_3$), material macroscópico (*top-down*), é uma metodologia que tem sido muito empregada para produção de biosensores (ISMAIL et al., 2015) e catalisadores (MORGA; ADAMCZYK; OĆWIEJA, 2012), embora esta técnica possua limitações na reprodutibilidade e baixos rendimentos.

Figura 5. Esquema da utilização do método de *laser ablation.* (A) Material usado para a preparação de NPs por *laser ablation*. (B) Suspensão de NPs estabilizadas em água obtidas após *laser ablation*. (C) Esquema e instrumentação empregada na preparação de NPs por *laser ablation* seguida por (D) *laser drop*.




Fonte: Organizada pelo autor com adaptação de imagem retirada site de busca.

## 1.4 Magnetolipossomos (MLs)

Os termo magnetolipossomos (MLs) foi introduzido por UNIOERSITY et al.(UNIOERSITY, 1983) para descrever uma formulação de óxido de ferro não fosfolipídico não caracterizada por são compostos de nanopartículas de óxido de

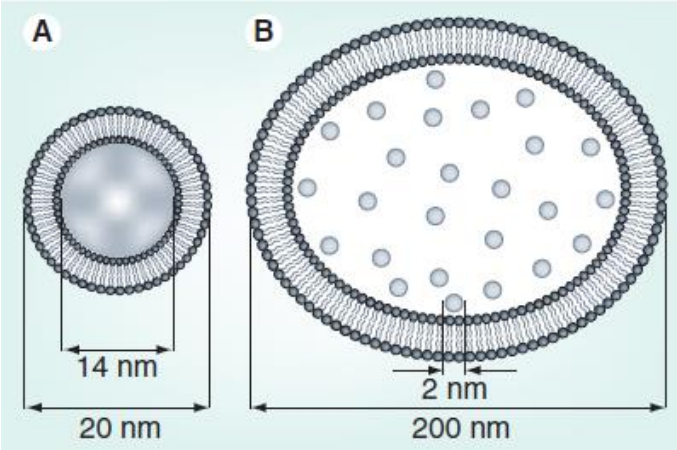
ferro superparamagnéticas revestidas por lipossomas (UNIOERSITY, 1983). Os lipossomos são vesículas esféricas fechadas consistindo de uma bicamada fosfolipídica. Quando se tratam das propriedades de tamanho, carga e superfície dos lipossomos, estes podem ser facilmente alterados, variando na composição da bicamada ou no modo de preparo. Por exemplo, existem polímeros hidrofílicos, como o polietilenoglicol (PEG), que podem ser adsorvidos na superfície do lipossomo para estabilizar estereoquimicamente e aumentar o tempo de permanência deste lipossoma na circulação sanguínea (TORCHILIN, 2002). Também podem adicionar, ligantes alvo, como anticorpos ou peptídeos, ser ligados para aumentar a especificidade do lipossoma em relação aos tecidos-alvo (AL-JAMAL; KOSTARELOS, 2007; TORCHILIN, 1997). Estes revestimentos fosfolipídicos vêm ganhando mais espaço uma vez que, as propriedades da superfície da NP determinam onde elas estarão espacialmente localizadas no interior do lipossomo devido às suas propriedades inerentes, como biocompatibilidade, biodegradabilidade e toxicidade reduzida (DE CUYPER; JONIAU, 1988). Existem diferentes abordagens possíveis para associar as NPs de óxido de ferro aos lipossomos. No entanto, duas delas vêm sendo mais amplamente utilizadas, sendo a primeira baseada no encapsulamento das NPs magnéticas diretamente dentro do lúmen do lipossoma (BEAUNE; ME; CABUIL, 2008; BOTHUN; PREISS, 2011; CINTRA et al., 2009), e a outra na incorporação das NPs entre a bicamada lipídica (AMSTAD et al., 2011; BONNAUD MONNIER et al., 2014; CHEN; BOSE; BOTHUN, 2010)

O primeiro exemplo de MLs bem caracterizado no que diz respeito à estrutura e propriedades físico-químicas foi estabelecido, em 1988, por DE CUYPER e JONIAU (DE CUYPER; JONIAU, 1988). Estes MLs clássicos consistem em núcleos de óxido de ferro (~20 nm de diâmetro) nos quais uma bicamada fosfolipídica são imediatamente ligada. Estas partículas não contêm uma cavidade aquosa interna, sendo totalmente preenchidas por óxido de ferro, logo, a célula absorve uma quantidade maior de ferro diminuindo os efeitos tóxicos para a mesma concentração sem a cobertura da bicamada (SOENEN; BAERT; DE CUYPER, 2007).

Posteriormente, descreveu-se um segundo tipo de ML que consiste em grandes vesículas unilamelares (~200 nm de diâmetro) com espaço central aquoso que abrangem várias nanopartículas de óxido de ferro (MARTINA et al.,

2005; SABATE et al., 2008). Normalmente, elas são preparadas por extrusão (MARTINA et al., 2005) e são designados como MLs extrudidos. Sua vantagem é que o tamanho dos lipossomas pode ser modulado facilmente e que, além dos núcleos de óxido de ferro, moléculas hidrofílicas também podem ser capturadas no espaço aquoso interno, ampliando seu potencial de aplicação. Contudo, dado o tamanho menor dos núcleos de óxido de ferro, as propriedades magnéticas são menos pronunciadas do que no caso dos MLs clássicos. A figura 6 ilustra estes dois tipos de MLs.

Figura 6. Representação de magnetolipossomos (MLs). (A) MLs clássicos e (B) MLs extrudido. A cor cinza escura representa a bicamada lipídica e a cor cinza claro representa nanopartículas de óxido de ferro




Fonte: (FATTAHI et al., 2011).

O revestimento das MLs pode ser criado a partir de uma grande variedade de fosfolipídios sintéticos e naturais, além disto, a facilidade com que a superfície pode ser modificada quimicamente por ligantes de direcionamento específicos têm oferecido uma grande versatilidade aos revestimentos de ML. Desta forma, existe uma ampla gama de aplicações específicas para essas MLs, bem como experimentos de direcionamento seriam difíceis de serem realizados utilizando MNPs revestidas com não lipídios (SOENEN; HODENIUS; DE CUYPER, 2009).

A visualização e caracterização de MLs é uma ferramenta chave para o desenvolvimento de tais híbridos, sendo indispensável para a detecção dos locais exatos de localização das MLs e se a condição se aplica a todos as MLs na amostragem. Detalhes estruturais e arquitetônicos, como a distribuição ou arranjo das MNPs dentro dos híbridos, também são muito importantes para a

compreensão das interações de NPs e membranas em geral (MONNIER et al., 2014).

Para caracterização de MLs gigantes têm-se utilizado microscopia de luz e fluorescência. Além disto, BEAUNE e colaboradores (BEAUNE; ME; CABUIL, 2008) também observaram as propriedades elásticas dos MLs através do processo de deformação das vesículas sob o efeito de um campo magnético aplicado. Porém, para a caracterização dos MLs menores, dada às restrições físicas da luz, são necessários métodos alternativos, como as técnicas como espalhamento de luz dinâmica (DLS), espalhamento de raios X a baixo ângulo ou espalhamento de nêutrons (SAXS e SANS), que podem ser usadas para sugerir o tamanho das vesículas e fornecer informações sobre a homogeneidade da amostra (MONNIER et al., 2014).

Além disto, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) tem sido amplamente utilizada nesse contexto de caracterização de MLs (FLORIS et al., 2011; QIU et al., 2012). Entretanto, as técnicas convencionais de MET exigem um ambiente de alto vácuo, que é altamente destrutivo para qualquer amostra rica em água. E, embora as amostras possam ser preservadas ainda existem inúmeros artefatos que são criados pelo próprio procedimento de fixação e/ou secagem da amostra, além de levar a uma localização aleatória das NPs. Uma alternativa a isto é observar as amostras através de crio-microscopia eletrônica, onde as vesículas são preservadas em uma camada de gelo vítreo, mantendo-as a salvo dos efeitos de secagem ou do vácuo durante a visualização (AMSTAD et al., 2011; CHEN; BOSE; BOTHUN, 2010).

## 1.5 Nanopartículas de óxido de nióbio (NbONPs)

O nióbio (Nb) é encontrado muito frequentemente junto ao tântalo. Somente em 1801, Charles Hatchett propôs este novo metal que por muitos anos não era possível separar esses dois elementos. Quando isso foi realizado, este novo elemento, o nióbio, teve seu nome batizado por Niobe, filho do rei Tântalos da mitologia grega. Esse metal em seu estado fundamental apresenta a configuração em sua camada de valência de $4s^2\ 4p^6\ 3d^3\ 5s^2$, o que o possibilita ser encontrado em vários estados de oxidação (+2; +4 ou +5).

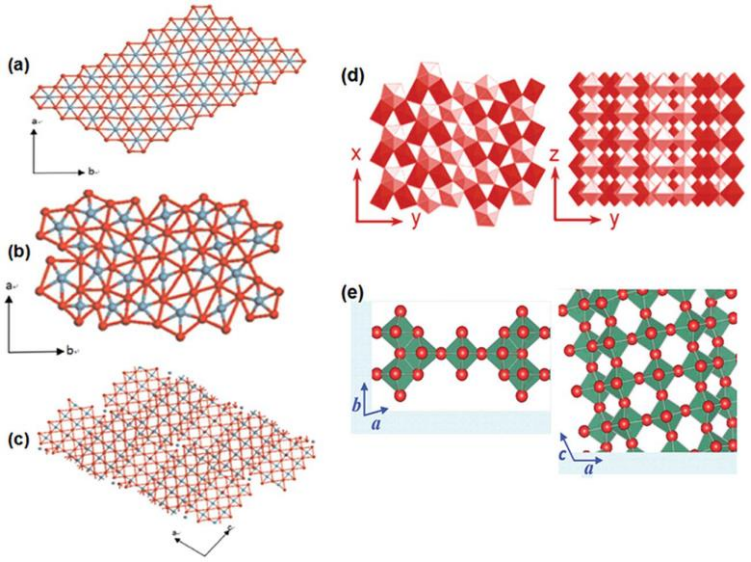
Essa variação no estado de oxidação lhe confere uma ampla aplicação em diversos materiais. Nos últimos anos, a sua utilização em tecnologia recebeu grande evolução, podendo-se destacar a produção supercondutores, capacitores

e catalisadores; devido às suas propriedades ácidas segundo a definição de Lewis (DO PRADO et al., 2016; LIU et al., 2010; MIRVAKILI et al., 2015; TAMAI et al., 2016). Suas possíveis aplicações biológicas têm sido ainda pouco exploradas; por exemplo, sua aplicação junto com outros metais como titânio para reposição óssea.

Quando o Nb está no estado de oxidação +5, sua configuração eletrônica é $[Kr]4d^0$ e seu óxido apresenta uma menor condutividade comparada aos outros estados. Geralmente, no estado polimorfo, são sólidos brancos. Para cada método de síntese, as características estruturais podem ser diferentes, mas, no geral, a estrutura do óxido de nióbio é hexagonal permitindo ter vacâncias entre os átomos de O e Nb, o que lhe confere características ácidas (ECKERT et al., 2005; NICO; MONTEIRO; GRAÇA, 2016).

Os compostos mais comuns de nióbio são os óxidos que se apresentam como $Nb_2O_5$, NbO, $NbO_2$ e $Nb_2O_3$. A estrutura cristalina do pentóxido de nióbio ($Nb_2O_5$) pode ser de diferentes formas, sendo a mais usual T-$Nb_2O_5$ (Ortorrômbica), a mais estável, TT-$Nb_2O_5$ (pseudohexagonal), a menos estável H-$Nb_2O_5$ (monoclínica) (Figura 7). Por aquecimento entre 600ºC e 800ºC, pode-se transformar a estrutura TT em H. Em TT, cada átomo de Nb está no centro de quatro, cinco ou seis átomos de oxigênio no plano ab e uma estrutura de cadeia O-Nb-O-Nb está ao longo do eixo c.

Figura 7. Estrutura cristalina das formas do $Nb_2O_5$. Pseudohexagonal TT-$N_2O_5$ (a); Ortorrômbica T-$Nb_2O_5$ (b,d); Monoclínica H- $Nb_2O_5$ (c,e).




Fonte: (KOBAYASHI et al., 2007; RANI et al., 2014).

A deficiência de oxigênio leva à distorção destes poliedros. A estrutura T-$Nb_2O_5$ é construída com a célula unitária ortorrômbica. Cada átomo de Nb é cercado por seis ou sete átomos de oxigênio, distorcendo a estrutura para octaédrica ou pentagonais bipirâmide. Esses poliedros são conectados pela borda ou pelo compartilhamento no plano ab ao longo do eixo c. A estrutura monoclínica de H-$Nb_2O_5$ contém 3x4 e 3x5 blocos constituídos por $NbO_6$ octaedro (Figura 7, e). Estes blocos são acoplados por compartilhar a borda com uma mudança de meia dimensão da célula unitária ao longo do eixo c. Acredita-se que a isotropia estrutural de $Nb_2O_5$ dá origem a diferentes propriedades físico-químicas, eletrônicas, eletrocrômicas e magnéticas que permitem seu uso em sensores e em catálise. Em catálise, a acidez de superfície e as propriedades redox estão ligadas também a essas estruturas e defeitos. Por exemplo, o ácido nióbico amorfo apresenta forte nível de acidez de Bronsted devido à geração de prótons a partir de moléculas de água ligadas em $Nb^{5+}$. Em temperaturas elevadas, a acidez de Lewis diminui devido à sua aproximação dos cátions de nióbio do oxigênio, diminuindo as vacâncias entre esses átomos (TSANG et al., 2012).

## 1.6 Sistema miméticos de membranas

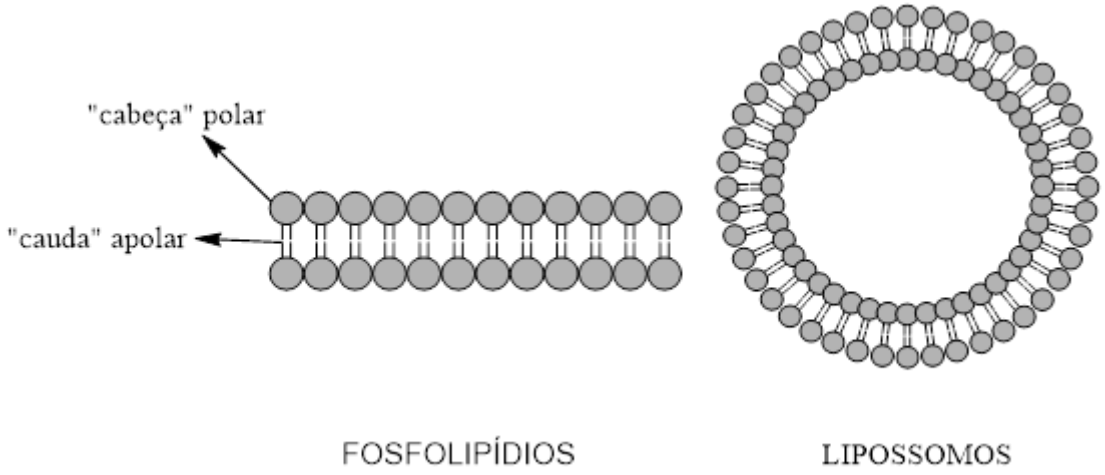
Uma vez que as NPs precisam entrar no ambiente intracelular para terem efeitos biológicos relevantes, o primeiro obstáculo ou desafio para sua internalização é a membrana celular. As membranas biológicas são extremamente complexas, tornando-se necessário utilizar modelos mais simples para investigar fenômenos relacionados com as membranas em nível molecular. De fato, há uma grande variedade de sistemas modelos, por exemplo, micelas (diretas e reversas), bicamadas planas, vesículas, lipossomos e monocamadas, que podem ser utilizadas para imitar partes importantes, especialmente os componentes lipídicos das membranas biológicas.

Os modelos miméticos de membranas permitem que se realizem experimentos em situação que imitam os sistemas biológicos, mas que ao mesmo tempo são substancialmente mais simples permitindo analises mais rigorosas de interações e outras propriedades físico-químicas da substância/objeto de interesse com a bicamada lipídica encontrada na membrana celular.

Composta basicamente por fosfolipídios, proteínas e colesterol, a membrana celular é uma barreira de proteção, bem como, uma “peneira molecular” para seleção de entrada e saída de compostos de interesse celular. Ela possui auto-organização na forma de bicamada, com caudas lipofílicas voltadas para o interior da membrana e as partes hidrofílicas voltadas para o exterior celular e o outro lado para o interior da célula.

Fosfolipídios são as biomoléculas que possuem uma parte dita “cabeça” polar, por ser composta por grupos fosfato com afinidade aquosa e uma “cauda” apolar, composta por ácido graxos saturados ou insaturados longos, com afinidade por meios orgânicos. Uma vez em meio biológico, ou seja, aquoso, estas biomoléculas agrupam-se de forma espontânea, favorecidos pelo aumento de entropia das moléculas de água e pela afinidade entre as caudas dos ácidos graxos formando lipossomos (bicamadas; figura 8).

Figura 8. Estrutura e organização de lipídios (esquerda) e lipossomos (direita)




Fonte: Organizado pelo autor.

As vesículas unilamelares gigantes (GUVs), sistema de estudo que consiste em sintetizar estruturas de bicamadas lipofílicas de tamanhos entre 10 e 100 µm, mimetizando as membranas celulares e facilitando estudos nos aspectos físico-químico de alguns processos biológicos, como as interações das NPs.

Alguns estudos já realizados indicam que a superfície das GUVs preparadas com dioleilfosfatidilcolina (DOPC) - um fosfolipídio com carga superficial zwitteriônica, apresentam em pH 7,4 carga residual negativa devido à disposição dos dipolos do zwitterion, sendo consequentemente negativas, assim

como a maioria das membranas biológicas (PEKKER; SHNEIDER, 2015). Na presença de NPs com cargas superficiais positivas, podem apresentar desde uma forte interação (LAURENCIN et al., 2010) até a ruptura da membrana (WANG; MALMSTADT, 2017), dependendo da concentração e natureza das superfícies das NPS. Além disso, GUVs apresentaram modificações morfológicas induzidas por oxidação. Essas alterações têm sido estudadas de forma detalhada pelo nosso grupo na última década (MARTINS et al., 2017; TSUBONE et al., 2017). A oxidação dos lipídeos leva inicialmente a um aumento de área por lipídeo, mas levam a completa destruição da membrana na presença de danos mais severos.

# 2 OBJETIVOS GERAIS

Tendo em vista o crescente interesse na aplicação de nanopartículas das mais variadas composições em aplicações biológicas ou tecnológicas, torna-se muito importante avançarmos no entendimento dos mecanismos de interação desses materiais com o meio celular ou biológico, bem como o desenvolvimento de novos materiais. O objetivo geral deste trabalho foi a preparação de nanopartículas inorgânicas com diferentes composições e propriedades de superfície visando não comprometer a viabilidade celular e estudar as interações destas NPs com meios biológicos. Para tais estudos foram utilizadas as nanopartículas de óxido de ferro e o potencial ácido das nanopartículas de nióbio.

## 2.3 Objetivos específicos

1) Empregar metodologias para a preparação de nanopartículas de óxido de ferro e nióbio, possibilitando o estudo da morfologia e simplicidade de síntese.
2) Recobrir as nanopartículas de óxido de ferro com diferentes cargas superficiais para avaliar o efeito da carga no comportamento em meio biológico e sistemas miméticos.
3) Determinar a concentração citotóxica para as nanopartículas de óxido de ferro com diferentes formas de recobrimento e óxido de nióbio.
4) Caracterizar a presença de sítios ácidos, devido à deposição de nanopartículas de óxido de nióbio, usando uma reação modelo de desidratação de álcoois.

# 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Processos Fotoinduzidos e Interfaces e no Laboratório de Nanomateriais e Catálise (ambos no IQUSP, São Paulo, Brasil). Uma parte da síntese das nanopartículas de nióbio foi realizada durante o período de intercâmbio no Grupo do Professor Juan (Tito) Scaiano (University of Ottawa, Ottawa, Canadá).

## 3.3 Materiais reagentes

Os seguintes reagentes utilizados para o preparo e estudo das MNPs foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil, EUA): acetato monossódico triidratado, carboxifluoresceína (CF), cloreto de ferro (III) ($FeCl_3$), Igepal CO-520, oleilamina, 1,2-octanodiol, sulfato ferroso amoniacal ($Fe(SO_4)NH_4$), tetraetilortosilicato (TEOS), ácido 2-[(4-(hidroxietil)1-piperazina]-etanosulfônico, ≥99,5% titulação (HEPES), Brometo de 3-(4,5-dimetilt-2-diazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio) (MTT), glicose e sacarose. O acetilacetonato ferro (III) 99% ($Fe(acac)_3$), ácido oléico 90%, cloreto de ferro (II) ($FeCl_2.XH_2O$) foram comprados da empresa Alfa Aesar (EUA). Os seguintes reagentes utilizados foram adquiridos da empresa Labsynth (Brasil): ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), cloreto de sódio, cloreto e potássio, fosfato dissódico ($Na_2HPO_4$), fosfato monopotássio ($KH_2PO_4$), ácido cítrico anidrido, e os solventes foram acetona, ciclohexano, clorofórmio ($CHCl_3$), etanol (etOH), hexano e metanol. O ácido acético, ácido clorídrico (HCl) e o difenil éter foram adquiridos da empresa J.T.Baker (México). O 1,2-dioleoil-*SN*-glicero-3-fosfocolina (DOPC) e foram adquiridos da Avanti Polar Lipids, Inc. O brometo de dioctadecildimetilamônio, 99% (DODAB) foi adquirido da Acros Organics (EUA). Para o preparo das soluções foi usado água ultra-pura (MiliQ).

Para a síntese das NbONPs na University of Ottawa, Canadá, foram usados acetonitrila (ACN), hidróxido de amônia ($NH_4OH$), etanol (EtOH), cloreto de nióbio ($NbCl_5$) e boroidreto de sódio ($NaBH_4$), todos comprados da Alfa Aesar. Etóxido de nióbio (V) ($Nb(OEt)_5$); Oxalato de Nióbio (V) e Amônio hidratado 99% com traços de metais base ($C_4H_4NNbO_9.xH_2O$), dopamina hidroclorada (DA), aspartame (APT), Álcool Benzílico (BA), citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7$), dimetil sulfóxido (DMSO) e 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilltetrazólio brometo) (MTT) foram comprados da Sigma

Aldrich (Canadá). Irgacure (I-907) foi gentilmente fornecido ao grupo pela empresa Ciba Speciality Chemicals (BASF Global, Canadá).

## 3.4 Equipamentos

### 3.4.2 Equipamentos utilizados para a síntese e caracterização das MNPs e NbONPs

Para a síntese das MNPs quando recobertas com lipídeos foi usado o sonicador de ponto Sonics Vibra-Cell V-505 do Laboratório de Genética Mitocondrial do Instituto de Química – USP, já para a síntese por coprecipitação foi usado um ultragitador mecânico Ultra-Turrax T18 Homogenizer, IKA Works. As imagens das nanopartículas foram obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) no equipamento da marca JEOL de modelo JEM 2100, da Central Analítica do IQ-USP. As quantificações dos metais nas amostras foram realizadas por espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP OES) no equipamento Espectrômetro Ótico de Emissão Atômica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES, Radial) da marca Spectro, modelo Arcos da Central Analítica do IQ-USP. A determinação de ponto isoelétrico e diâmetro hidrodinâmico foi realizada por espalhamento de luz dinâmico (ELD) em um equipamento da marca Malvern Instruments, modelo Zetasizer nano ZS no comprimento de onda de 650 nm, do laboratório da University of Ottawa (Canadá) e o mesmo modelo foi usado no laboratório do Instituto de Química-UNESP, para as NbONPs e para as MNPS, respectivamente. Para o estudo de degradação foi usado o termomixer da marca *Eppendorf* modelo ThermoMixer C, o leitor de placas de modelo BMG FluoStar do laboratório de Bioinorgânica e Metalofármacos do IQ – USP.

A síntese e a visualização das vesículas unilamelares gigantes (GUVs) foram realizados no laboratório da Professora Dra. Rosangela Itri no Instituto de Física (IF) – USP pelo método de eletroformação empregando um gerador de ondas Minipa MFG-4201A e placas de vidros recobertas com óxido condutor. As soluções de glicose e sacarose foram preparadas e a osmolaridade foi verificada em um osmômetro Osmomat 030 – Gonotec. A observação das vesículas foi

realizada no microscópio óptico invertido Zeiss Observer D.1 com objetiva de 63 vezes de aumento, com uma câmera acoplada AxioCam MRM.

A contagem do tamanho das NPs foi realizada no software chamada ImagePro Plus versão 6.0 analisando diâmetro médio e análise estatística foi feita pelo software Origin versão 2017 calculando o tamanho médio através de linearização gaussiana.

### 3.4.3 Equipamentos de cultura celular

A incubadora para cultivo celular empregada foi da marca ThermoScientific e o leitor de placas empregado foi da marca TECAN de modelo Infinitive M200.

### 3.4.4 Equipamentos usados na síntese de nanopartículas por ablação a laser

O laser usado para síntese de nanopartículas de óxido de ferro a partir do bulk (*laser ablation*) é o laser contínuo da Surelite, Nd:YAG SLII-10. As condições do laser para a síntese são: comprimento de onda de 1064 nm, frequência de 10 Hz, com energia de 50 mJ e 18 M pulsos (duração em torno de 30 min), para quando houve repetições, ou 72M pulsos (cerca de 2h) para única síntese. Para o laser drop, foi empregado comprimento de onda ($\lambda$) de 355 e 532 nm, frequência de 10 Hz e 30 pulsos/gota.

As análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram realizadas em equipamentos da marca JEOL de modelos: JSM-7500F e JEM-2100F, respectivamente.

O forno de aquecimento utilizado para os testes de morfologia das NbONPs quando submetidas a altas temperaturas, foi o CARBOLITE, modelo HTF 17/5 com o programador 3216P1.

As análises de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foram realizadas no equipamento da marca Malvern Instruments modelo Zetasizer Nano ZS. A centrífuga usada foi da marca Eppendorf modelo Centrifuge 5804R e os espectrofotômetros usados foram da marca Agilent e modelos Carry 60 e Carry 100.

### 3.4.5 Equipamento usado na síntese de nanopartículas por metodologia fotoquímica

O fotoreator usado para irradiar a solução contendo sal de nióbio e o Irgacure continha 14 lâmpadas tubulares de comprimento de onda 281-315 nm e 62 $W/m^2$ que cercavam a solução e acompanhado de um agitador magnético auxiliavam na uniformidade radiação.

## 3.5 Síntese das nanopartículas magnéticas (MNPs)

### 3.5.2 Síntese de MNPs pela metodologia de decomposição térmica

Nanopartículas de $Fe_3O_4$ (MNPs) foram preparadas pela metodologia de decomposição térmica (PEREIRA et al., 2012). Em um balão de 3 bocas de 250 mL foram adicionados 0,71 g acetilacetonato de ferro (III), 2 mL de ácido oleico (AO), 2 mL de oleilamina, 1,5 g de 1,2-ocatanodiol e 20 mL de difenil éter. A mistura foi refluxada à 265ºC sob atmosfera inerte ($N_2$) por 2 h. Ao resfriar a mistura em temperatura ambiente, as nanopartículas foram lavadas e centrifugadas por 3 vezes com etanol/acetona (1/1; v/v). As MNPs foram ressuspendidas e mantidas em hexano.

### 3.5.3 Síntese de MNPs por laser ablation seguidas por *laser drop*

Foram adicionados em um vial, 6 mL de água MiliQ com um alvo de hematita ($Fe_2O_3$) conforme a figura 5. Foram realizadas duas sínteses consecutivas para a obtenção das MNPs. A primeira foi o laser ablation, e em seguida, as suspensões foram submetidas ao laser drop. A cada síntese por laser drop foram usados 10 mL da suspensão do laser ablation, um vial receptor com o reagente a ser formado, uma solução estabilizadora ou apenas água ultrapura (no caso das hematitas puras).

### 3.5.4 Síntese das MNPs pela metodologia de coprecipitação

Na síntese de MNPs pela metodologia de coprecipitação foram empregados sais de Fe (II) e Fe (III) (KORAYEM et al., 2017). Em uma síntese típica, foram preparadas duas soluções, uma solução contendo 1,00 g de cloreto de ferro (II) tetraidratado ($FeCl_2.4H_2O$) em 5 mL de ácido clorídrico (HCl) 2 M; e outra solução contendo 1,66 g de cloreto de ferro (III) ($FeCl_3$) anidro em 10 mL de água ultrapura. Essas soluções foram misturadas e então adicionadas a 250 mL de uma solução hidróxido de amônio ($NH_4OH$) 0,7 mol/L, em um balão de 500 mL, sob intensa agitação mecânica (10000 rpm,Turrax) e atmosfera de $N_2$. A mistura dos reagente fez com que a solução ficasse preta imediatamente devido a formação do óxido de ferro. O sistema foi mantido sob agitação mecânica por 30 min e, então, as NPs foram separadas magneticamente utilizando um imã de neodímio-ferro-boro. Repetidas lavagens (3-4 vezes) com 250 mL de água destilada e separação magnética foram realizadas até a completa remoção do $NH_4OH$.

## 3.6 Transferência de MNPs de meio orgânico para meio aquoso

Empregando uma metodologia baseada na literatura (CHALKER, 2014; LIAO et al., 2011) foram usados os lipídeos DOPC e DODAB para conferir diferentes cargas superficiais nas MNPs. A cada 5 mg de MNPs resuspensas em $CHCl_3$, foram misturadas com 2 mL da solução de 2 mM do lipídeo em $CHCl_3$ a ser incorporado. Essa mistura somada a 5 mL de água ultrapura, foi levada a um sonicador de ponto por 2 min a 100 J. O solvente orgânico foi retirado a vácuo até a secura total. As MNPs foram resuspensas em 5 mL de água ultrapura e, por separação magnética, o excesso de lipídeo foi removido.

## 3.7 Funcionalização das MNPs provenientes da metodologia de coprecipitação

### 3.7.2 Funcionalização das MNPs com $SiO_2$ (MNP@$SiO_2$)

Seguindo a metodologia estabelecida (JACINTO et al., 2008), foram adicionados em 500 mL de ciclohexano, 31,86 g de Igepal CO-520 e agitou-se até solubilização total . Adicionou-se 142 mg das MNP@AO e 6,8 mL de $NH_4OH$ para formação da micela reversa. Quando então foram adicionados gota a gota 5,5 mL de tetraetilortosilicato (TEOS), manteve-se sob agitação constante por 8 h. Após o tempo de reação, aumentou-se a velocidade de agitação e adicionou-se 150 mL de metanol. Desligou-se a agitação e aguardou as MNP@$SiO_2$ decantar para separação de fases. A suspensão com *as* MNP@$SiO_2$ foi separada por centrifugação a 7000 rpm e lavada com etOH por sucessivas centrifugações a 7000 rpm por 30 min até o não aparecimento no precipitado de sílica (pó branco). O sólido obtido foi então seco em estufa a 100ºC por 20 h e calcinado em um forno por 6 h a 600ºC.

## 3.8 Degradação das MNPs em diferentes pHs

Para comparar a degradação em diferentes compartimentos celulares, citoplasma (pH 7,4) e lisossomo (pH 4,5), foram realizadas medidas de quantidade de Fe em solução ao longo do tempo.

Preparo das soluções tampão: *1) pH 4,5:* para o tampão nesse pH foram usados ácido acético e acetado de sódio. A cada 200 mL, usou-se a proporção de 0,68 g de acetato monossódico triidratado para 0,286 mL de ácido acético e glacial**.** *2) pH 7,4:* foram preparados 500 mL de uma solução de 20 mM de HEPES com 150 mM de NaCl; pesando 566 mg de HEPES e 4,38 g de NaCl.

Preparou-se no momento o experimento, uma solução estoque de 160 µM de Fe para usar no preparo da curva padrão a partir do $Fe(SO_4)NH_4$ em água e uma solução de 2 µM de calceína (CA) conforme estudos realizados por Vitorino et al (2018) (VITORINO et al., 2018). As MNP@DODAB e MNP@DOPC (1 mg/mL) foram retiradas da suspensão estoque, separadas magneticamente *overnight* e resuspensas em 1 mL das soluções tampões de pH 7,4 e pH 4,5. Essas suspensões foram mantidas no termomixer por 48h a 37ºC. Alíquotas de

10 µL foram coletadas nos tempos 0, 24 e 48 h, adicionadas 190 µL da solução de CA e montou-se uma placa de 96 poços para cada tempo. Após duas horas mantidas no escuro, mediu-se a fluorescência dos poços no comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm, com aumento de ganho de 970.

### 3.9 Interação das MNPs com membranas miméticas

O crescimento das vesículas foi realizado após o preparo de uma solução de DOPC em clorofórmio (2 mM) ser espalhada em duas lâminas de vidro recobertas por uma liga de óxido de índio (III) e óxido de estanho (IV) formando uma superfície condutora (ITO). Um espaçador de teflon de 2 mm de espessura foi colocado entre as duas lâminas que são presas com presilhas formando uma câmara semifechada. A câmara foi preenchida com uma solução de sacarose 0,1 M. O gerador de função é conectado em cada uma das lâminas e uma tensão de 2 V é aplicada com uma frequência de 10 Hz em corrente alternada por duas horas. Depois desse período tem-se uma solução de GUVs que foi diluída cerca de 10 vezes numa solução de glicose de mesma osmolaridade compondo assim uma solução de GUVs cujo interior possui sacarose e na parte exterior exista glicose.

### 3.10 Cultivo celular

As células utilizadas nos experimentos foram queratinócitos imortalizados humano (HaCaT) como modelo de células não tumorais. O meio de cultivo empregado foi o meio essencial Meio de Cultura Modificado da Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% (v/v) soro fetal bovino (SBF) da empresa GIBCO/BRL Life Technologies e 1% (v/v) antibiótico penicilina e estreptomicina. As células foram mantidas em incubadora a 37°C com fluxo de gás carbônico ($CO_2$) controlável (5%). Para garantia da reprodutibilidade e confiabilidade dos dados, as linhagens celulares foram manipuladas cuidadosamente, em ambiente estéril (capela de fluxo laminar com lâmpada UV) e com material estéril, evitando-se contaminação por bactérias, fungos, micoplasma, ou ainda contaminação cruzada.

O subcultivo foi realizado duas vezes por semana, utilizando tampão fosfato estéril (PBS) com EDTA por 10 min para auxilio da suspensão e lavagem das

células, em seguida, retira-se o PBS e adiciona-se 2 mL de tripsina para a resuspensão das células, permanecendo na incubadora por 3 minutos. Ao final, são adicionados 8 mL de meio DMEM 10% para homogeneização e contagem na câmara de Neubauer e microscópio óptico. A razão de subcultivo utilizada é de 1:10.

## 3.11 Viabilidade celular pela metodologia de MTT

Para o procedimento da viabilidade celular, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços com concentração de $1x10^4$ células/poço. Após 24 h, elas foram incubadas com MNP@DODAB e MNP@DOPC em concentrações variando de 125 a 1000 µg/mL por 24 h em meio DMEM com 1% e 10% de SFB. Após esse período de incubação, as células foram lavadas três vezes com tampão fosfato (PBS) e retornou-se com o meio de cultura DMEM 10% SFB.

Dadas 48 h, o teste de viabilidade celular foi realizado, com a incubação das células por 2 h em uma solução contendo 75 µg/mL de MTT no meio de cultura. Após o período, o meio de cultura foi substituído por DMSO para a leitura da placa no comprimento de onda de 550 nm.

## 3.12 Síntese de nanopartículas de pentóxido de nióbio (NbONPs)

### 3.12.1 Síntese de NbONPs pela metodologia fotoquímica

Uma solução contendo 280 mg de I-907 em 100 mL de ACN foi preparada sob atmosfera de argônio. Outra solução estoque de 280 mM de acetilacetonato de nióbio ($Nb(acac)_5$) foi preparada adicionando 1,1 mL de acetilacetonato, 0,5 mL de $Nb(OEt)_5$ e 1,6 mL de ACN. O *vial* foi selado e purgado argônio durante 20 a 30 min sob agitação, a solução foi mantida até seu uso em temperatura de -20ºC. Num tubo de quartzo foram transferidos a solução de I-907 e 150 µL da solução de $Nb(acac)_5$ (420µM concentração final). Novamente, purgou-se argônio por mais 30 min, quando sob agitação a solução final foi submetida à irradiação de luz na região do ultravioleta (UVB; $\lambda$=281-315 nm; 62 $W/m^2$) por 4h. Ao final, a solução foi exposta ao ar por 15 min e a reação mantida *overnight* na geladeira. No dia seguinte ela foi centrifugada a 7500 rpm por 30 min e lavada com ACN por três

vezes. A suspensão foi mantida em atmosfera inerte e ACN. Esta síntese foi analisada por MEV, DLS e espectroscopia fotoeletrônica de raio X (XPS).

### 3.12.2 Síntese de NbONPs pela metodologia sol-gel

Foram realizadas duas preparações empregando a metodologia sol-gel, uma delas baseada na metodologia usada por TURKEVICH et al.(1951), empregando citrato como agente redutor, e a outra inspirada em BRUST et al. (BRUST et al., 1994), usando $NaBH_4$ como agente redutor. Em um béquer, foram adicionados 50 mg de $NbCl_5$ e 50 mL de etOH sob agitação e aquecimento até 65ºC (ebulição do solvente), seguidos pela adição, para a reação de *Turkevich,* de 25 mL de uma solução 1% de $Na_3C_6H_5O_7$ e, para a reação de *Brust*, de 25 mL uma solução 2 mM de $NaBH_4$ em etOH recém preparada. Após a adição dos agentes redutores, aguardou-se em torno de 15 min para a estabilidade da cor da suspensão e cessou-se o aquecimento.

Quando em temperatura ambiente, centrifugou-se a suspensão em 7000 rpm por 15 min, então lavou-se com etOH, na segunda vez com água/etOH (1:1; v/v) e o precipitado foi resuspenso em água MiliQ.

### 3.12.3 Síntese de NbONPs pela metodologia de controle de pH

Empregando uma metodologia descrita por ZHAO et al. (ZHAO et al., 2012), em um béquer, foram adicionados 20 mL de água destilada e 2g de $C_4H_4NNbO_9.xH_2O$, sob forte agitação. O pH foi ajustado pela adição, gota a gota, de uma solução de $NH_4OH$ 25% até que o pH atingisse 9, conforme medido em um pHmetro. A suspensão foi centrifugada a 8000 rpm por 15 min e lavada com água destilada por três vezes. As NbONPs foram calcinadas a 580ºC por 1 h.

### 3.12.4 Síntese de NbONPs pela metodologia solvotérmico

Empregando uma metodologia descrita por BUHA et al. (BUHA et al., 2010), porém variando os precursores de nióbio ($NbCl_5$, $C_4H_4NNbO_9.xH_2O$ e $Nb(OEt)_5$), foram realizadas várias preparações usando 0,1 g do precursor e 10 mL de BA anidro (previamente seco com o auxílio de peneira molecular) em um

reator de aço com tubo de vidro de 50 mL (Par). Após fechar o reator, purgou-se nitrogênio para criar uma atmosfera inerte e sob agitação, aqueceu-se o reator até 250ºC, e manteve-se a reação por três dias. Após os três dias, o aquecimento foi cessado, o reator foi aberto e a suspensão formada foi separada por centrifugação a 8000 rpm por 15 min. O sólido obtido foi lavado por 3 vezes com uma mistura de acetona/$CHCl_3$ (1:1; v/v). Ao final, parte das NbONPs foram resuspensas em etOH e outra parte foi submetida à calcinação a 650ºC por 24 h, ambas as partes foram analisadas por DLS e MEV.

### 3.13 Depositando NbONPs em suporte de magnetita recobertas com sílica ($Fe_3O_4$@$SiO_2$@NbONPs)

Seguindo a metodologia descrita por Vono (2018) (VONO et al., 2018), foram sintetizadas MNPs conforme descrito na seção 3.3.3, seguido do revestimento com uma camada de sílica conforme descrito na seção 3.5.3 (MNP@$SiO_2$) e impregnação do pentóxido de nióbio ($Nb_2O_5$). Para a deposição de NbONPs sobre a camada de sílica, foram pesados 100 mg de MNP@$SiO_2$ e adicionados 2% em massa de Nb a partir de oxalato de nióbio (V) e Amônio hidratado. Os dois sólidos foram misturados a 100 mL de água ultrapura e o pH foi ajustado para 9 com o auxílio de uma solução 1 mol/L de $NH_4OH$. Uma vez que o pH atingiu 9, a mistura foi agitada por 30 min e as MNP@$SiO_2$@NbONP foram lavadas e centrifugadas a 7000 rpm por 15 min até que o pH da suspensão estivesse mais próximo da neutralidade. O sólido foi seco a vácuo e mantido sob atmosfera de gás inerte ($N_2$).

### 3.14 Avaliação da presença de sítios ácidos nas $Fe_3O_4$@$SiO_2$@NbONPs

A presença de sítios ácidos na superfície do material, oriundos do óxido de nióbio, foi avaliada pela reação de desidratação de um álcool no correspondente alceno. Em um balão Schlenk de 50 mL acoplado a uma tubulação de gás $N_2$, foram adicionados, 0.1 mmol de substrato, 100°C, 4 bar de $H_2$, 3 mL de hexano e 15 mg de catalisador Ru/SiO2 e/ou 50 mg de catalisador $Fe_3O_4$@$SiO_2$@NbONPs. A reação foi analisada por GC-FID após 12 h de reação.

# 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor ilustração e discussão dos resultados estes foram separados de acordo com os metais estudados.

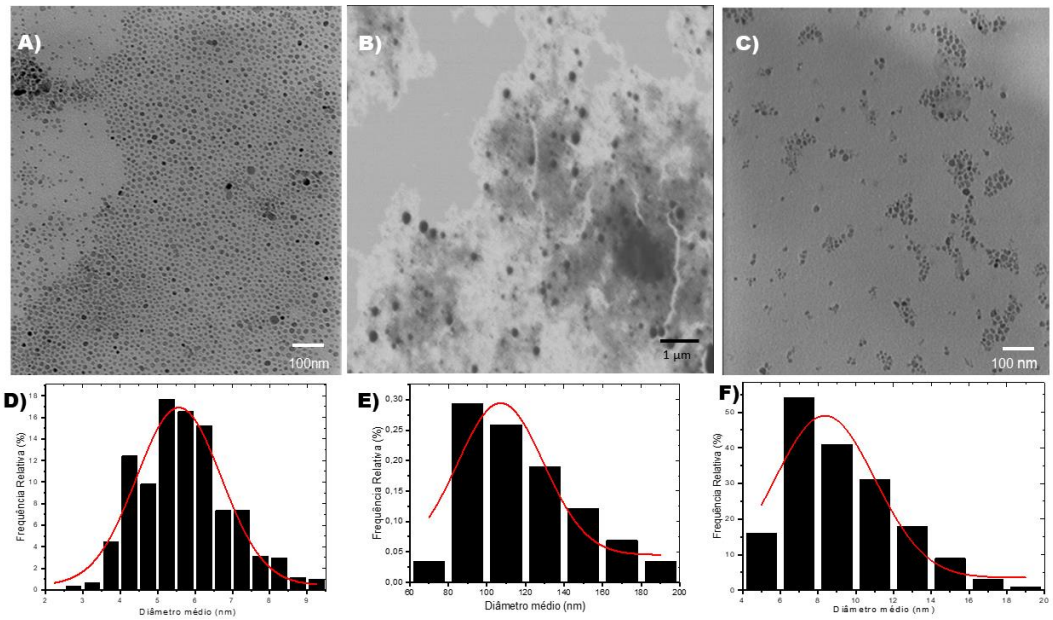
## 4.1 Óxido de Ferro

### 4.1.1 Síntese, funcionalização e estudo das nanopartículas de óxido de ferro (MNP)

Para as aplicações das NPs magnéticas na área biomédica, o controle do tamanho é muito importante para melhor controle de interação das NPs e biomoléculas presentes bem como nos estudos de predição e mecanismo da via endocítica (KETTLER et al., 2014). A dispersão e estabilidade em meio aquoso é um desafio ainda maior. Como já mencionado em detalhes na introdução desta tese (item 1.3), muitas metodologias são conhecidas para sintetizar nanopartículas magnéticas a base de óxido de ferro, que afetam diretamente suas propriedades magnéticas, em termos de dispersão devido a propriedades de superfície (FENG et al., 2018). Nesta tese, foi descrita inicialmente a avaliação comparativa dos métodos de síntese que podem resultar em nanopartículas magnéticas com bom controle de tamanho, boa reprodutibilidade e passíveis de serem modificados para alcançar uma boa dispersão em meio aquoso.

As metodologias testadas foram: a decomposição térmica, coprecipitação (mais comumente usada) e a síntese por *laser ablation*. Todas as amostras obtidas foram inicialmente analisadas por microscopia eletrônica (Figuras 9 a, b, c). Os tamanhos obtidos pela análise dos histogramas de distribuição de tamanhos ajustados a funções lognormal (Figuras 9 d, e, f) foram de 5,6 ± 1,3 nm, 8,4 ± 3,2 nm e 107 ± 26 nm pelos métodos de decomposição térmica, coprecipitação e *laser ablation*, respectivamente.

Figura 9. MNPs produzidas por diferentes metodologias, sendo imagens (a) e (c) obtidas por TEM e (b) por MEV. (a) Decomposição térmica, recobertas com ácido oleico; (b) laser ablation estabilizadas em água sem estabilizante e, (c) coprecipitação sem estabilizante.

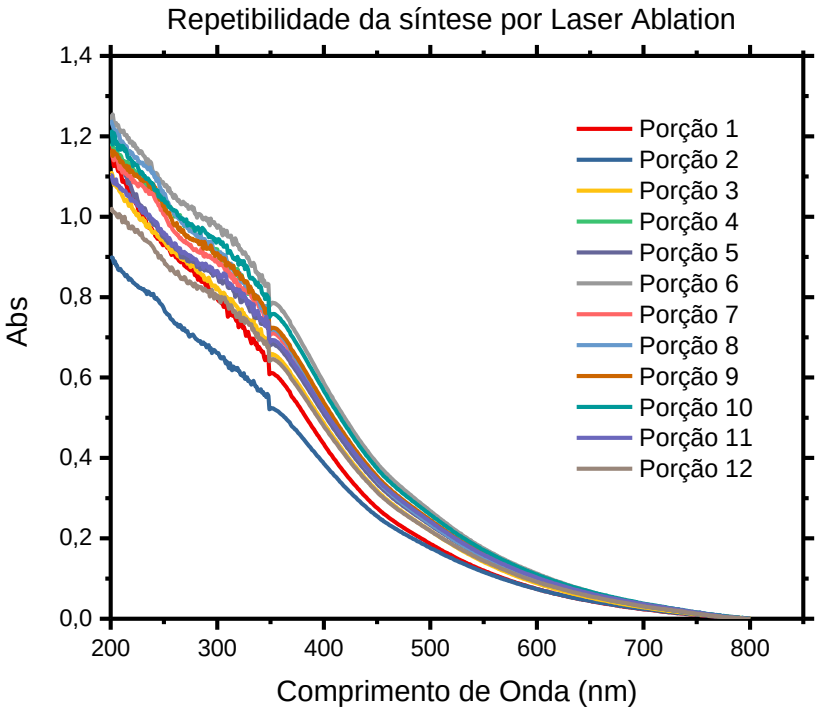



O método de *laser ablation* foi o processo de síntese em que os maiores tamanhos de nanopartículas foram obtidos dentre os métodos utilizados, estando de acordo com a caracterização publicada previamente por (FAZIO et al. 2016). As partículas desse método têm tamanho em escala micro/nano além de apresentarem dificuldades na reprodutibilidade e na quantidade de MNPs. Mesmo quando utilizadas as mesmas condições de síntese, os tamanhos e rendimentos foram diferentes, isso porque a superfície do alvo pode não apresentar uniformidade tanto em sua superfície quanto em sua composição. A metodologia de coprecipitação apresentou tamanho médio, satisfatório (< 50 nm) comparando com dados da literatura e, o fato deste método não utilizar nenhuma funcionalização/agente estabilizante das MNPs, permite que o material obtido seja posteriormente funcionalizado tanto com moléculas orgânicas quanto inorgânicas, bem como no caso da síntese por *laser ablation*.

As MNPs sintetizadas tanto por decomposição térmica quanto por coprecipitação sã conhecidas na literatura por sintetizar óxido de ferro no estado cristalino de magnetita além de estabilidade e boa dispersão nos seus respectivos solventes, quando observadas visualmente. Já as MNPs obtidas pelo método de *laser ablation* não se conhece o estado cristalino do óxido de ferro obtido nem tão pouco apresentou NPs com boa estabilidade, sedimentando facilmente mesmo

em baixa concentração (100 µg/mL). Na tentativa de se obter MNPs menores e mais estáveis, mesmo que em menores quantidades, diminuiu-se o tempo de ablação do laser para 30 min. Após a aquisição do espectro UV-Vis das diversas alíquotas das amostras obtidas após 30 min de laser, observamos o mesmo perfil de espectro para todas elas (Figura 10) mostrando a reprodutibilidade e baixa diferença entre as porções. Portanto o mesmo valor obtido na síntese única, prova que a síntese fracionada ou única, não é crucial para a diminuição de tamanho na obtenção das MNPs.

Figura 10. Espectro de absorção UV-VIS das diferentes porções obtidas na preparação de nanopartículas por *laser ablation* quando se diminuiu o tempo de ablação para 30 min.

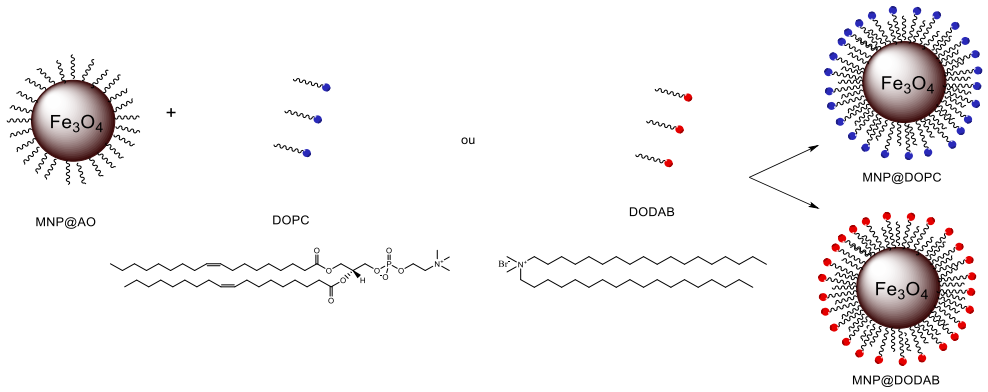



Os resultados preliminares permitiram a seleção de duas metodologias de síntese para estudos mais detalhados, sendo estas: a de *laser ablation*, por se tratar de uma metodologia ainda pouco usada - principalmente para o setor biomédico; e a de decomposição térmica, que permite um excelente controle de tamanho e a obtenção de superfícies recobertas/funcionalizadas com uma cauda hidrofóbica do AO, possibilitando a formação de uma bicamada híbrida (alcano-fosfolipídio) (FRAGNETO; RHEINSTÄDTER, 2007), transferindo as MNPs do meio orgânico para meio aquoso.

### 4.1.2 Funcionalização das MNPs provenientes da decomposição térmica e estabilidade das MNP@DODAB e MNP@DOPC

Com a pretensão de que estas MNPs possam ser estáveis em meio aquoso, bem como, assumam diferentes cargas superficiais (positivas ou neutra), selecionou-se os lipídeos DOPC e DODAB, que podem se associar às caudas hidrofóbicas do AO da superfície das MNPS provenientes da decomposição térmica por interação hidrofóbica, transferindo a estabilidade das MNPs para o meio aquoso (Figura 11). O DOPC é um lipídeo formado por duas caudas hidrofóbicas de ácidos graxos e com a cabeça hidrofílica zwitteriônica (possuindo um grupo fosfato ligado a uma colina) que usualmente está presente em membranas, apresenta baixa toxicidade nas células e seria de grande auxilio como vetor no movimento intracelular (ABEL et al., 2016; CHIBOWSKI; SZCZEŚ, 2016; REDDY; WARSHAVIAK; CHACHISVILIS, 2012). O DODAB é um lipídeo sintético catiônico que possui duas cadeias alquílicas com 18 carbonos ligados a um nitrogênio quaternário, conferindo uma estrutura geométrica cilíndrica. O DODAB tem sido empregado como veículo para inserção de fármacos e DNA no meio celular por possuir uma carga superficial positiva (DAS et al., 2016).

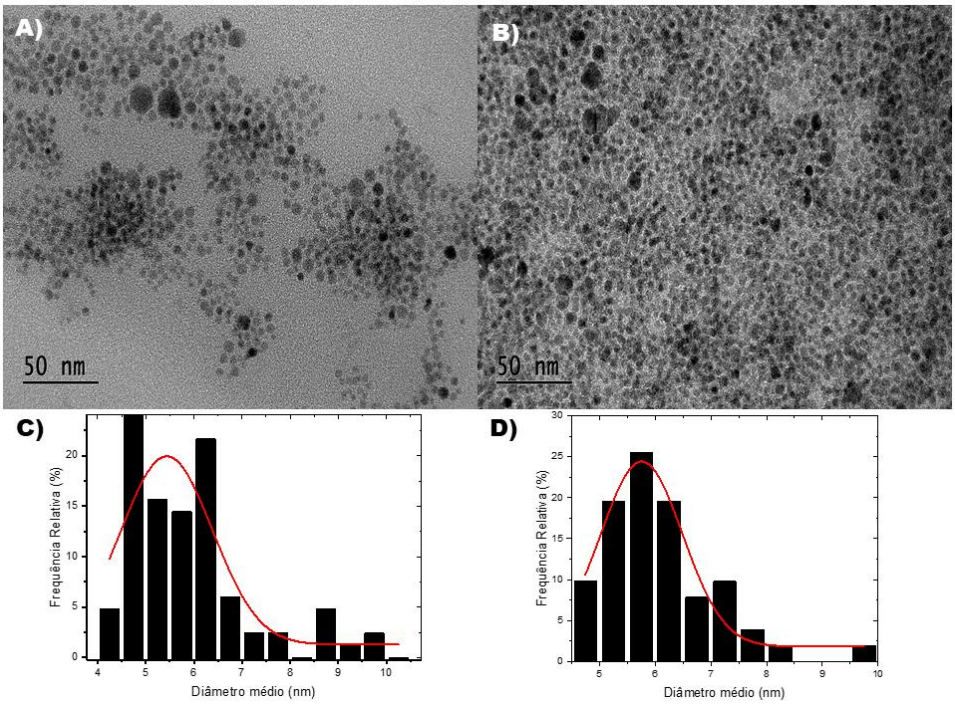
Figura 11. Esquema de funcionalização das MNPs recobertas inicialmente com ácido oleico (MNP@AO) que são estáveis apenas em solventes orgânicos porém, quando submetidas ao sonicador em uma mistura de solventes (água/$CHCl_3$; 2/1; v/v) contendo DOPC ou DODAB, por interação hidrofóbica ocorre a interação desses fosfolipídios com as MNPs, as tornando estáveis em meio aquoso graças a parte hidrofílica dos fosfolipídios conjugados.




Fonte: Organizado pelo autor.

Após o processo de transferência das MNPs para o meio aquoso por interação hidrofóbica das caudas das moléculas de DOPC e DODAB e a superfícies das MNP@AO, o tamanho das nanopartículas recobertas, MNP@DOPC e MNP@DODAB, foi determinado por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e por espalhamento de luz (Figura 15). Verificou-se que os tamanhos no MET, não sofreram grande alteração comparada com as MNPs de origem (MNP@AO), apresentado tamanhos médios de 5,4 nm ± 1,1 e 5,8 nm ± 0,4; respectivamente, para MNP@DOPC e MNP@DODAB (Figura 12).

Figura 12. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das MNPs após a funcionalização com os fosfolipídios para estabilização em meio aquoso e sua distribuição de tamanho. (A) MNP@DOPC e (B) MNP@DODAB com seus respectivos histogramas (C) e (D).

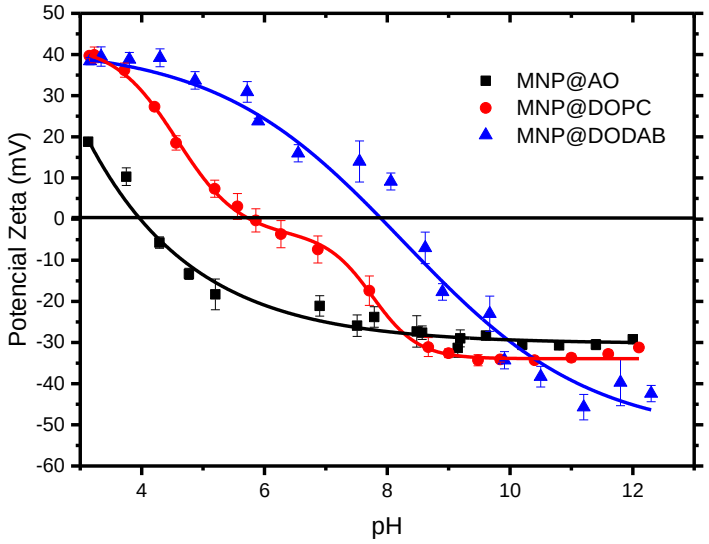



Com a finalidade de mostrar a diferença de carga superficial das MNPs, determinou-se o ponto isoelétrico por potencial Zeta (ζ) em uma varredura de pH. O potencial Zeta (ζ) mensura a carga superficial das partículas em dado solvente. Esta medida é muito útil para prever processos de agregação, solvatação e estabilidade. Sabe-se que a carga superficial das partículas influencia a distribuição polar ao redor no meio que ela se encontra e que tais mudanças refletem nas partículas seguintes formando, assim, uma rede influenciadora de outras partículas circundantes, dependendo da concentração. Logo, segundo a

teoria DLVO (Teoria de Derjaguin, Landau, Verwey e Overbeek), a estabilidade das partículas é uma somatória da energia de repulsão e a energia de atração existentes no meio (JAFELICCI JR; VARANDA, 1999; SHAW, 1992).

As medidas foram realizadas usando uma solução de NaCl 0,1 mM para que garantisse/aumentasse a carga da superfície e a estabilidade das MNPs por interação entre os íons presentes na solução (ZIMMERMANN et al., 2009). Observando a Figura 13 tem-se o perfil das cargas superfícies de cada MNP dentro da faixa de pH (3-12). Mesmo as MNP@AO não sendo estáveis em soluções aquosas por conta da sua cauda hidrofóbica, elas foram submetidas a essa análise para que mais uma vez fosse demonstrada a mudança de comportamento após o processo de funcionalização com DOPC e DODAB (Figura 13, linha vermelha e linha azul, respectivamente).

Figura 9. Perfil de comportamento das cargas líquidas superficiais das MNPs em função do pH realizadas em solução de NaCl 0,1 mM, sendo tituladas com NaOH.




O potencial Zeta das MNP@DOPC e MNP@DODAB em pH ácido apresentou uma carga líquida positiva devido ao pKa de nitrogênio quaternário ser em torno de 10. As MNP@DOPC mesmo possuindo o grupo fosfato que tem um pKa baixo, não foi suficiente para diminuir a carga liquida antes do pH 5. O ponto isoelétrico (carga liquida total da superfície) para cada MNP, segundo os dados mostrados na Figura 13, são pH 5,7 para MNP@DOPC e 7,9 para

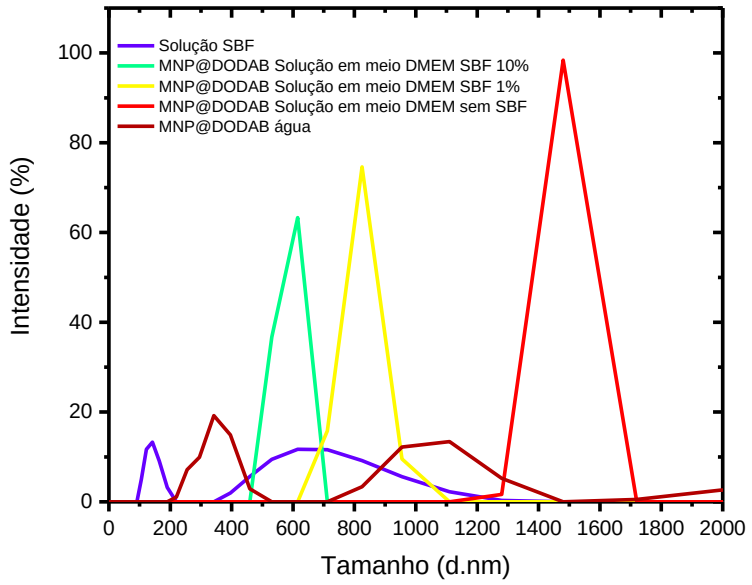
MNP@DODAB. Em pH fisiológico (7,4) os potenciais foram -12,0 mV e +7,5 mV para MNP@DOPC e MNP@DODAB, respectivamente. Estes valores vão de encontro aos presentes na literatura para suas respectivas moléculas livres em solução (CHIBOWSKI; SZCZEŚ, 2016; VIEIRA; CARMONA-RIBEIRO, 2001).

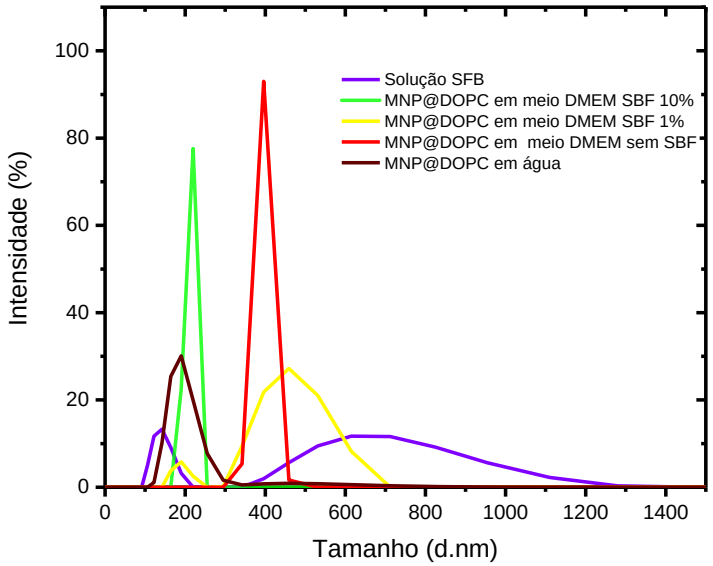
Ainda segundo a teoria de DLVO, em que os valores obtidos para potencial Zeta de +30 mV ≤ ζ ≥-30 mV e, embasado por nossas observações visuais, indicam que as MNPs possuem boa estabilidade coloidal com menor estado de agregação de partículas, podendo ser concluído que ambas são eletrostaticamente estáveis em pHs fisiológicos.

O diâmetro hidrodinâmico é um dos parâmetros mais influentes no estudo da internalização celular das MNPs. Quando em solução, as MNPs estão sujeitas a adsorção não apenas dos íons presentes na água, mas também de proteínas e biomoléculas que podem agregar-se à superfície tornando as MNPs maiores do que elas de fato são, formando, assim, as proteínas corona citadas na maioria dos artigos que estudam a interação de NPs com meio biológico (RITZ et al., 2015; SAKULKHU et al., 2014).

Para que pudéssemos fazer a determinação do tamanho “real” das MNPs que serão captadas para o compartimento intracelular, estas foram dispersas em meio de cultura contendo quantidades variáveis de SFB (1%, 10% e ausência), bem como em água ultrapura (Figura 14) e, então, analisadas por DLS.

Figura 14. Diâmetro hidrodinâmico de MNPs funcionalizadas com DODAB (a) e DO (b), através da análise de curvas auto correlação por espalhamento de luz em meio biológico (pH 7,4) sem soro fetal bovino (SFB), com SFB 1% e SFB10%, água ultrapura.




Comparando os resultados acima analisados o tamanho/diâmetro obtidos por intensidade das MNPs, com as imagens de MET (Figura 12), nota-se que em todas as preparações avaliadas as MNPs se agregam em solução. Os valores dos diâmetros hidrodinâmicos são sempre maiores que 100 nm na maior parte porcentagem das populações, enquanto que na MET, são menores do que 10 nm. Os diâmetros hidrodinâmicos em água ultrapura (Figura 14 a e b, linha marrom)

foram na sua maioria populacional (~78%) de 220 nm para MNP@DOPC e populações de 342 nm para MNP@DODAB. Com base nestes dados, passou-se para análise do comportamento das MNPs em meio de cultura (DMEM).

As MNP@DOPC quando suspensas em meio de cultura na ausência de SFB apresentaram maior população (~93%) com diâmetro hidrodinâmico em 396 nm, sendo estas tendo sua maior populacional aumentada quando em solução de meio acrescido com 1% de SFB (56% da população com tamanho médio de 453 nm) e reduzido novamente o seu diâmetro com 10% SFB próximo ao que encontramos quando avaliamos o tamanho das MNP@DOPC em água quando o meio foi acrescido (tamanho médio de 220 nm (~78%)).

Já as MNP@DODAB em meio de cultura na ausência de SFB apresentaram a maior parte populacional (~95%) com diâmetro hidrodinâmico médio de 950 nm, e a inclusão de SFB ao meio de cultura fez com que estes fossem reduzidos para 825 nm (1% SFB) e 615 nm (10% SFB).

No geral, pode-se observar que, independentemente de seu recobrimento, o aumento da concentração de SBF no meio de cultura comporta-se de maneira favorável para a diminuição nos tamanhos dos diâmetros hidrodinâmicos. Isso é explicado pelo fato que em solução, as superfícies das MNPs interagem com as proteínas e íons presentes no meio, atuando como espaçadores e, diminuindo a força magnética entre as partículas.

Observa-se que as MNP@DOPC (Figura 14 a) possuem, em geral, menor tamanho hidrodinâmico quando comparadas com as a MNP@DODAB (Figura 14 b). Isto pode ser explicado, segundo alguns autores, devido ao fato de que as MNP@DODAB se encontram próximas ao ponto isoelétrico, o que permite que o efeito de Van der Waals supere os efeitos eletrostáticos (MOORE et al., 2015b). Outros estudos alegam que NPs com superfície com cargas positivas têm maior tendência a interagirem com proteínas formando uma camada superficial mais efetiva do que as NPs de carga superficial negativa (SAKULKHU et al., 2014), o que também corrobora com nossos resultados.

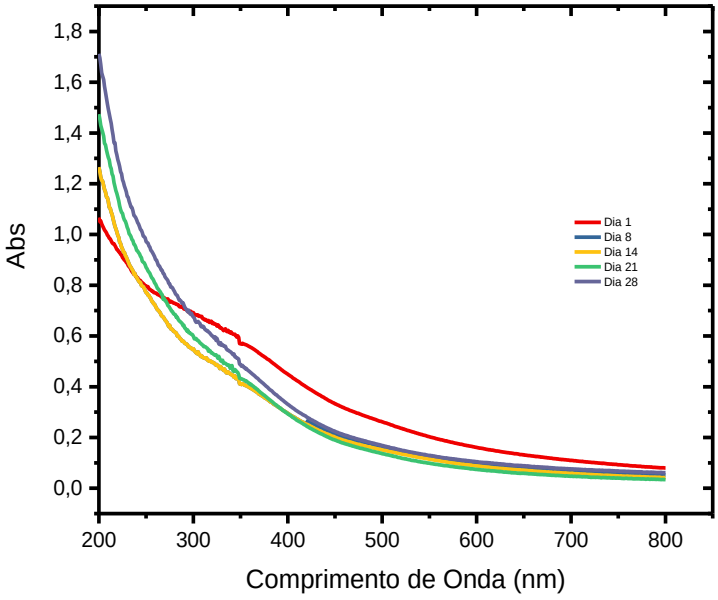
Mesmo observando que o diâmetro hidrodinâmico das MNPs em solução é mais de 100% do tamanho das MNPs determinado por MET, decidiu-se prosseguir para os estudos em células (os resultados serão apresentados posteriormente no item 4.1.7.2) e uma avaliação da estabilidade das MNPs em pHs de determinados compartimentos biológicos.

### 4.1.3 Estabilidade das MNPs sintetizadas por *laser ablation* quando utilizada a metodologia do *laser drop*

O *laser drop* é uma técnica auxiliar que permite a diminuição das partículas das obtidas na metodologia do *laser ablation*. A técnica consiste na emissão de um feixe de luz num determinado comprimento de onda com energia suficiente para ocasionar uma explosão de Coulomb. Este processo ocorre em um ambiente confinado, auxiliado pela concentração de energia e aquecimento, capaz de fragmentar as partículas que absorvem a energia do laser pelos elétrons que se ejetam formando NPs ionizadas (WERNER; HASHIMOTO, 2011).

Para os experimentos de *laser drop* foram empregadas MNPs obtidas por *laser ablation* que possuem como características intrínsecas a absorção em comprimentos menores de 600 nm (ELSAYED et al., 2015; YEW et al., 2016). Foram testados para *laser drop*, dois lasers com comprimentos de onda de 355 nm e 532 nm, ambos aceitáveis para a absorção de energia de acordo com o espectro obtido após a síntese por *laser ablation* (Figura 15). As partículas obtidas após a utilização da metodologia do *laser drop*, foram estabilizadas em água e em solução de 8 µM de APT. O APT foi escolhido como uma biomolécula a qual poderia interagir com a superfície das MNPs e funcionar como espaçadores, auxiliando na estabilidade e diminuindo a agregação das NPs em solução.

Figura 15. Espectro de absorção da suspensão obtida do *laser ablation*, acompanhado por semanas até cerca de um mês.




Quando as MNPs foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figuras 16 e 17) não foi possível notar mudanças significativas na morfologia entre as amostras tratadas em diferentes comprimentos de onda, nem quando comparadas às imagens das MNPs obtidas por *laser ablation* (Figura 9 B). O resultado esperado era que as NPs obtidas por esta metodologia fossem menores e mais estáveis, sendo esperado um efeito maior para os menores comprimentos de onda (maior quantidade de energia). Além disto, as figuras 16 e 17 mostram partículas circundadas por uma névoa não detectável por essa técnica ou parte do material dissolvido no solvente de dispersão que foi depositado no momento da preparação da amostra para o MEV, que, em modo COMPO (Figura 17 C, D), indica a presença de metais.

Figura 16. Imagens de MEV das nanopartículas formadas por laser drop em comprimento de 355 nm estabilizadas em água

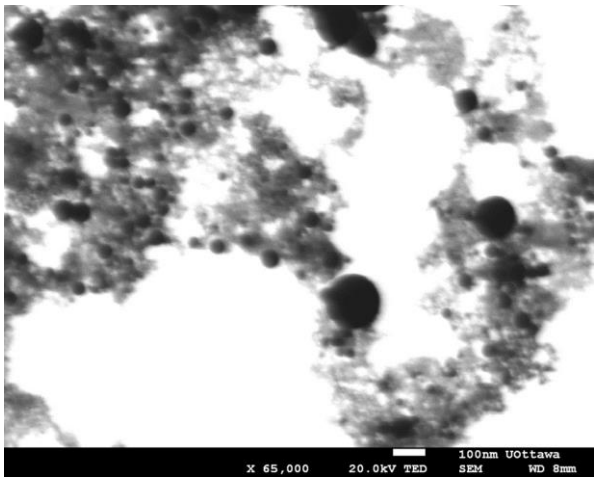
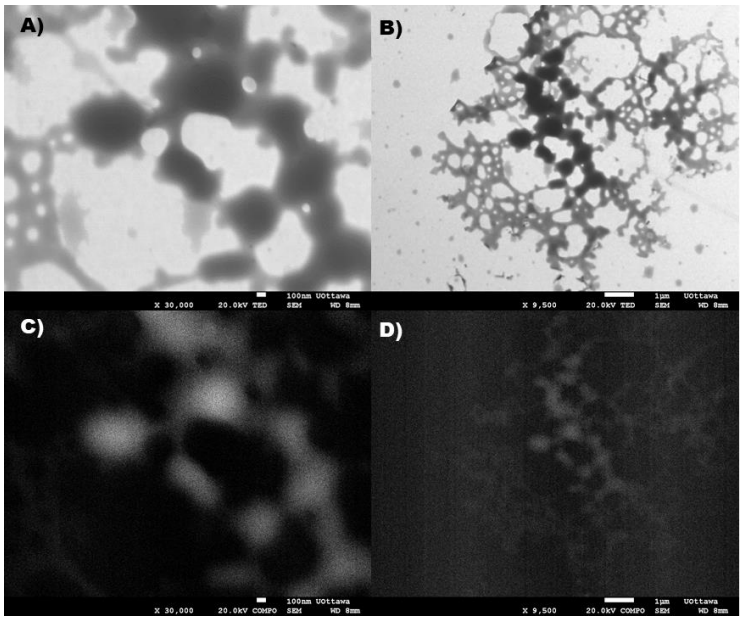



Figura 17. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das nanopartículas formadas por *laser drop* em 532 nm e estabilizadas em água. (a) e (b) são imagens no modo MEV e, (c) e (d) em modo COMPO.




Quando essas MNPs foram avaliadas por DLS durante um período de 28 dias, as NPs obtidas com o laser 355 nm, quando estabilizadas em água, foram menores do que quando estabilizadas em solução de APT, que se aglomeraram e apresentaram flutuação de tamanho durante o período de medição (Tabela 1). As MNPs obtidas com o laser 532 nm, apresentaram tamanho muito parecido com as provenientes do laser 355 nm, podendo ser visto alta aglomeração para ambos os casos em 1 e 14 dias (Tabela 1). Porém, o que pode ser destacado das MNPs resultantes do método de *laser drop* com

comprimento de onda 532 nm é que, quando estabilizadas na solução de APT, elas apresentaram-se maior estabilidades ao longo dos dias (Tabela 2). Estes resultados somados a microscopia em que não foi visto NPs isoladas e com potencial para maiores estudos não foi adiante para estudos celulares.

Tabela 1. Dados de DLS das MNPs sintetizadas por *laser drop* estabilizadas em água

| **λ (nm)** | **Diâmetro médio (nm) e população (%)** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Dia 0** | **Dia 1** | **Dia 8** | **Dia 14** | **Dia 28** |
| 355 nm | 45,7 nm<br>100% | 40,60 nm<br>97,1%<br>123,8 nm<br>2,9% | 65.14 nm<br>100% | 44,77 nm<br>95,6%<br>121,4 nm<br>4,4% | 43,4 nm<br>100% |
| 532 nm | 57, 86 nm<br>100% | 61,16 nm<br>87,4%<br>184,6 nm<br>12,6% | 173.6 nm<br>100% | 72,09 nm<br>88%<br>215,7 nm<br>12% | 57,21 nm<br>100% |

Tabela 2. Dados de DLS das MNPs sintetizadas por *laser drop* estabilizadas em solução APT 8 µM

| **λ (nm)** | **Diâmetro médio (nm) e população (%)** | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **Dia 0** | **Dia 1** | **Dia 8** | **Dia 14** | **Dia 28** |
| 355 nm | 134, 3 nm<br>87,7%<br>267,8 nm<br>12,3% | 107.7 nm<br>84,4%<br>245.6 nm<br>15,6% | 127.5 nm<br>100% | 81,95 nm<br>80,6%<br>197.4 nm<br>19,4% | 91,48 nm<br>95%<br>235,8 nm<br>5% |
| 532 nm | 43,07 nm<br>100% | 38.07 nm<br>90,8%<br>83.64 nm<br>9,2% | 45,5 nm<br>100% | 49,34 nm<br>100% | 67,43 nm<br>100% |

### 4.1.4 Degradação das MNPs em pH fisiológicos

A internalização de biomoléculas, macromoléculas e NPs para o ambiente intracelular tem um controle refinado pelo processo de endocitose, cujos mecanismos moleculares são ainda pouco conhecidos e foram apresentados na Introdução desta tese (item 1.1).

Conhecendo a composição básica das MNPs em estudo (Fe) e suas respectivas funcionalizações (lipídeos), pode ser esperado que a degradação

desse material gerasse elevada produção de hidroperóxidos de lipídeo e outras espécies reativas de oxigênio (ROS), acarretando em danos intracelulares (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014; MIYAMOTO et al., 2006; WINTERBOURN, 1995).

Estes danos podem ser exemplificados em dois momentos, sendo o primeiro, na fase de propagação da peroxidação lipídica. Este processo consiste na formação de hidroperóxidos (LOOH) a partir da abstração de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo insaturado bis-alilíco (LH) formando um radical ($L^{\bullet}$) que é rearranjado para um dieno conjugado que, por sua vez, reage com oxigênio formando um radical peroxila. O radical peroxila pode atacar tanto uma nova molécula de lipídeos, quanto reagir e oxidar os íons de Fe presentes no meio produzindo radicais de lipídios e ferro oxidado (LATUNDE-DADA, 2017; WINTERBOURN, 1995).

Outro exemplo de danos causado pelos componentes das MNPs são os produtos gerados no lisossomo quando estas são degradadas. Nos lisossomos são encontrados uma grande quantidade de peroxidase e peróxido de hidrogênio, capazes de reagir com os íons de Fe, produzindo radicais hidroxilas ($OH^{\bullet}$) (Equação 2) que comparado a outros radicais possui um tempo de vida suficiente para ser deslocados para outros compartimentos celulares e causar danos em outras biomoléculas (CRIST et al., 2009; FLOYD et al., 2009).

Equação 2. Peroxidação lipídica, com a participação de Fe e lipídeos insaturados. Fontes de espécies reativas de oxigênio (ROs) a partir dos componentes das MNPs. (A) Reação de Fenton a partir de Fe e peróxido de oxigênio encontrado nos lisossomos e (B) Fase de propagação e formação de radicais $L^{\bullet}$ ou $LOO^{\bullet}$ e (C) Fase de Terminação; formação de produtos.

A) $$L\text{-}H \xrightarrow{OH^{\bullet},\ Fe^{n+},\ O_2} L^{\bullet}$$

B) $$L^{\bullet} + O_2 \longrightarrow LOO^{\bullet}$$

$$LOO^{\bullet} + L\text{-}H \longrightarrow LOOH + L^{\bullet}$$

C) $$L^{\bullet} + L^{\bullet} \longrightarrow L\text{-}L$$

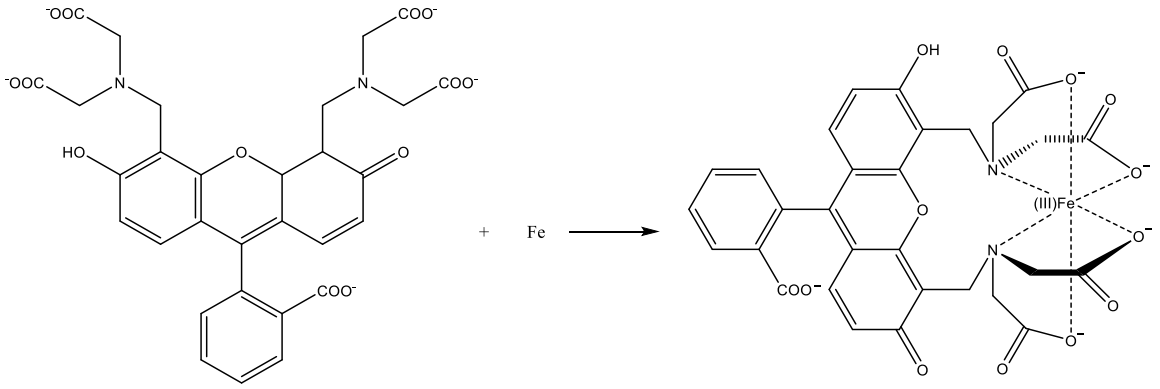
$$LOO^{\bullet} + L^{\bullet} \longrightarrow LOOL$$

$$LOO^{\bullet} + LOO^{\bullet} \longrightarrow LOOOOL$$

Para o estudo de potencial citotóxico por haver maior disponibilidade de Fe livre intracelular, foi avaliado o processo de degradação em soluções que mimetizassem o lisossomo (pH 4,5) e o citoplasma (pH 7,4). O pH 7,4 também é encontrado no meio/solvente em que as células *in vitro* utilizam para crescimento, enquanto que o pH de 4,5 corresponde ao pH do compartimento intracelular de maior acidez, que é o compartimento formado e de destino da maioria das substâncias endocitadas(KOLOSNJAJ-TABI et al., 2016; MICHAEL et al., 2010)..

Para quantificar o Fe livre presente nas soluções de diferentes pHs foi usado a calceína (CA), uma molécula fluorescente que possui grupos carboxílicos livres (MA; ABBATE; HIDER, 2015), que ao complexarem com íons de Fe (II) e Fe (III), causam a supressão da florescência da calceína, na relação molar de 1:1 CA/$Fe^{2+/3+}$ (Figura 18)(ALI et al., 2003).

Figura 18. Reação entre calceína e íons $Fe^{2+}$ ou $Fe^{3+}$ levando à supressão da fluorescência




Fonte: Organizado pelo autor.

Figura 10. Curva de decaimento da intensidade de fluorescência da calceína em função da quantidade de íons Fe livre

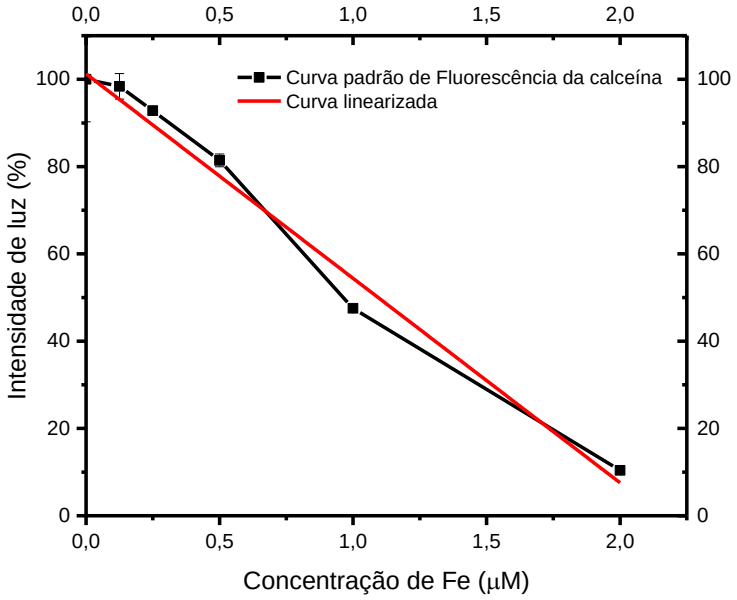



Tabela 3. Dados de concentração de Fe livre a partir das MNP@DOPC e MNP@DODAB em função do tempo de incubação em pH 4,5 e 7,4

| Tempo (h) | $[\,]_{MNP@DOPC}$(μM) | | $[\,]_{MNP@DODAB}$(μM) | |
|---|---|---|---|---|
| | pH 4,5 | pH 7,4 | pH 4,5 | pH 7,4 |
| 0h | 0,04 | 0,05 | 0,09 | 0,04 |
| 24h | 0,54 | 0,07 | 0,59 | 0,07 |
| 48h | 0,59 | 0,07 | 0,60 | 0,05 |

A quantidade de íons de Fe livre presente nas soluções, tanto em pH 4,5 como em pH 7,4, se mantiveram quase que constante para ambas as MNPs após 24 h, principalmente para as MNP@DOPC. Indiferente do recobrimento em pH lisossomal, coo era de se esperar foi maior comparada em pH citosólico (MICHAEL et al., 2010).

Um fator que pode ser levado como prioridade e considerado como grande responsável por este resultado é o estado de agregação de ambas as MNPs (tamanhos obtidos pelo espalhamento de luz, Figura 14). Quanto menor o estado de agregação (mais próximos forem o tamanho das MNPs na microscopia e seu diâmetro hidrodinâmico) maior é a degradação devido aumento da superfície de contato (KOLOSNJAJ-TABI et al., 2016).

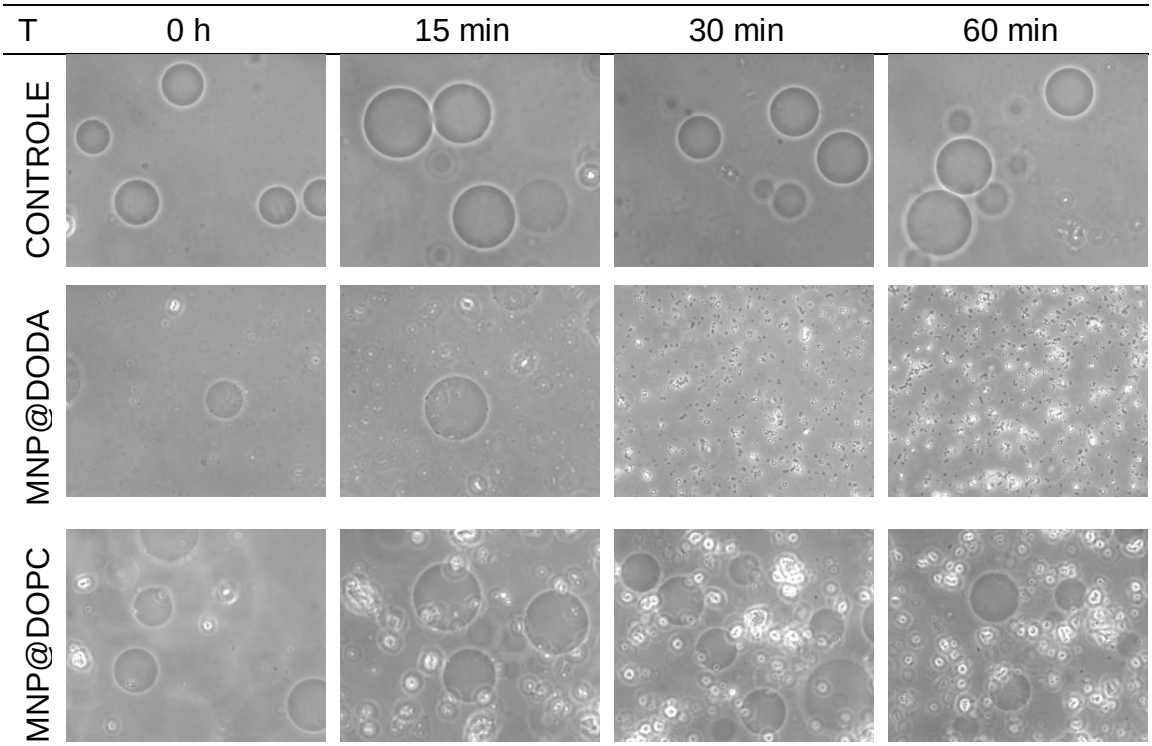
Esses resultados podem ser importantes para indicar que a viabilidade celular provém do fato dos processos metabólicos existentes nesse ambiente e não, do pH em que estão inseridas.

### 4.1.5 Interação das MNPs com modelos de membrana (membranas miméticas)

Visto na seção anterior que o pH do meio em que as células estarão inseridas para captação intracelular não é um fator essencial para toxicidade das células, o primeiro grande obstáculo a ser enfrentado tanto para as moléculas quanto para as MNPs entrarem nas células pode ser a membrana celular, que atua como uma barreira seletiva que determina o que pode ou não permear para o interior celular. Para que pudéssemos entender a interação inicial das MNPs sintetizadas com membranas foram realizados experimentos utilizando GUVs, que mimetizam adequadamente o componente lipídico das membranas e permitem visualização microscópica das alterações que podem ser induzidas durante a interação com as MNPs.

Como mencionado em detalhes na seção de materiais e métodos (tópico 3.7), as GUVs são preparadas em sacarose e dispersadas em soluções de glicose, de tal forma que o gradiente do índice de refração mantido pela membrana permita facilmente a visualização em microscópio ótico. A diferença de densidade entre sacarose (dentro na GUVs) e glicose (na solução) permite também que as GUVs tendam a se depositar nas lamínulas microscópicas ao invés de flutuar livremente em solução. As soluções de sacarose e glicose são de mesma concentração, evitando problemas com tensão na membrana e mantendo as GUVs com contraste e intactas durante o experimento (Figura 20, controle).

Figura 20. Imagens das GUVs (figuras esféricas, 1º linha), com MNP@DODAB (2º linha) e MNP@DOPC (3º linha) ao longo do tempo. Imagens obtidas do microscópio Zeiss numa lente de aumento de 63x

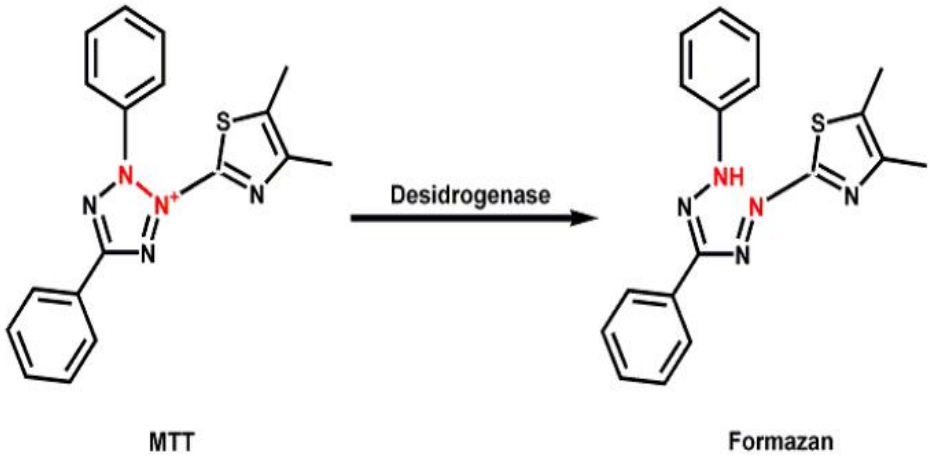



As GUVs que interagiram com as MNP@DOPC, quando compradas com as GUVs controle (Figura 20, 3º linha), se mantiveram esféricas e a suspensão de forma constante durante todo o experimento, similar ao observado no experimento controle (Figura 20, 1º linha), indicando que as MNP@DOPC não afetaram a integridade das membranas. Já as GUVs que interagiram com as MNPs@DODAB pareceram interagir fortemente com as GUVs afetando suas propriedades, uma vez que durante os primeiros 15 min observa-se uma diminuição na quantidade de GUVs até o desaparecimento total após 30 min (Figura 20; 2º linha, 3º coluna). Isso ocorre, pois a superfície das MNPs são positivas e interagem com a superfície negativa das GUVs contendo grupos fosfato, promovendo uma distorção e estresse osmótico (MAMIZUKA, 2007). De fato, MNPs positivas tem uma grande tendência a interagir com membranas biológicas conforme trabalho analisado por Jiang et al, criando a possibilidade desse tipo de NPs atuarem como entregadoras de DNA ao ambiente intracelular (JIANG et al., 2013).

### 4.1.6 Estudos de viabilidade celular

O MTT é um teste colorimétrico que mede a atividade enzimática da desidrogenase mitocondrial de células viáveis. Essa enzima reduz o MTT a formazan (Figura 21), um cristal de cor púrpura insolúvel em meio aquoso. O produto uma vez solubilizado em dimetilsufóxido (DMSO) é quantificado espectrofotometricamente pela leitura de absorbância em 550 nm. Essa redução do MTT em cristais de formazan é considerada indicativa da atividade metabólica celular e é comumente utilizada para se avaliar a viabilidade.

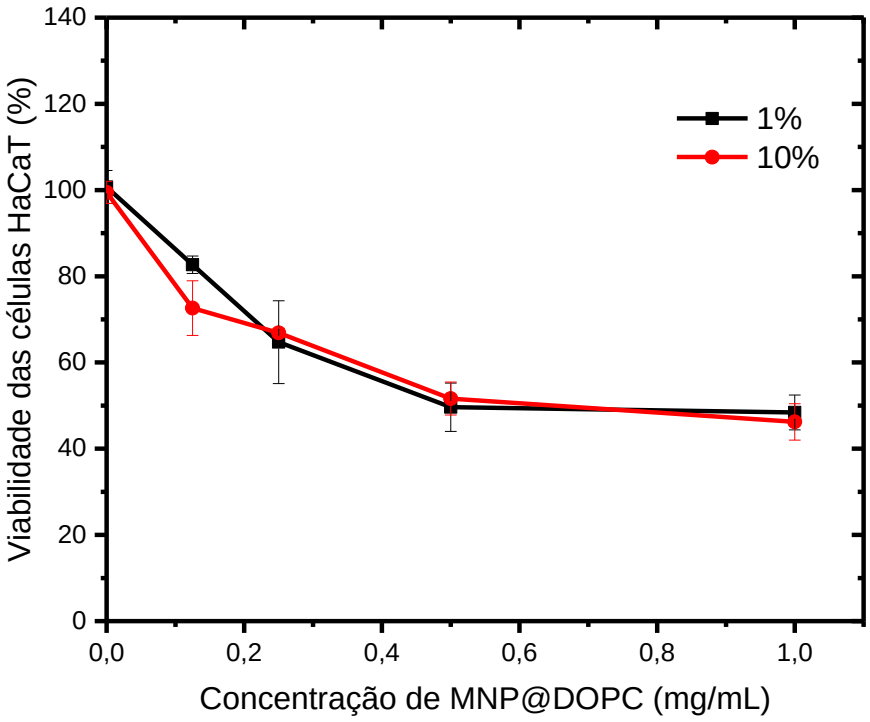
Figura 111. Redução do MTT ao cristal de Formazan

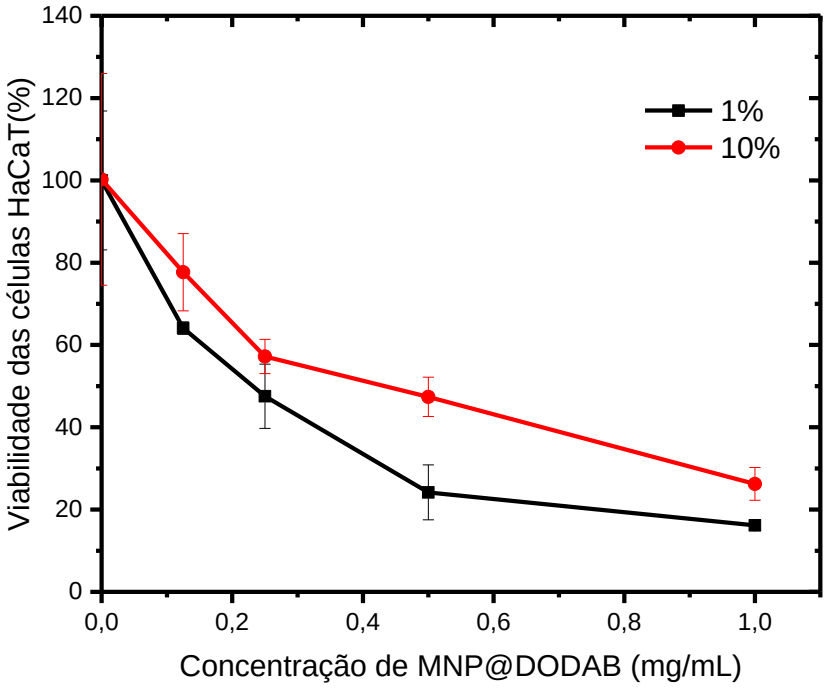



Fonte: Organizado pelo autor.

Uma vez sintetizadas, transferidas da fase orgânica para a aquosa e caracterizadas, as MNP@DOPC (carga switteriônica) e MNP@DODAB (carga positiva), foram submetidas ao teste de viabilidade celular em função da concentração de MNPs no meio (Figura 22).

Figura 122. Curva de viabilidade celular. a) MNP@DOPC em meio com 1% (linha preta) e 10% (linha vermelha) de SFB; b) MNP@DODAB em meio com 1% (linha preta) e 10% (linga vermelha) de SFB



O resultado de viabilidade celular para as MNPs em meio DMEM suplementado com 1% e 10% de SFB mostraram não haver distinção significativa em função da quantidade de SFB. Quando compradas as células submetidas às MNPs, as células que foram incubadas com as MNPs@DODAB tiveram a concentração inibitória a 50% ($IC_{50}$) com uma concentração 2 vezes maior do que as MNP@DOPC para o mesmo $IC_{50}$ (quando em meio suplementado com 1% de SFB. Os valores de $IC_{50}$ para as MNP@DOPC e MNP@DODAB foram 500 µg/mL para meio 10% de SFB. Este resultado demonstrando que a suplementação é mais importante do que a carga está de acordo com alguns artigos já publicados que comparavam a presença ou ausência de SBF (FERNÁNDEZ-BERTÓLEZ et al., 2018). Os diâmetros hidrodinâmicos das MNPs são menores em meio acrescido de 10% de SFB, por acreditar que as proteínas do soro podem atuar como espaçadores e diminuir a atração entras MNPS e, portanto, haveria uma maior eficiência de internalização quando comparada as MNPs em meio 1%, que apresentam um comportamento mais aglomerado e, devido a isto, provavelmente, sua internalização deva ocorrer por algum processo de maior gasto energético. Ainda assim, é importante ressaltar que, quando as células estão em meio com baixa concentração de soro há uma anormalidade quanto à manutenção de sua sobrevivência, e isso também dificulta qualquer processo celular que possa envolver gastos energéticos que de alguma forma acabem levando à perda de sua viabilidade.

O efeito mais significativo, no entanto, é o efeito do recobrimento. Assim como o resultado da degradação (seção 4.1.4) e a seção das GUVs (4.1.5), as MNP@DOPC são menos tóxicas do que as MNP@DODAB.

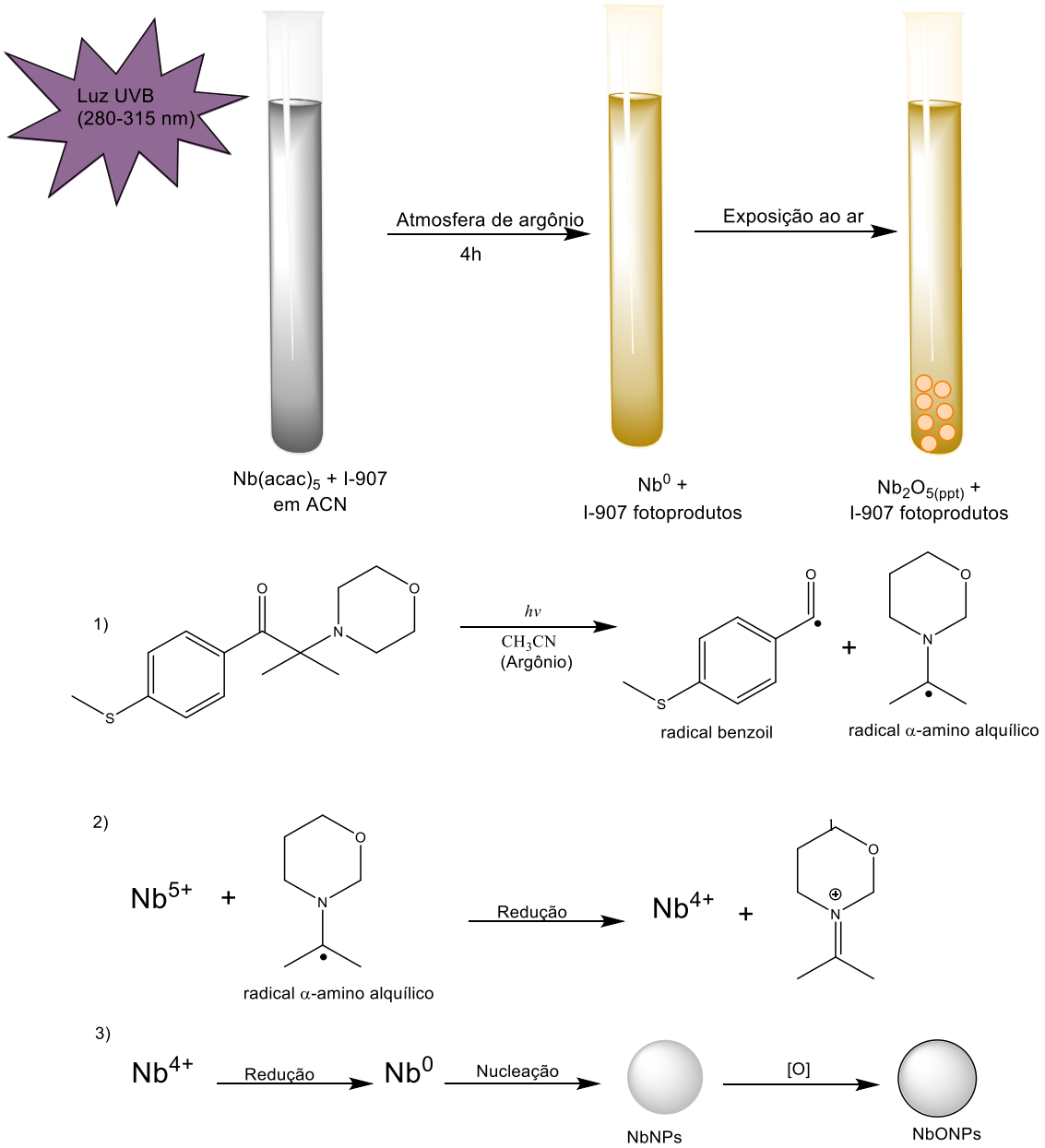
## 4.2 Pentóxido de Nióbio

Nos estudos com NbONPs buscou-se primeiramente definir qual a melhor metodologia de síntese para estas NPs (BRUST et al., 1995; MALYSHEV et al., 2013b; TURKEVICH; STEVENSON; HILLER, 1951). Após esta definição, foram medidos seu potencial catalítico e biológico, avaliando a viabilidade celular quando incubadas com NbONPs.

### 4.2.1 Preparação de nanopartículas de pentóxido de nióbio (NbONPs) pela metodologia fotoquímica

Este processo de preparação de nanopartículas, ilustrado na Figura 23, é baseado na utilização da luz como fonte geradora de radicais capazes de reduzir o metal nióbio e induzir a nucleação esférica, conforme foi descrito pelo grupo do professor Scaiano (MALYSHEV et al., 2013a).

Figura 133. Esquema da síntese pela metodologia fotoquímica




Fonte: Adaptado de (MALYSHEV, 2014).

Em uma solução reduzida de oxigênio e rica em gás inerte (argônio), foram adicionados acetonitrila (ACN) livre de umidade, o I-907 e o precursor de Nb, o $Nb(acac)_5$ - sintetizado previamente seguindo estudos de GIUFFRIDA et al. (2009) devido ao seu alto rendimento frente à outros percursores, como $NbCl_5$ e $Nb(etOH)_5$ (MALYSHEV, 2014). Sob a irradiação UVC, a clivagem do I-907 resulta em dois pares de radicais, sendo um α-aminoalquilico que possui forte poder de redução, levando o $Nb^{+5}$ ao estado de $Nb^0$ mudando a coloração da solução de incolor a marrom e, outro radical, a benzoil, que auxilia na nucleação e estabilidades das NPs de Nb recém-sintetizadas. Quando as nanopartículas de nióbio são expostas ao ar, elas são oxidadas e assim obtêm-se as nanopartículas de pentóxido de nióbio (NbONPs).

A caracterização das NbONPs por MEV (Figura 24) mostrou o tamanho e a morfologia das NbONPs sintetizadas por esta metodologia. Foi possível observar NbONPs arredondadas com diâmetro médio de 60 nm. Quando as mesmas foram analisadas no DLS, no mesmo solvente de síntese (ACN), seu tamanho médio foi de 240 nm, enquanto que em solvente aquoso a média apresentada foi de 607 nm. Isto demonstra a interação das moléculas de água com a superfície, evidenciando a formação do $[HNbO_3]$ (composto resultado do $NbO_5$ com a água, responsável pelos sítios ácidos de Bronsted e Lewis) com potencial Zeta de -63 mV.

A amostra também foi caracterizada por espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS), que representa uma ferramenta útil para obter informações como o estado de oxidação, o ambiente químico, entre outras características da superfície de um sólido. Usando como referência trabalhos anteriores (HRYNIEWICZ; ROKOSZ, 2013; MALYSHEV et al., 2013a; SINGH et al., 2017) e as proporções de área (Tabela 4), pôde ser constatado que os átomos Nb presentes na superfície do sólido são $Nb^{+5}$, formando assim o $Nb_2O_5$. A variação da energia de ligação (EL; Tabela 4) existente entre o material de referência e do material sintetizado pode ocorrer devido ao grau pureza e estrutura cristalina do nióbio.

Figura 144. Imagem obtida por MEV das NbONPs sintetizadas por método fotoquímico. Imagem por método COMPO (B), método SEM (A), histograma (abaixo).

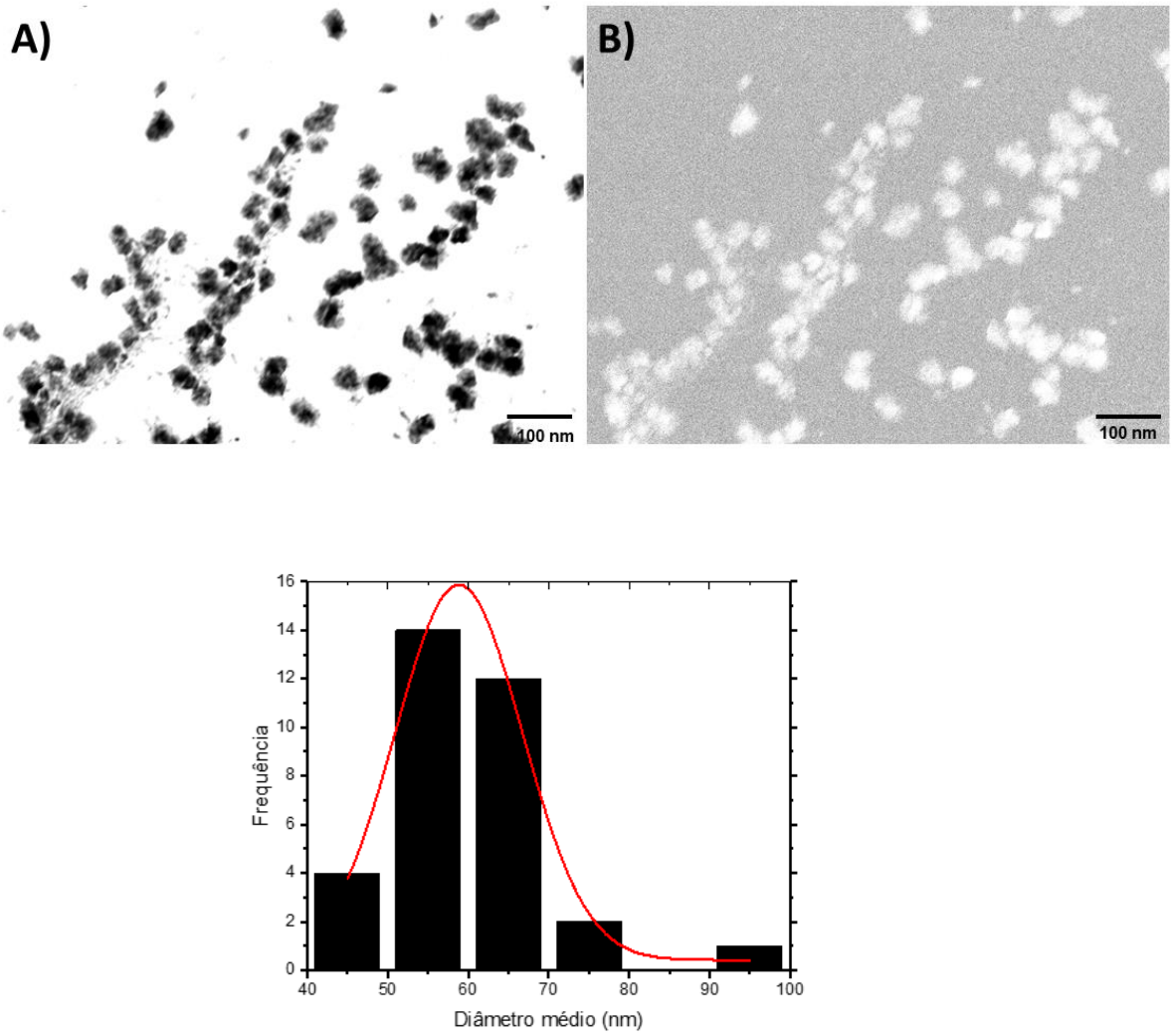



Tabela 4. Energias de ligação obtidas a partir do espectro de XPs analisando no programa CasaXPs

| | Tipo do Pico | EL (eV) | Área | Área (%) |
|---|---|---|---|---|
| $Nb_2O_5$ | $3d_{5/2}$ | 207.2 | 5713.5 | 59.99 |
| | $3d_{3/2}$ | 210.0 | 3810.9 | 40.01 |
| $Nb_2O_5$ (referência*) | $3d_{5/2}$ | 206.4 | 1865 | 59.5 |
| | $3d_{3/2}$ | 209.2 | 1270 | 40.5 |

*Referência baseia-se nos estudos apresentados HRYNIEWICZ e ROKOSZ, 2013.

Embora a síntese por esta metodologia apresente um excelente controle de tamanho, forma e boa aplicabilidade para estudos de catálise (MALYSHEV et al., 2013a), seu rendimento na melhor condição aqui descrita foi baixo (na escala de 0,1 µg), para estudos biológicos sendo assim não foi levado seus estudos adiantes.

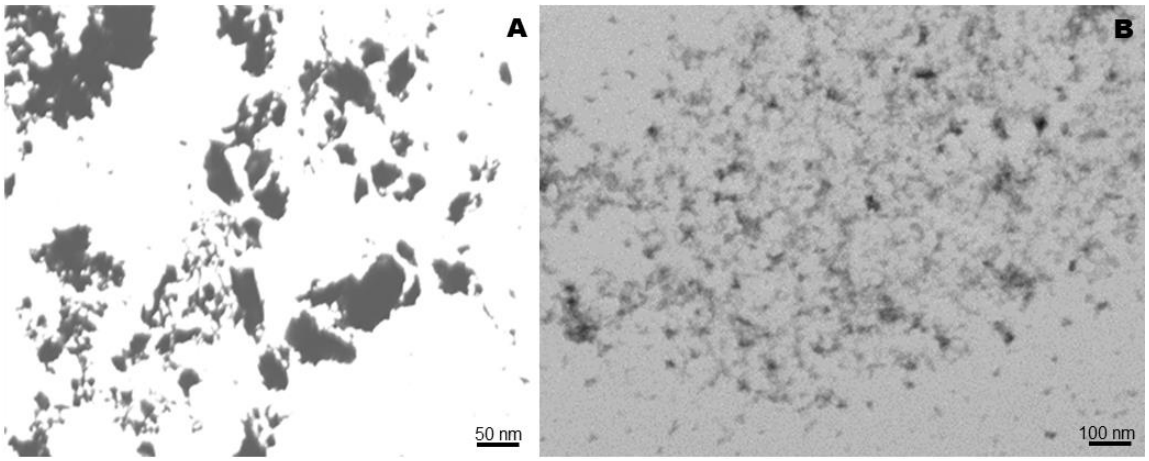
### 4.2.2 Síntese de NbONPs usando o método sol-gel

Essa metodologia é largamente utilizada para a síntese de nanopartículas de ouro (HERIZCHI et al., 2016), e foi escolhida para sintetizar NbONPs a partir de um precursor mais estável do que o $Nb(OEt)_5$ - que reage facilmente com a água vinda da umidade do ar - o $NbCl_5$, que solubiliza em solventes polares, como água e etanol.

Este processo de síntese consiste basicamente em reduzir íons precursores do metal desejado em íons ou precipitados do metal com número de oxidação menor. O citrato de sódio ($Na_3C_6H_5O_7$) e o boroidreto de sódio ($NaBH_4$) são exemplos clássicos de agentes redutores para tais sínteses, pois não geram subprodutos que poderiam delimitar a nucleação das NPs por reagir com as mesmas. Vale destacar que o $Na_3C_6H_5O_7$ pode atuar como agente redutor por possuir pares de elétrons livres nos seus grupos carboxílicos que coordenam com os orbitais livres dos metais e, estes mesmos pares de elétrons também, estabilizam a superfície das NPs de forma eletrostática mantendo dispersas e livres de agregação (RANOSZEK-SOLIWODA et al., 2016; ZHOU; WANG, 2012).

As análises realizadas (DLS, MEV e XPS) para esta metodologia foram suficientes na caracterização do $Nb_2O_5$. Através da análise realizada por microscopia, têm-se para ambos reagentes redutores (com o uso de $Na_3C_6H_5O_7$ e do $NaBH_4$) uma morfologia não definida e, por isso, é difícil determinar de tamanho médio (Figura 25). Ainda assim, estas partículas foram submetidas ao espalhamento de luz, que descreve o tamanho de partículas a partir do movimento browniano, utilizado apenas para partículas esféricas. A análise apresentou partículas com tamanhos médios de 170 nm para as NbONPs obtidos com citrato como agente redutor e 130 nm para as NbONPs obtidas com $NaBH_4$.

Figura 155. Imagens de microscopia eletrônica; a) usando citrato de sódio como agente redutor (TEM) e (b) usando boroidreto de sódio, como agente redutor (SEM)




A espectroscopia de XPS (Tabela 5) mostra que, embora a preparação da amostra tenha a mesma proporção de sólido/solvente, a porcentagem de nióbio no estado +5 das NbONPs vindas do $NaBH_4$ é bem menor comparada às NbONPs vindas da síntese com o uso de citrato. Outra razão para o aparecimento de outras energias de ligação possa ser que o Nb esteja em estado +5 mas não esteja ligado ao oxigênio e sim a algum outro elemento não analisado, como carbono, por exemplo (MARQUES et al., 2008).

Tabela 5. Energias de ligação obtidas a partir do espectro de XPs analisando no programa CasaXPs

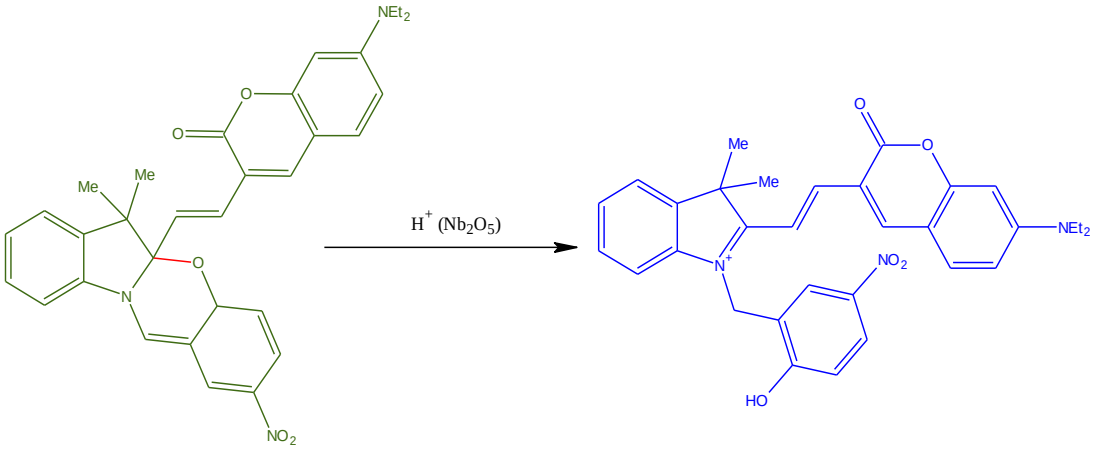
| | Tipo do Pico | EL (eV) | Área | Área (%) |
|---|---|---|---|---|
| $Nb_2O_5$ (citrato) | $3d_{5/2}$ | 207,2 | 11789 | 47,98 |
| | $3d_{3/2}$ | 209,9 | 7863 | 32,00 |
| | | 208,3 | 2952 | 12,01 |
| $Nb_2O_5$ ($NaBH_4$) | $3d_{5/2}$ | 210,4 | 303,6 | 16,39 |
| | | 207,6 | 455,2 | 24,57 |
| | $3d_{3/2}$ | 210,5 | 656,2 | 35,42 |
| | | 213,3 | 437,7 | 23,62 |
| $Nb_2O_5$ (referência*) | $3d_{5/2}$ | 206.4 | 1865 | 59,5 |
| | $3d_{3/2}$ | 209.2 | 1270 | 40,5 |

*Referência baseia-se nos estudos apresentados HRYNIEWICZ e ROKOSZ, 2013

Uma vez obtido esses resultados, mesmo com a morfologia não definida e com outros subprodutos de nióbio, no caso da síntese com o uso de $NaBH_4$, as NbONPs foram testadas quanto ao seu potencial de redução, visto da novidade da metodologia já conhecida para outros metais mas não o nióbio. Para isso,

usou-se a molécula cumarina (R58) sintetizada e também testada pelo grupo do Dr. Scaiano (MARIN et al., 2014). Esta molécula R58 apresenta uma absorção de luz em 417 nm, porém, quando sofre redução, sua absorção desloca-se para o comprimento de 660 nm (Figura 26).

Figura 26. Reação da cumarina em meio ácido, inicialmente, a absorção de luz acontece em 417 nm e quando em meio com ácido de Bronsted, absorve em 660 nm




CUMARINA (R58)

Fonte: Organizado pelo autor.

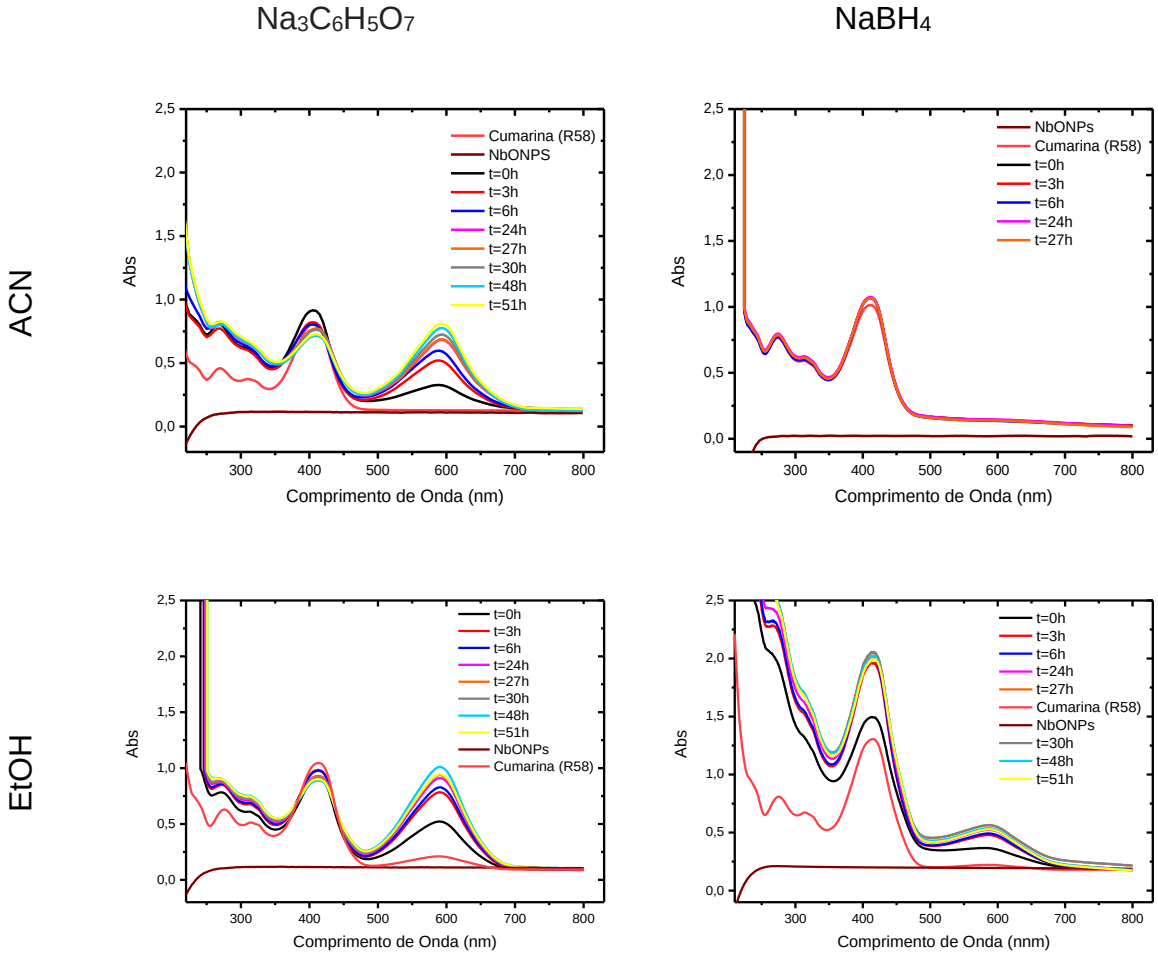
As reações de redução foram acompanhadas por três dias. As NbONPs provenientes da síntese com $Na_3C_6H_5O_7$ como agente redutor, independe do solvente, ou seja, no polar aprótico (ACN) ou no polar prótico (etOH), mostraram atividade crescente nas primeiras 24 h de reação, quando, a partir de então, a R58 entrou em estado de equilíbrio entre as duas estruturas (Figura 27, coluna à esquerda). O mesmo não pode ser observado quando se utilizou as NbONPs provenientes da síntese com $NaBH_4$. Embora tenha sido usada a mesma quantidade de catalisador, solvente e reagente, os resultados não foram iguais. As NbONPs vindas do citrato reagiram tanto em ACN quanto em etOH enquanto que, as provenientes do $NaBH_4$ só apresentaram um discreto aparecimento da absorção em 617 nm em etOH (Figura 27, coluna à direita).

A explicação para tal resultado (Figura 27, coluna à direita) somado a análise do espectro de XPS (Tabela 5), onde pode ser visto as porcentagens de Nb nas energias de ligação (EL) de referência são bem menores do que as esperadas, somado ao fato de que quando as NbONPs estão em ACN, os íons de $Na^+$ ficam sob a superfície das NbONPs e em etOH, estes ficam dispersos no solvente permitindo que NbONPs e seus

sítios ácidos interajam com a R58. As NbONPs vindas do citrato, estão com a porcentagem da EL nas transições correspondentes próximas a de referência.

Essas metodologias não houveram maiores estudos e investigações no sentido de melhorar a morfologia devido à existência de outras sínteses com um maior potencial, tais resultados serão apresentados a seguir.

Figura 27. Cinética de R58 quando adicionado NbONPs provenientes de diferentes agentes redutores e em diferentes solventes

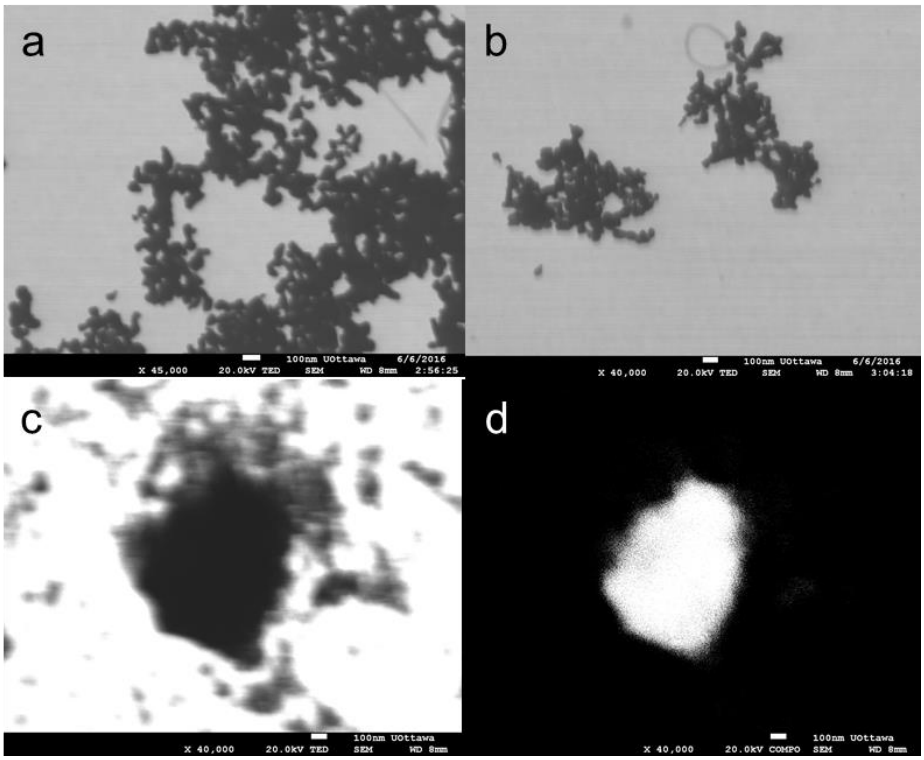



### 4.2.3 Preparação de NbONPs pela metodologia de controle de pH

O oxalato de nióbio (V) e amônio hidratado ($C_4H_4NNbO_9.xH_2O$), um reagente solúvel em solvente aquoso, foi usado como precursor dessa metodologia e, através do controle do pH, este sal de nióbio ($Nb^{+5}$) é precipitado a $Nb_2O_5$. Embora extremamente simples, a morfologia obtida para as NbONPs não foi controlada (Figura 28 a e 28 b). Como alternativa, foi então usada

dopamina (DA) com intuito de que esta molécula pudesse auxiliar na estabilidade das NbONPs, seja na interação dos grupos catecóis, seja por repulsão do grupo amina com a superfície das NbONPs e assim, talvez, controlar a morfologia e tamanho das partículas sintetizadas (figura 28 c e 28 d). Houve uma pequena melhora, mas, ainda não foi possível definir a morfologia destas partículas (Figura 28 c e 28 d). Contudo, as NbONPs quando submetidas a técnica de DLS para uma estimativa, mostraram-se com duas populações de tamanhos de 275 nm (88%) e 135 nm (12%).

Figura 28. Microscopia de MEV. (a) e (b) para NbONPs a partir de oxalato e água; (c) e (d) para NbONPs usando dopamina para estabilizar, imagens em (d) estão no modo COMPO do equipamento




A DA se mostrou como uma molécula em potencial no sentido de controlar o crescimento e morfologia para as NPs, dando tempo para a nucleação de uma forma mais controlada e direcionada (ZHAO et al., 2012). Os grupos aminos presentes na dopamina com pKa em torno de 10-11 auxiliam na redução lenta e mais controlada dos íons de nióbio quando gotejada a solução de $NH_4OH$, comparadas com a redução realizada na ausência da porém, a DA também é capaz de polimerizar desestabilizando as NPs acarretando em precipitados (CHEN et al., 2017).

### 4.2.4 Preparação de NbONPs pela metodologia solvotérmico

Este processo de síntese utiliza poucos reagentes, tais como, o álcool benzílico (BA) - atuando como solvente e agente direcionador de estrutura (BUHA et al., 2010) - e o precursor do nióbio. Para esta síntese foram testados os três precursores usados anteriormente, $NbCl_5$, $Nb(etOH)_5$ e $C_4H_4NNbO_9.xH_2O$, na presença e ausência de DA numa tentativa de direcionar um maior controle na morfologia para as NPs. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas para todas as amostras preparadas (Figura 29). Inicialmente, foi observada a formação de partículas de tamanho em escala nanométrica (Tabela 6 e 7), porém com morfologia pouco definida, principalmente para a síntese em que foram usados $Nb(et)_5$ e $C_4H_4NNbO_9.xH_2O$ sem DA (Figura 29, coluna à esquerda). Embora não haja dados na literatura para suportar a interação dos íons de Nb e DA, o uso da foi observado como realmente determinante no auxílio de se obter uma melhor morfologia das NbONPs. Vale ressaltar neste comparativo que, a síntese a partir de $C_4H_4NNbO_9.xH_2O$, quando se usa a DA há um ganho no controle da morfologia (Figura 29, última linha).

Seguindo o artigo de NICO et al. (NICO; MONTEIRO; GRAÇA, 2016), quando as NbONPs são submetidas à alta temperatura (600-800ºC), há um ganho de cristalinidade diminuindo a superfície das NbONPs que assumem uma estrutura cristalina mais estável, ortorrômbica (Figura 29, coluna à direita). Isso realmente pôde ser visto em NbONPs vindas da síntese usando o $NbCl_5$ e o $C_4H_4NNbO_9.xH_2O$, quando calcinadas e sem o uso de dopamina apresentaram um tamanho menor quando analisados por espalhamento de luz (Tabela 8 e 9).

Figura 29. Análise de MEV das NbONPs obtidas após o uso de diversos precursores, calcinados ou não calcinados após as reações

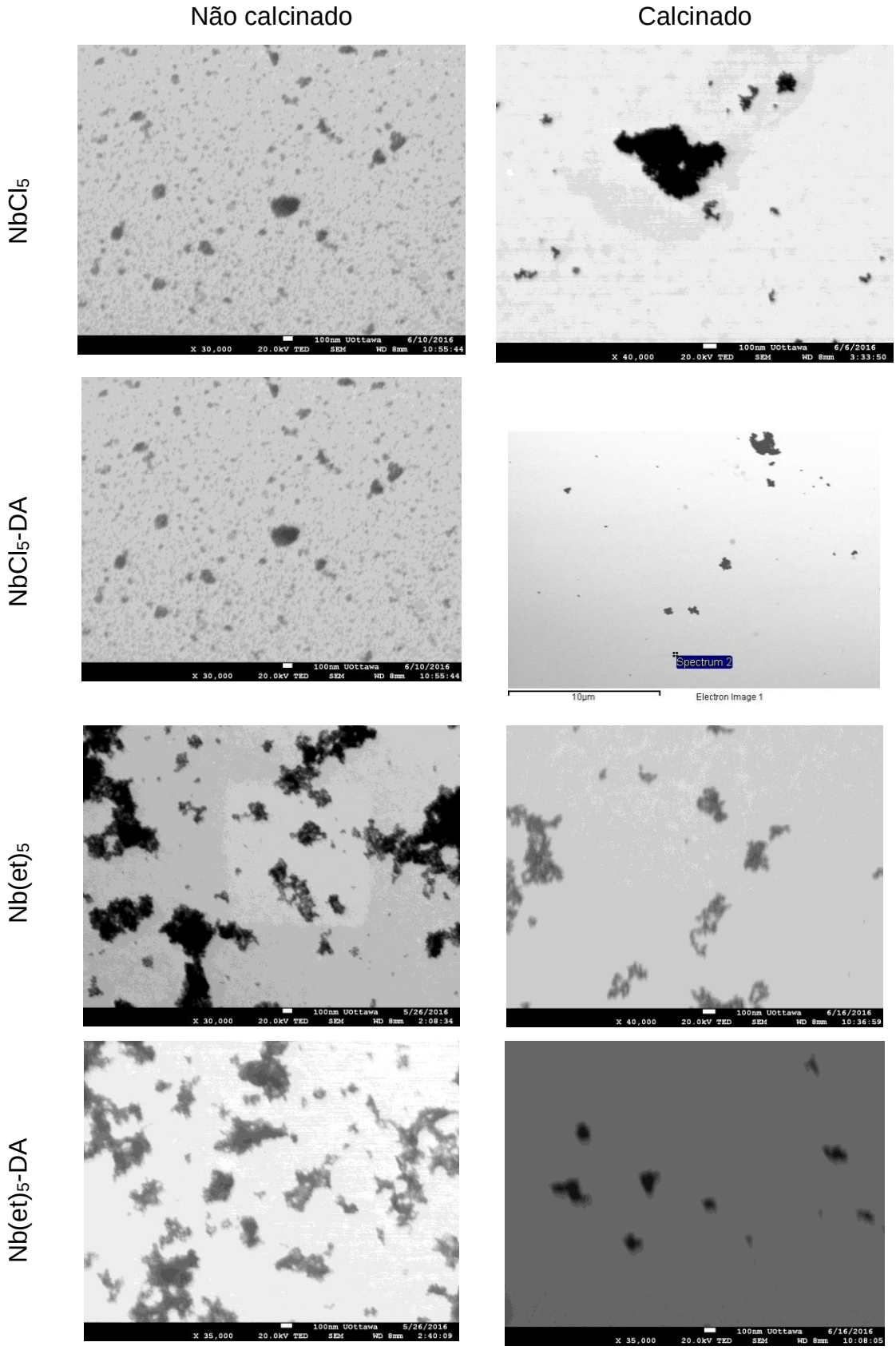


Figura 29. Análise de MEV das NbONPs obtidas após o uso de diversos precursores, calcinados ou não calcinados após as reações (continuação)

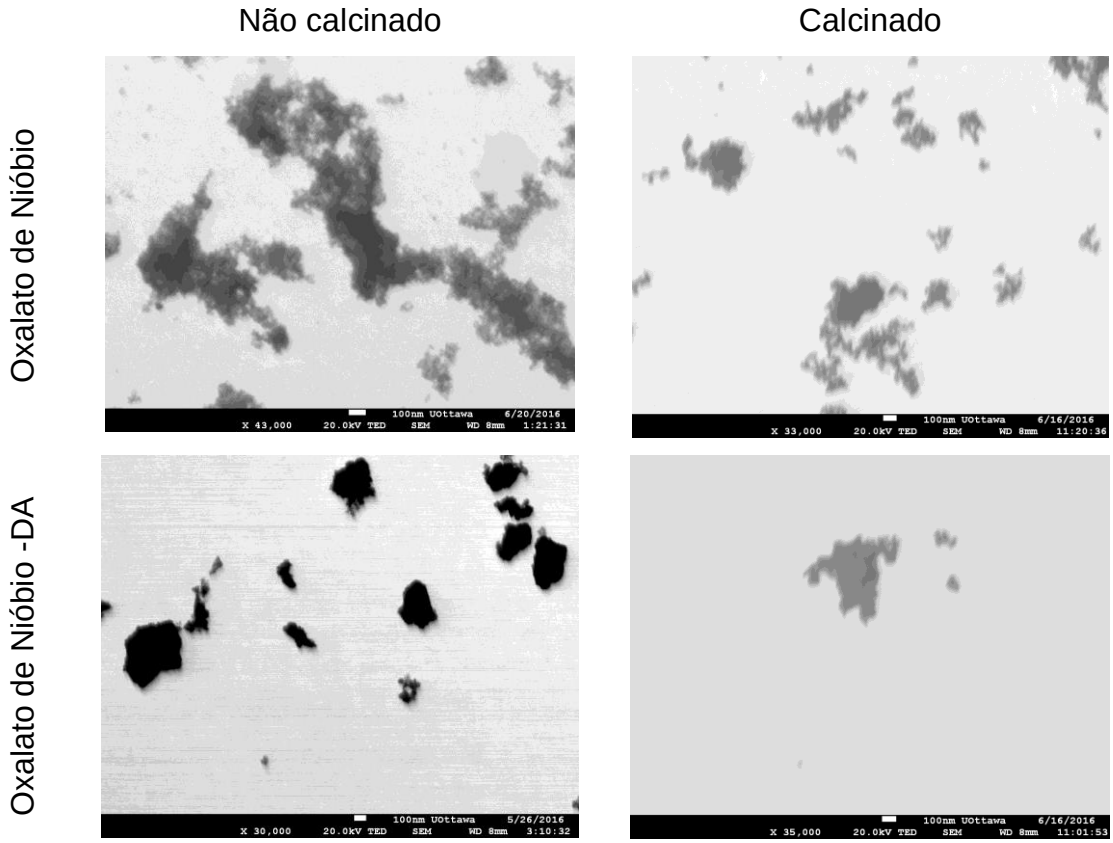



Tabela 6. As medidas de DLS realizadas em triplicadas

| Leitura/Precursor | $NbCl_5$ | | $Nb(et)_5$ | | $C_4H_4NNbO_9.xH_2O$ | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 265 nm | 33% | 246 nm | 31.8% | 145 nm | 98,9% |
| | 688 nm | 67% | 979nm | 68.2% | 477 nm | 1,1% |
| **2** | 392 nm | 87.8% | 304 nm | 42.6% | 138 nm | 28.9% |
| | 1309 nm | 12.2% | 1196 nm | 57.4% | 3519 nm<br>3482 nm | 52.6%<br>18.5% |
| **3** | 389 nm | 76.9% | 295 nm | 44.1% | 438 nm | 68.8% |
| | 3050 nm | 23.1% | 1382 nm | 55.9% | 120 nm | 31.2% |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Média** | **349 nm** | **65.9%** | **282 nm** | **1.1%** | **135 nm** | **30,1%** |
| | **1682 nm** | **34,1%** | **372 nm** | **98.9%** | **458 nm** | **69.9%** |

Tabela 7. As medidas de DLS realizadas em triplicadas quando se usou DA como molécula estabilizante

| **Precursor com DA** | **$NbCl_5$** | | **$Nb(et)_5$** | | **$C_4H_4NNbO_9.xH_2O$** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 254 nm | 33% | 339 nm | 23.4% | 209 nm | 33.8% |
| | 657 nm | 67% | 1541 nm | 76.6% | 1007 nm | 66.2% |
| **2** | 380 nm | 87.8% | 282nm | 16% | 220 nm | 29.2% |
| | 3840 nm | 12.2% | 1404 nm | 84% | 707 nm | 58.9% |
| | | | | | 4230 nm | 11.9% |
| **3** | 309 nm | 76.9% | 292 nm | 16.2% | 1008 nm | 46.5% |
| | 802 nm | 23.1% | 1547 nm | 83.8% | 242 nm | 33.6% |
| | | | | | 3441 nm | 19.9% |
| **Média** | **314 nm** | **50%** | **305 nm** | **18.5%** | **224 nm** | **32.2%** |
| | **730 nm** | **50%** | **1497 nm** | **81.5%** | **907 nm** | **57.2%** |
| | | | | | **3835 nm** | **10.6%** |

Tabela 8. As medidas de DLS realizadas em triplicadas calcinadas

| **Precursor Calc.** | **$NbCl_5$** | | **$Nb(et)_5$** | | **$C_4H_4NNbO_9.xH_2O$** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 43. nm | 19.1% | 180.4 nm | 19.1% | 61.88 nm<br>174.5 nm | 10.6%<br>85.8% |
| | 138.6 nm | 80.9% | 724.5 nm | 80.9% | 843 nm | 3.6% |
| **2** | 106 nm | 100% | 218.7 nm<br>910.8 nm | 28.4%<br>71.6% | 67.27 nm<br>175.1 nm | 13.4%<br>86.6% |
| **3** | 52.1 nm<br>152.1 nm | 76.9%<br>23.1% | 165.9 nm<br>630.2 nm<br>262.3 nm | 12.1%<br>61.2%<br>26.7% | 87.89 nm<br>194.7 nm | 29.2%<br>70.8% |
| **Média** | **47.7 nm**<br>**132.3 nm** | **11.7%**<br>**88.3%** | **128.7 nm**<br>**371.7 nm** | **1,1%**<br>**98.9%** | **72.4 nm**<br>**181.4 nm** | **21.1%**<br>**79.9%** |

Tabela 9. As medidas de DLS realizadas em triplicadas quando se usou DA como molécula estabilizante e pós calcinação

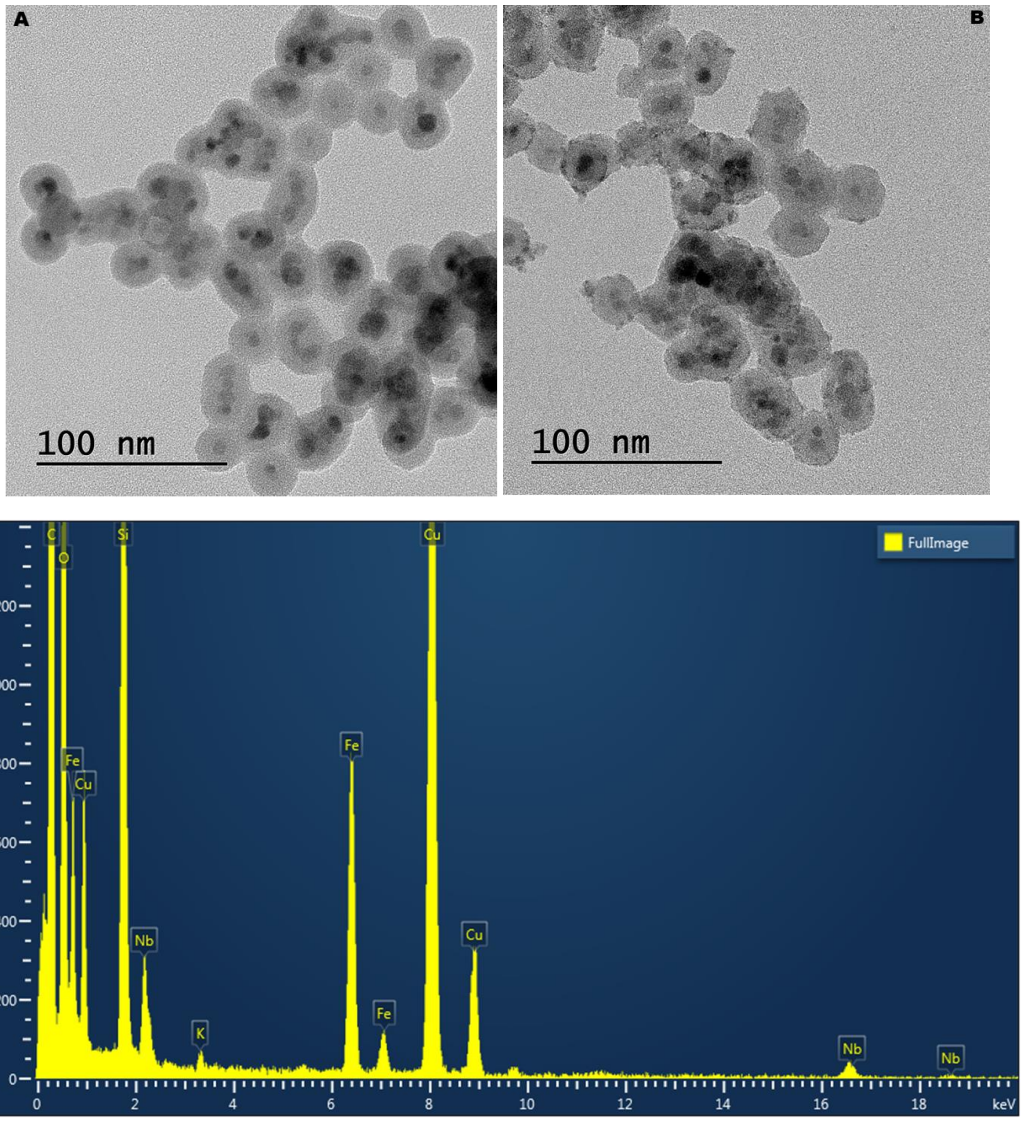
| **Precursor Calc-DA** | **$NbCl_5$** | | **$Nb(et)_5$** | | **$C_4H_4NNbO_9.xH_2O$** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 164nm | 100% | 136 nm | 100% | 107 nm<br>445 nm | 33.8%<br>66.2% |
| **2** | 220 nm | 100% | 105 nm | 100% | 374 nm | 100% |
| **3** | 235 nm | 100% | 110 nm | 100% | 408 nm<br>82 nm | 94.4%<br>5.6% |
| **Média** | **206 nm** | **100%** | **117 nm** | **100%** | **409 nm<br>95 nm** | **93.6%<br>6.4%** |

### 4.2.5 Síntese das NbONPs suportadas em nanopartículas de óxido de ferro (MNPs) recobertas com sílica ($Fe_3O_4$@$SiO_2$)

Um dos processos de síntese também bastante promissor é a síntese combinada usando o $C_4H_4NNbO_9.xH_2O$, que é solúvel em meio aquoso, e depositá-lo conforme item 4.2.3 diretamente sobre um suporte sólido, neste caso foram escolhidas nanopartículas de óxido de ferro recobertas com sílica ($Fe_3O_4$@$SiO_2$) - material inerte e que pode ser facilmente removido de qualquer meio por separação magnética.

A caracterização feita por microscopia mostra que a deposição foi bem-sucedida (ver a diferença entre as imagens da figura 30 a e 30 b), além do resultado obtido por EDS, mostrando a presença de nióbio (Nb Lα1 ~2,2 keV) na superfície das NPs. O tamanho estimado para as $Fe_3O_4$@$SiO_2$ é de 30 nm, já com a impregnação não se vê mudança no tamanho, mas é percebido alguns pontos na superfície de sílica, além da maior aglomeração das NPs. Para corroborar na caracterização dessas NPs e confirmar a presença do óxido de nióbio, realizou-se testes para verificar a acidez do material, possivelmente proveniente das NbONPs, em reações de desidratação de álcoois, que será discutido na próxima seção 4.2.5.1.

Figura 30. Microscopia das nanopartículas de ferro com suporte de sílica na ausência $Fe_3O_4@SiO_2$) (A) e na presença de óxido de nióbio $Fe_3O_4@SiO_2@NbONP$ (B). Abaixo, análise de espectroscopia de raio X dispersiva em energia (EDS) da amostra com Nb.



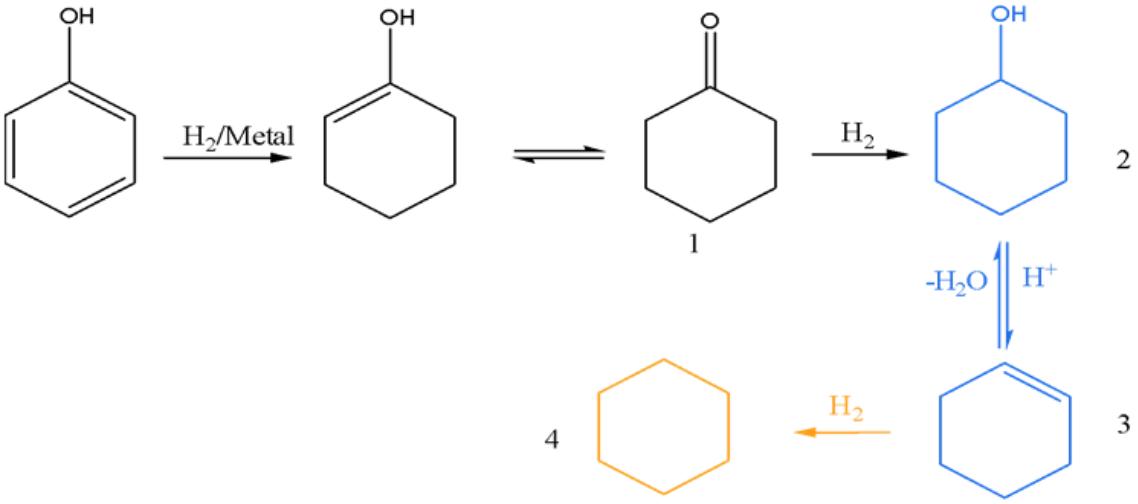

### *4.2.5.1 Avaliação da acidez das NbONPs suportadas em $Fe_3O_4@SiO_2$*

As NbONPs foram aplicadas inicialmente na reação de desidratação de álcool ao correspondente alcano. A reação modelo foi a desidratação de ciclohexanol a ciclohexano (FENG et al., 2017; MORTENSEN et al., 2016; YAO et al., 2015)FENG et al., 2017; MORTENSEN et al., 2016; YAO et al., 2015) para verificar o potencial dos sítios ácidos de Bronsted e Lewis do óxido de nióbio, uma vez que essa reação é a etapa determinante em reações de hidrodeoxigenação

de compostos fenólicos ( A; LUQUE, 2015; LUSKA et al., 2015) e, seus resultados confirmados por cromatografia gasosa (GC/FID).

Inicialmente foi usado um catalisador nanoparticulado metálico de rutênio (Ru) sintetizado pelo grupo da professora Liane Marcia Rossi, para demonstrar a atividade de redução viria das NbONPs e não das nanopartículas de rutênio.

Figura 16. Etapas de reação de hidrodeoxigenação (HDO)




Fonte: Organizado pelo autor.

Os resultados catalíticos estão apresentados na Tabela 10. Na reação feita apenas usando o catalisador de Ru, embora houvesse total conversão do substrato de partida (fenol), foi observado que após 12 h de reação, a seletividade para o ciclohexano (Figura 31, composto 4) foi de somente 6%, sendo o produto majoritário observado, o ciclohexanol (94%). O catalisador de Ru não foi capaz de converter o fenol em ciclohexeno por DDO e seu produto majoritário foi ciclohexanol. A explicação para isso é que o metal foi suportado em sílica ($SiO_2$) que não tem sítios suficientemente ácidos (YAO et al., 2015). A reação realizada empregando somente as NbONPs suportadas em $Fe_3O_4$@$SiO_2$ não apresentou conversão do fenol, como era esperado. Logo, combinar o melhor catalisador para cada etapa da reação HDO (DO et al., 2012; NELSON et al., 2015; SHAFAGHAT; REZAEI; DAUD, 2016), seria o ideal. O $Nb_2O_5$ suportado em nanopartículas de óxido de ferro revestidas com sílica e o rutênio suportado em ($SiO_2$) foram colocados juntos para que, ao mesmo tempo, pudessem efetuar as etapas necessárias para a conversão do fenol em ciclohexano (Figura 31, composto 4).

O resultado após 12 h foi conforme o esperado, o Ru comportou-se bem para a etapa hidrogenação e o $Nb_2O_5$ foi eficiente na deoxigenação, atuando como um bom ácido de Lewis e Bronsted., convertendo o fenol a ciclohexano (Tabela 10, entrada 3). A reatividade é análoga à descrita em alguns trabalhos existentes na literatura (DO et al., 2012; FOSTER; DO; LOBO, 2012; NIE et al., 2014).

Tabela 10. Resultados da reação de hidrodeoxigenação (HDO) com uso de diferentes catalisadores.

| Entrada | Catalisador | Conversão (%) | Seletividade (%) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1 | $Ru/SiO_2$ | 100 | - | 94 | | 6 |
| 2 | $Nb_2O_5$ | - | - | - | - | - |
| 3 | $Ru/SiO_2 + Nb_2O_5$ | 100 | - | - | - | 100 |

### 4.2.6 Viabilidade celular das NbONPs suportadas em $Fe_3O_4@SiO_2$

Após testar diferentes processos de síntese, foi selecionada a síntese das NbONPs sobre as nanopartículas de magnetita recobertas com sílica para teste de viabilidade celular, pois ela apresentou resultados em catálise mais consistentes, com morfologia melhor definida, uma vez que a morfologia é dada pelas partículas de magnetita revestidas e não pela impregnação do óxido de nióbio na superfície.

Ao incubar as $Fe_3O_4@SiO_2@NbONPs$ e $Fe_3O_4@SiO_2$ em meios com 1% ou 10% de SFB, o que pode ser visto (Figura 32 e 33) é que em meio 1% as NbONPs são mais influenciáveis de uma forma geral no crescimento das células do que as NbONPs quando está em meio acrescido de 10%. Isto pode ser explicado primeiramente pelo fato da célula em meio 1% já estar numa situação de vulnerabilidade homeostática comparada ao meio 10%.

Figura 172. Curva de viabilidade celular das $Fe_3O_4@SiO_2$ em cultivo de células com meio 1% SFB (linha vermelha) e 10% SFB (linha preta)

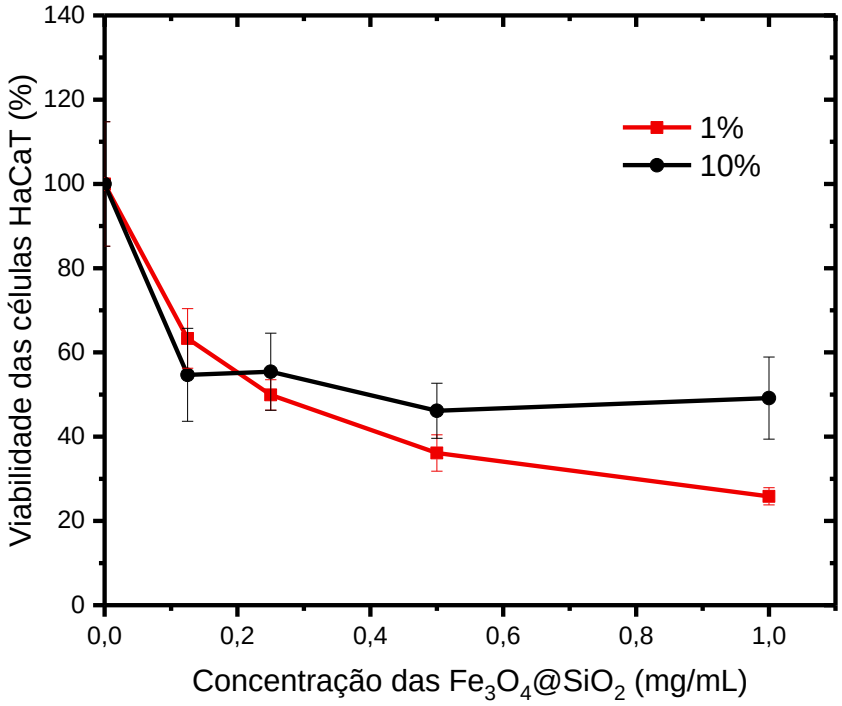
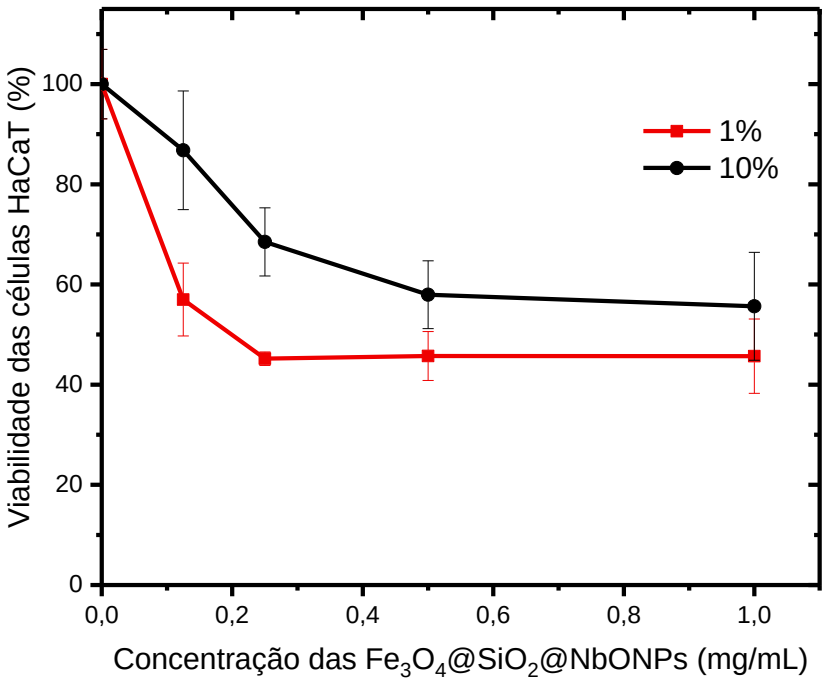



Figura 18. Curva de viabilidade celular das $Fe_3O_4@SiO_2@NbONPs$ em cultivo de células com meio 1% SFB (linha vermelha) e 10% SFB (linha preta)



Comparando as $Fe_3O_4$@$SiO_2$@NbONPs e $Fe_3O_4$@$SiO_2$, vê-se que as $Fe_3O_4$@$SiO_2$@NbONPs indica menos toxicidade comparada às recobertas apenas com sílica ($IC_{50}$ de 0,25 mg/mL e 0,50 mg/mL, respectivamente). A falta de quantificação da concentração exata de NbONPs impregnadas não permite chegar à conclusão se a não citotoxicidade é devido as NbONPs impregnadas estarem em concentração/quantidade suficiente para o estudo ou se na população de $Fe_3O_4$@$SiO_2$@NbONPs adicionadas para tal experimento não continha $Nb_2O_5$ suficiente.

No estudo de HU et al. (HU et al., 2018), os autores adicionaram nanopartículas de carbeto de nióbio (NbCNP) a estruturas de hidrogel e ao realizarem ensaios de citotoxicidade *in vitro* puderam demonstrar que a adição das NbCNP não reduziu a viabilidade celular, mostrando a biocompatibilidade das NbCNP.

Desta forma, sugere-se que a citotoxicidade encontrada em nossos resultados com NbONPs pode estar principalmente associada às $Fe_3O_4$@$SiO_2$ do que as NbONPs propriamente.

# 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

## 5.2 Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (MNPs)

As metodologias encontradas para a síntese de MNPs são muito vastas e todas com potencial dependendo da sua aplicação. Para uso em meio biológico, é importante que contenham boa distribuição de tamanho, dispersão e biocompatibilidade. Dentre as metodologias de síntese exploradas inicialmente, duas foram selecionadas para avaliação do potencial citotóxico: a decomposição térmica, por fornecer amostras de tamanho bem controlado, e a *laser ablation*, por ser uma nova abordagem de síntese de nanopartículas diretamente em meio aquoso.

A síntese de MNPs por *laser ablation* é uma abordagem nova que apresenta vantagens em relação às sínteses químicas pela rapidez e simplicidade, empregando apenas um alvo mássico e água. Requer, porém, uma instalação sofisticada com lasers apropriados. As nanopartículas obtidas, com a mesma composição do alvo, apresentaram morfologia esférica, sem grande controle de tamanho. Uma desvantagem foi o baixo rendimento. Estudos quanto à otimização da síntese para um aumento de rendimento e controle de tamanho são necessários e encorajados, pois se trata de uma metodologia simples, uma vez que você tenha os lasers adequado.

As MNPs preparadas por decomposição térmica apresentaram excelente controle de tamanho, porém como são preparadas em meio orgânico, não estão prontamente disponíveis para estudos biológicos. As MNPs como preparadas apresentam-se hidrofóbicas, porém após sua associação com fosfolipídios ganharam estabilidade em soluções aquosas. Estas mesmas MNPs foram associadas a dois diferentes tipos de fosfolipídios: em pH fisiológico, um de natureza catiônica (DODAB) e outro de natureza zwitteriônica (DOPC), conferindo a elas diferentes comportamentos em ambiente fisiológico e celular. Viu-se que a citotoxicidade das MNP@DOPC pode ser proveniente das interações de biomoléculas e metabolismo intracelular, uma vez que a quantidade de ferro livre na solução manteve-se constante, não degradando em solução no pH 7,4. As MNP@DODAB mostraram-se muito mais suscetíveis às interações com as membranas por possuírem uma carga positiva devido à superfície das

membranas apresentarem cargas líquidas negativas. O teste de citotoxicidade destas MNPs, corroboraram aos experimentos anteriores demonstrando uma baixa citotoxicidade para as MNP@DOPC e maior para as MNP@DODAB. Além da carga superficial, devemos nos ater ao fato do DOPC ser um dos componentes da membrana, ou seja, naturalmente o recobrimento com DOPC acaba blindado as células de uma sobrecarga de ferro que poderia desencadear um estresse oxidativo e morte celular. Já nas MNP@DODAB, a citotoxicidade alta pode ser atribuída ao efeito observado nos estudos com vesículas gigantes; elas interagem com a membrana levando a um colapso celular pela ruptura da membrana.

As MNPs funcionalizadas preparadas nesta Tese tem um grande potencial, principalmente as MNP@DOPC, quando colocalizadas intracelularmente para estudos de morte controlada pela possível libração de ferro e desencadeamento de estresse oxidativo.

## 5.3 Nanopartículas de Óxido de Nióbio

Nanopartículas de óxido de nióbio (NbONPs) têm sido principalmente avaliadas com respeito ao seu potencial em aplicações tecnológicas, como a catálise devido ao seu caráter ácido. Os estudos de NbONPs visando aplicações biológicas são mais discretos. Sabendo da necessidade de controle de morfologia e tamanho, foram avaliadas diversas metodologias de síntese e tratamentos pós-síntese, como por exemplo, a calcinação, para a seleção de bons materiais para estudos biológicos. As metodologias exploradas levaram a obtenção do material desejado, óxido de nióbio, porém com morfologia mal definida na maioria dos casos. A síntese fotoquímica resultou em um melhor controle de tamanho, porém a concentração obtida foi muito baixa, inviabilizando os estudos posteriores. Destacaram-se também as preparações pelo método de Brust ($NaBH_4$) e citrato. Outra dificuldade encontrada foi a baixa estabilidade em meio aquoso, tornando os estudos com células difíceis, uma vez que o material precipita em solução. Buscando contornar essa dificuldade, optamos pela imobilização de nanopartículas de óxido de nióbio numa superfície estável e conhecida por muitos trabalhos; a magnetita recoberta com sílica. A morfologia esférica do material de partida foi preservada e as nanopartículas de nióbio foram depositadas uniformemente sobre o material. Esse material foi usado na avaliação de seu

potencial de acidez e a citotoxicidade, apresentando um excelente potencial ao ser empregado na reação de desidratação de álcoois devido ao seu caráter ácido, e apresentou baixa citotoxicidade ($IC_{50}$ de 0,5 mg/mL).

As NbONPs preparadas nesta Tese possuem grande potencial para uso tecnológico, em catálise, e biomédico, como um material de baixa citotoxicidade que pode ser empregado como um material inerte.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, S. et al. On the Structural and Dynamical Properties of DOPC Reverse Micelles. **Langmuir**, v. 32, n. 41, p. 10610–10620, 2016.

AL-HASANI, H.; HINCK, C. S.; CUSHMAN, S. W. C. CELL BIOLOGY AND METABOLISM : Endocytosis of the Glucose Transporter GLUT4 Is Mediated by the GTPase Dynamin Endocytosis of the Glucose Transporter GLUT4 Is Mediated by the GTPase Dynamin *. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 28, p. 17504–17510, 1998.

AL-JAMAL, W. T.; KOSTARELOS, K. Liposome-nanoparticle hybrids for multimodal diagnostic and therapeutic applications. **Nanomedicine**, v. 2, n. 1, p. 85–98, 2007.

ALBANESE, A. et al. Secreted biomolecules alter the biological identity and cellular interactions of nanoparticles. **ACS Nano**, v. 8, n. 6, p. 5515–5526, 2014.

ALI, A. et al. Calcein as a fluorescent iron chemosensor for the determination of low molecular weight iron in biological fluids. **BioMetals**, v. 16, n. 2, p. 285–293, 2003.

ALI, A. et al. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 9, p. 49–67, 2016.

AMSTAD, E. et al. Triggered release from liposomes through magnetic actuation of iron oxide nanoparticle containing membranes. **Nano Letters**, v. 11, n. 4, p. 1664–1670, 2011.

AN, P. et al. Fast synthesis of dopamine-coated Fe 3O 4 nanoparticles through ligand-exchange method. **Chinese Chemical Letters**, v. 23, n. 9, p. 1099–1102, 2012.

AOH, Q. L.; GRAVES, L. M.; DUNCAN, M. C. Glucose regulates clathrin adaptors at the trans-Golgi network and endosomes. **Molecular biology of the cell**, v. 22, n. 19, p. 3671–83, out. 2011.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.

BAGHERPOUR, A. R. et al. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 17, n. 2, p. 1247–1248, out. 2008.

BAGHERPOUR, A. R.; KASHANIAN, F.; EBRAHIMI, S. A. S. L-arginine modi fi ed magnetic nanoparticles : green synthesis and characterization. **Nanotechnology**, p. 0–7, 2018.

BAHADAR, H. et al. Magnetic nanoparticles: A multifunctional vehicle for modern

theranostics. **Pure and Applied Chemistry**, v. 153, n. 6, p. 434–439, 2017.

BEAUNE, G.; ME, C.; CABUIL, V. Location of Magnetic and Fluorescent Nanoparticles Encapsulated inside Giant Liposomes Location of Magnetic and Fluorescent Nanoparticles Encapsulated inside Giant Liposomes. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 25, p. 7424–7429, 2008.

BEZBRADICA, D. et al. Kinetic model of lipase-catalyzed conversion of ascorbic acid and oleic acid to liposoluble vitamin C ester. **Biochemical Engineering Journal**, v. 71, p. 89–96, 2013.

BHATTACHARYYA, A. et al. Polyurethane-incorporated chitosan/alginate core–shell nano-particles for controlled oral insulin delivery. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 26, p. 1–15, 2018.

BONNAUD MONNIER, C. A. et al. Insertion of Nanoparticle Clusters into Vesicle Bilayers. **ACS Nano**, v. 8, n. 4, p. 3451–3460, 2014.

BOTHUN, G. D.; PREISS, M. R. Bilayer heating in magnetite nanoparticle-liposome dispersions via fluorescence anisotropy. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 357, n. 1, p. 70–74, 2011.

BRUST, M. et al. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 7, p. 801–802, 1994.

BRUST, M. et al. Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 16, p. 1655, 1995.

BUHA, J. et al. Solvothermal and surfactant-free synthesis of crystalline Nb(2)O(5), Ta(2)O(5), HfO(2), and Co-doped HfO(2) nanoparticles. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**, v. 12, n. 47, p. 15537–15543, 2010.

CAI, J. et al. Large-Scale, Facile Transfer of Oleic Acid-Stabilized Iron Oxide Nanoparticles to the Aqueous Phase for Biological Applications. **Langmuir**, v. 33, n. 7, p. 1662–1669, 2017.

CAO, X. et al. Synthesis and properties of MPEG-coated superparamagnetic magnetite nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 6 pages, 2012.

CAPEK, I. Preparation of metal nanoparticles in water-in-oil (w/o) microemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 110, n. 1–2, p. 49–74, 2004.

CASILLAS, P. E. G.; GONZALEZ, C. A R.; PÉREZ, C. A M. Infrared Spectroscopy of Functionalized Magnetic Nanoparticles. **Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engrineering and Technology**, p. 405–420, 2009.

CHALKER, S. L. **Magnetic Nanoparticle and Liposome Technologies for Multimodal Imaging by**. [s.l.] University College London, 2014.

CHAN, W. C. W. et al. Luminescent quantum dots for multiplexed biological

detection and imaging. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 40–46, 2002.

CHEN, T. P. et al. Self-polymerization of dopamine in acidic environments without oxygen. **Langmuir**, v. 33, n. 23, p. 5863–5871, 2017.

CHEN, Y.; BOSE, A.; BOTHUN, G. D. Controlled release from bilayer-decorated magnetoliposomes via electromagnetic heating. **ACS Nano**, v. 4, n. 6, p. 3215–3221, 2010.

CHIBOWSKI, E.; SZCZEŚ, A. Zeta potential and surface charge of DPPC and DOPC liposomes in the presence of PLC enzyme. **Adsorption**, v. 22, n. 4–6, p. 755–765, 2016.

CINTRA, E. R. et al. Nanoparticle agglomerates in magnetoliposomes. **Nanotechnology**, v. 20, n. 4, 2009.

CORDEIRO, P. F. DE O. et al. The Catalão I niobium deposit, central Brazil: Resources, geology and pyrochlore chemistry. **Ore Geology Reviews**, v. 41, n. 1, p. 112–121, 2011.

CRIELAARD, B. J.; LAMMERS, T.; RIVELLA, S. Targeting iron metabolism in drug discovery and delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 6, p. 400–423, 2017.

CRIST, B. L. et al. Association of Oxidative Stress, Iron, and Centralized Fat Mass in Healthy Postmenopausal Women. **Journal of Women's Health**, v. 18, n. 6, p. 795–801, 2009.

DAS, J. et al. Cationic lipid-nanoceria hybrids, a novel nonviral vector-mediated gene delivery into mammalian cells: Investigation of the cellular uptake mechanism. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 1–13, 2016.

DE BONIS, A. et al. Iron and iron oxide nanoparticles obtained by ultra-short laser ablation in liquid. **Applied Surface Science**, v. 353, p. 433–438, 2015.

DE CUYPER, M.; JONIAU, M. Magnetoliposomes. Formation and structural characterization. **European biophysics journal : EBJ**, v. 15, n. 5, p. 311–9, 1988.

DO, P. T. M. et al. Bimetallic effects in the hydrodeoxygenation of meta-cresol on γ-Al2O3 supported Pt–Ni and Pt–Co catalysts. **Green Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 1388, 2012.

DO PRADO, N. T. et al. Enhanced catalytic activity for fructose conversion on nanostructured niobium oxide after hydrothermal treatment: Effect of morphology and porous structure. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, p. 1–12, 2016.

ECKERT, J. et al. Niobium and Niobium Compounds. **Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 2005.

ELSAYED, K. A. et al. Synthesis of phase-controlled iron oxide nanoparticles by

pulsed laser ablation in different liquid media. **Optics and Laser Technology**, v. 102, n. 1, p. 012034, 2015.

FATTAHI, H. et al. Magnetoliposomes as multimodal contrast agents for molecular imaging and cancer nanotheragnostics. **Nanomedicine**, v. 6, n. 3, p. 529–544, 2011.

FAZIO, E. et al. Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects Iron oxide nanoparticles prepared by laser ablation : Synthesis , structural properties and antimicrobial activity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 490, p. 98–103, 2016.

FENG, J. et al. Directional liquefaction of biomass for phenolic compounds and in situ hydrodeoxygenation upgrading of phenolics using bifunctional catalysts. **Energy**, v. 135, p. 1–13, 2017.

FENG, Q. et al. Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

FERNÁNDEZ-BERTÓLEZ, N. et al. Toxicological assessment of silica-coated iron oxide nanoparticles in human astrocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, n. April, p. 13–23, 2018.

FEYNMAN, R. P. There's Plenty of Room at the Bottom. **Journal of Microelectromechanical Systems**, v. 1, p. 60–66, 1992.

FILIPPOUSI, M. et al. Surfactant effects on the structural and magnetic properties of iron oxide nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 29, p. 16209–16217, 2014.

FLORIS, A. et al. SPION@liposomes hybrid nanoarchitectures with high density SPION association. **Soft Matter**, p. 6239–6247, 2011.

FLOYD, R. A. et al. Hydroxyl Free Radical Formation from Hydrogen Peroxide by Ferrous Iron-Nucleotide Complexes. **Chemical Reviews**, v. 18, n. 11, p. 795–801, 2009.

FOSTER, A. J.; DO, P. T. M.; LOBO, R. F. The synergy of the support acid function and the metal function in the catalytic hydrodeoxygenation of m-cresol. **Topics in Catalysis**, v. 55, n. 3–4, p. 118–128, 2012.

FRAGNETO, G.; RHEINSTÄDTER, M. Structural and dynamical studies from bio-mimetic systems: an overview. **Comptes Rendus Physique**, v. 8, n. 7–8, p. 865–883, 2007.

GALDINO, N. M. et al. Sputtering deposition of gold nanoparticles onto graphene oxide functionalized with ionic liquids: biosensor materials for cholesterol detection. **Journal of Materials Chemistry B**, 2017.

GANAPATHY, V.; THANGARAJU, M.; PRASAD, P. D. Nutrient transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. **Pharmacology &**

**therapeutics**, v. 121, n. 1, p. 29–40, jan. 2009.

GEVENSLEBEN, H. et al. Comparison of MammaPrint and TargetPrint results with clinical parameters in German patients with early stage breast cancer. **International journal of molecular medicine**, v. 26, p. 837–843, 2010.

GILLILAND, S. E.; CARPENTER, E. E.; SHULTZ, M. D. Modified Seed Growth of Iron Oxide Nanoparticles in Benzyl Alcohol – Optimization for Heating and Broad Stability in Biomedical Applications. **Nanobiomedicine**, p. 1, 2014.

GIUFFRIDA, S.; VENTIMIGLIA, G.; SORTINO, S. Straightforward green synthesis of “naked” aqueous silver nanoparticles. **Chemical Communications**, n. 27, p. 4055–4057, 2009.

GUPTA, C. P. Role of Iron (Fe) in Body. **IOSR Journal of Applied Chemistry**, v. 7, n. 11, p. 38–46, 2014.

HAHN, M. A et al. Nanoparticles as contrast agents for in-vivo bioimaging: current status and future perspectives. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 399, n. 1, p. 3–27, jan. 2011.

HAN, G.; GHOSH, P.; ROTELLO, V. M. Functionalized gold nanoparticles for drug delivery. **Nanomedicine**, v. 2, n. 1, p. 113–123, 2007.

HARRIS, R. A.; SHUMBULA, P. M.; VAN DER WALT, H. Analysis of the interaction of surfactants oleic acid and oleylamine with iron oxide nanoparticles through molecular mechanics modeling. **Langmuir**, v. 31, n. 13, p. 3934–3943, 2015.

HARUSH-FRENKEL, O. et al. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 353, n. 1, p. 26–32, 2 fev. 2007.

HARUSH-FRENKEL, O. et al. Surface charge of nanoparticles determines their endocytic and transcytotic pathway in polarized MDCK cells. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 2, p. 435–43, fev. 2008.

HAUCKE, V. Cell biology: On the endocytosis rollercoaster. **Nature**, v. 517, n. 7535, p. 446–447, 2015.

HEDAYATNASAB, Z.; ABNISA, F.; DAUD, W. M. A. W. Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application. **Materials and Design**, v. 123, p. 174–196, 2017.

HERIZCHI, R. et al. Current methods for synthesis of gold nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 596–602, 2016.

HIMMELREICH, U.; DRESSELAERS, T. Cell labeling and tracking for experimental models using Magnetic Resonance Imaging. **Methods**, v. 48, n. 2, p. 112–124, 2009.

HÖHN, A.; GRUNE, T. Lipofuscin: Formation, effects and role of macroautophagy. **Redox Biology**, v. 1, p. 140–144, 2013.

HRYNIEWICZ, T.; ROKOSZ, K. Corrigendum to “SEM/EDX and XPS studies of niobium after electropolishing” by T. Hryniewicz, K. Rokosz, H.R. Zschommler Sandim [Appl. Surf. Sci., yyy (2012) xxx], http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2012.09.060. **Applied Surface Science**, v. 265, p. 931–934, 2013.

HU, L. et al. Supporting Information The Role of Oleic Acid : From Synthesis to Assembly of Perovskite Nanocuboid Two-dimensional Arrays. **Inorganic Chemistry**, v. 54, p. 740–745, 2015.

HU, X. et al. Mechanical and thermal reinforcement of photocrosslinked salecan composite hydrogel incorporating niobium carbide nanoparticles for cell adhesion. **Polymer Testing**, v. 69, n. May, p. 396–404, 2018.

INDIRA, T. Magnetic Nanoparticles: A Review. **International Journal of Pharmaceutical**, v. 3, n. 3, p. 1035–1042, 2010.

ISMAIL, R. A. et al. Antibacterial activity of magnetic iron oxide nanoparticles synthesized by laser ablation in liquid. **Materials Science and Engineering C**, v. 53, p. 286–297, 2015.

JACINTO, M. J. et al. Recoverable rhodium nanoparticles: Synthesis, characterization and catalytic performance in hydrogenation reactions. **Applied Catalysis A: General**, v. 338, n. 1–2, p. 52–57, 2008.

JAFELICCI JR, M.; VARANDA, L. C. O Mundo dos Colóides. **Química Nova na Escola**, n. 9, p. 9–13, 1999.

JIANG, S. et al. Lipidoid-coated iron oxide nanoparticles for efficient DNA and siRNA delivery. **Nano Letters**, v. 13, n. 3, p. 1059–1064, 2013.

KAKSONEN, M.; ROUX, A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 5, p. 313–326, 2018.

KAMIYA, H. et al. Roles of specialized DNA polymerases in mutagenesis by 8-hydroxyguanine in human cells. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 686, n. 1–2, p. 90–95, 2010.

KETTLER, K. et al. Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 3, p. 481–492, 2014.

KOBAYASHI, Y. et al. Scrolled sheet precursor route to niobium and tantalum oxide nanotubes. **Nano Letters**, v. 7, n. 7, p. 2142–2145, 2007.

KOLOSNJAJ-TABI, J. et al. Biotransformations of magnetic nanoparticles in the body. **Nano Today**, v. 11, n. 3, p. 280–284, 2016.

KORAYEM, A. H. et al. A review of dispersion of nanoparticles in cementitious matrices: Nanoparticle geometry perspective. **Construction and Building Materials**, v. 153, n. 6, p. 346–357, out. 2017.

KREUTER, J. Nanoparticles-a historical perspective. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 331, n. 1, p. 1–10, 2007.

LAKSHMANAN, R. et al. Recoverable rhodium nanoparticles : Synthesis , characterization and catalytic performance in hydrogenation reactions. **Fuel**, v. 210, n. August, p. 52–57, 2008.

LATUNDE-DADA, G. O. Ferroptosis: Role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1861, n. 8, p. 1893–1900, 2017.

LAURENCIN, M. et al. Interactions between giant unilamellar vesicles and charged core-shell magnetic nanoparticles. **Langmuir**, v. 26, n. 20, p. 16025–16030, 2010.

LESNIAK, A. et al. Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticle uptake efficiency. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 4, 2013.

LIAO, Z. et al. Polymeric liposomes-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as contrast agent for targeted magnetic resonance imaging of cancer cells. **Langmuir**, v. 27, n. 6, p. 3100–3105, 2011.

LIU, D. M.; CHEN, J.; SHI, Y. P. Tyrosinase immobilization on aminated magnetic nanoparticles by physical adsorption combined with covalent crosslinking with improved catalytic activity, reusability and storage stability. **Analytica Chimica Acta**, n. 2017, p. 1–9, 2018.

LIU, Y. et al. Niobium-doped titania nanoparticles: Synthesis and assembly into mesoporous films and electrical conductivity. **ACS Nano**, v. 4, n. 9, p. 5373–5381, 2010.

LUISA MARIN, M. et al. Synthesis, acid properties and catalysis by niobium oxide nanostructured materials. **Catalalysis Science Technololy**, v. 4, n. 9, p. 3044–3052, 9 abr. 2014.

LUSKA, K. L. et al. Synergistic Interaction within Bifunctional Ruthenium Nanoparticle/SILP Catalysts for the Selective Hydrodeoxygenation of Phenols. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 54, n. 52, p. 15750–15755, 2015.

MA, Y.; ABBATE, V.; HIDER, R. C. Iron-sensitive fluorescent probes: monitoring intracellular iron pools. **Metallomics**, v. 7, n. 2, p. 212–222, 2015.

MACHLIN, E. S. Magnetic Properties. p. 57–102, 2006.

MALYSHEV, D. et al. Size-controlled photochemical synthesis of niobium nanoparticles. **Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)**, v. 42, n. 39, p. 14049–52, 2013a.

MALYSHEV, D. et al. Size-controlled photochemical synthesis of niobium nanoparticles. **Dalton Trans.**, v. 42, n. 39, p. 14049–14052, 2013b.

MALYSHEV, D. **Photochemical Synthesis of Niobium Nanoparticles**. [s.l.]

University of Ottawa, 2014.

MAMIZUKA, E. M. Cationic Liposomes as Antimicrobial Agents. **Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, n. April, p. 636–647, 2007.

MARIN, M. L. et al. Synthesis, acid properties and catalysis by niobium oxide nanostructured materials. **Catal. Sci. Technol**, v. 4, p. 3044–3052, 2014.

MARQUES, M. T. et al. XRD, XPS and SEM characterisation of Cu-NbC nanocomposite produced by mechanical alloying. **Materials Chemistry and Physics**, v. 109, n. 1, p. 174–180, 2008.

MARTINA, M. S. et al. Generation of superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for in vivo imaging. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 30, p. 10676–10685, 2005.

MARTINS, W. K. et al. Membrane damage by betulinic acid provides insights into cellular aging. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1861, n. 1, p. 3129–3143, 2017.

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

MCMAHON, H. T.; BOUCROT, E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 8, p. 517–33, ago. 2011.

MICHAEL, L. et al. Degradability of superparamagnetic nanoparticles in a model of intracellular environment: follow-up of magnetic, structural and chemical properties. **Nanotechnology**, v. 21, n. 39, p. 395103, 1 out. 2010.

MIRVAKILI, S. M. et al. High-Performance Supercapacitors from Niobium Nanowire Yarns. **ACS applied materials & interfaces**, v. 7, n. 25, p. 13882–8, 2015.

MIYAMOTO, S. et al. Linoleic acid hydroperoxide reacts with hypochlorous acid, generating peroxyl radical intermediates and singlet molecular oxygen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 2, p. 293 LP-298, 10 jan. 2006.

MONNIER, C. A. et al. Magnetoliposomes : opportunities and challenges. **European Journal of Nanomedicine**, v. 6, n. 4, p. 201–215, 2014.

MOORE, T. L. et al. Chem Soc Rev media and impact on cellular interactions †. **Chemical Society Reviews**, v. 44, p. 6287–6305, 2015a.

MOORE, T. L. et al. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. **Chemical Society reviews**, v. 44, 2015b.

MORGA, M.; ADAMCZYK, Z.; OĆWIEJA, M. Hematite nanoparticle monolayers on mica electrokinetic characteristics. **Journal of Colloid and Interface Science**,

v. 386, n. 1, p. 121–128, 2012.

MORTENSEN, P. M. et al. Influence on nickel particle size on the hydrodeoxygenation of phenol over Ni/SiO2. **Catalysis Today**, v. 259, p. 277–284, 2016.

NAGESHA, D. K. et al. Functionalization-induced improvement in magnetic properties of Fe3 O4 nanoparticles for biomedical applications. **Journal of Applied Physics**, v. 105, n. 7, p. 2–4, 2009.

NAPIERSKA, D. et al. The nanosilica hazard: Another variable entity. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 7, n. 1, p. 39, 2010.

NEDELKOSKI, Z. et al. Origin of reduced magnetization and domain formation in small magnetite nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–8, 2017.

NELSON, R. C. et al. Experimental and Theoretical Insights into the Hydrogen-Efficient Direct Hydrodeoxygenation Mechanism of Phenol over Ru/TiO2. **ACS Catalysis**, v. 5, n. 11, p. 6509–6523, 2015.

NICO, C.; MONTEIRO, T.; GRAÇA, M. P. F. Niobium Oxides and Niobates physical properties: review and prospects. **Progress in Materials Science**, v. 80, p. 1–37, 2016.

NIE, L. et al. Selective conversion of m-cresol to toluene over bimetallic Ni-Fe catalysts. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 388–389, p. 47–55, 2014.

NINJBADGAR, T.; BROUGHAM, D. F. Epoxy ring opening phase transfer as a general route to water dispersible superparamagnetic Fe 3O 4 nanoparticles and their application as positive MRI contrast agents. **Advanced Functional Materials**, v. 21, n. 24, p. 4769–4775, 2011.

OH, N.; PARK, J. H. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 51–63, 2014.

PEKKER, M.; SHNEIDER, M. N. The surface charge of a cell lipid membrane. **J Phys Chem Biophys**, v. 5, p. 177, 2015.

PENG, S. et al. Synthesis and stabilization of monodisperse Fe nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, p. 10676–10677, 2006.

PEREIRA, C. et al. Superparamagnetic MFe 2 O 4 ( M = Fe , Co , Mn ) Nanoparticles : Tuning the Particle Size and Magnetic Properties through a Novel One-Step Coprecipitation Route Joa o. v. 4, n. 1, p. 126–132, 2012.

PHILPOTT, C. C. The flux of iron through ferritin in erythrocyte development. **Current Opinion in Hematology**, v. 25, n. 3, p. 183–188, 2018.

PUNTARULO, S. Iron, oxidative stress and human health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 4–5 SPEC. ISS., p. 299–312, 2005.

QIU, D. et al. Microstructure study of liposomes decorated by hydrophobic magnetic nanoparticles. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 165, n. 5, p. 563–570, 2012.

RANI, R. A. et al. Thin films and nanostructures of niobium pentoxide: fundamental properties, synthesis methods and applications. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 2, p. 15683–15703, 2014.

RANOSZEK-SOLIWODA, K. et al. The role of tannic acid and sodium citrate in the synthesis of silver nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 5, n. 9, p. 63–71, 28 nov. 2016.

RAO, Y. et al. Epirubicin-Loaded Superparamagnetic Iron-Oxide Nanoparticles for Transdermal Delivery: Cancer Therapy by Circumventing the Skin Barrier. **Small**, v. 11, n. 2, p. 239–247, jan. 2015.

REDDY, A. S.; WARSHAVIAK, D. T.; CHACHISVILIS, M. Effect of membrane tension on the physical properties of DOPC lipid bilayer membrane. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1818, n. 9, p. 2271–2281, 2012.

RITZ, S. et al. Protein Corona of Nanoparticles: Distinct Proteins Regulate the Cellular Uptake. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 4, 2015.

SAHAY, G.; ALAKHOVA, D. Y.; KABANOV, A. V. Endocytosis of nanomedicines. **Journal of Controlled Release**, v. 145, n. 3, p. 182–95, 3 ago. 2010.

SAKULKHU, U. et al. Protein corona composition of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with various physico-Chemical properties and coatings. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1–9, 2014.

SHAFAGHAT, H.; REZAEI, P. S.; DAUD, W. M. A. W. Catalytic hydrodeoxygenation of simulated phenolic bio-oil to cycloalkanes and aromatic hydrocarbons over bifunctional metal/acid catalysts of Ni/HBeta, Fe/HBeta and NiFe/HBeta. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 35, p. 268–276, 2016.

SHAW, D. J. Colloid and surface chemistry. p. 1–298, 1992.

SINGH, C. et al. Vanadium, niobium and tantalum by XPS. **Journal of the American Chemical Society**, v. 4, n. 45, p. 106–117, 2017.

SINGH, N. et al. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). **Nano Reviews**, v. 1, n. 0, p. 1–15, 2010.

SOENEN, S. J. H.; BAERT, J.; DE CUYPER, M. Optimal conditions for labelling of 3T3 fibroblasts with magnetoliposomes without affecting cellular viability. **ChemBioChem**, v. 8, n. 17, p. 2067–2077, 2007.

SOENEN, S. J.; HODENIUS, M.; DE CUYPER, M. Magnetoliposomes: versatile innovative nanocolloids for use in biotechnology and biomedicine. **Nanomedicine**, v. 4, n. 2, p. 177–191, fev. 2009.

SUN, S.; ZENG, H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 31, p. 8204–8205, 2002.

TADA, D. B.; BAPTISTA, M. S. Photosensitizing nanoparticles and the modulation of ROS generation. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, n. May, p. 1–14, 2015.

TAEGHWAN HYEON, SU SEONG LEE, JONGNAM PARK, Y. C. AND H. B. N. Synthesis of Highly Crystalline and Monodisperse Maghemite Nanoystallites without a Size- Selection Process. **Journal of Ameriacan Chemical Society**, v. 123, n. 8, p. 12789–12801, 2001.

TAMAI, K. et al. Synthesis of niobium oxide nanoparticles with plate morphology utilizing solvothermal reaction and their performances for selective photooxidation. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 182, p. 469–475, 2016.

TERMAN, A.; BRUNK, U. T. Lipofuscin. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 36, p. 1400–1404, 2004.

TONOLLI, P. N. et al. Lipofuscin Generated by UVA Turns Keratinocytes Photosensitive to Visible Light. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, n. 11, p. 2447–2450, 2017.

TORCHILIN, V. Surface-modified liposomes in gamma-and MR-imaging. **Advanced drug delivery reviews**, n. 96, 1997.

TORCHILIN, V. P. PEG-based micelles as carriers of contrast agents for different imaging modalities. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 2, p. 235–252, 2002.

TSANG, E. et al. Nanostructured Nb 2 O 5 catalysts. **Nano Reviews**, v. 3, p. 1–11, 2012.

TSUBONE, T. M. et al. Enhanced efficiency of cell death by lysosome-specific photodamage. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–19, 2017.

TURKEVICH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLER, J. a Study of the Nucleation and Growth Processes I N the Synthesis of Colloidal Gold. **Discussions of the Faraday Society**, v. 11, n. c, p. 55–75, 1951.

UNIOERSITY, M. S. MAGNETOLIPOSOMES : ANOTHER PRINCIPLE OF CELL SORTING Liposomes bearing anti-fibronectin antibodies and associated with ferromagnetic particles bound firmly to the sm ' face of mouse embryo fibroblasts . Upon binding magnetoliposomes , the cells could be s. **Biochimica et biophysica acta**, v. 735, p. 193–195, 1983.

UNNI, M. et al. Thermal Decomposition Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles with Diminished Magnetic Dead Layer by Controlled Addition of Oxygen. **ACS Nano**, v. 11, n. 2, p. 2284–2303, 2017.

VIEIRA, D. B.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Synthetic bilayer fragments for solubilization of amphotericin B. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 244, n. 2, p. 427–431, 2001.

VITORINO, H. A. et al. Evaluation of iron loading in four types of hepatopancreatic cells of the mangrove crab Ucides cordatus using ferrocene derivatives and iron supplements. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 16, p. 15962–15970, 2018.

VONO, L. L. R. et al. Separation technology meets green chemistry: Development of magnetically recoverable catalyst supports containing silica, ceria, and titania. **Pure and Applied Chemistry**, v. 90, n. 1, p. 133–141, 2018.

WALDVOGEL-ABRAMOWSKI, S. et al. Physiology of iron metabolism. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 41, n. 3, p. 213–221, 2014.

WANG, G. et al. Drug-loaded poly (ε-caprolactone)/Fe3O4composite microspheres for magnetic resonance imaging and controlled drug delivery. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 456, p. 316–323, 2018.

WANG, L.; MALMSTADT, N. Interactions between charged nanoparticles and giant vesicles fabricated from inverted-headgroup lipids. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 50, n. 41, 2017.

WERNER, D.; HASHIMOTO, S. Improved working model for interpreting the excitation wavelength- and fluence-dependent response in pulsed laser-induced size reduction of aqueous gold nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 12, p. 5063–5072, 2011.

WINTERBOURN, C. C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. **Toxicology Letters**, v. 82–83, n. C, p. 969–974, 1995.

XU, S. et al. Targeting receptor-mediated endocytotic pathways with nanoparticles: rationale and advances. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 1, p. 121–38, jan. 2013.

YANG, L. et al. Size dependent biodistribution and toxicokinetics of iron oxide magnetic nanoparticles in mice. **Nanoscale**, v. 7, n. 2, p. 625–636, 2015.

YAO, G. et al. Hydrodeoxygenation of lignin-derived phenolic compounds over bi-functional Ru/H-Beta under mild conditions. **Fuel**, v. 150, p. 175–183, 2015.

YEW, Y. P. et al. Green Synthesis of Magnetite ( Fe 3 O 4 ) Nanoparticles Using Seaweed ( Kappaphycus alvarezii ) Extract. **Nanoscale Research Letters**, 2016.

YING, E.; HWANG, H. M. In vitro evaluation of the cytotoxicity of iron oxide nanoparticles with different coatings and different sizes in A3 human T lymphocytes. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 20, p. 4475–4481, 2010.

YU, W. W. et al. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. **Chemical communications (Cambridge, England)**, p. 2306–2307, 2004.

ZHAO, Y. et al. Shape-dependent acidity and photocatalytic activity of Nb 2O 5 nanocrystals with an active TT (001) surface. **Angewandte Chemie -**

**International Edition**, v. 51, n. 16, p. 3846–3849, 2012.

ZHOU, G.; WANG, W. Synthesis of silver nanoparticles and their antiproliferation against human lung cancer cells in vitro. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 651–655, 2012.

ZIELINSKA-JUREK, A. et al. Nanoparticles Preparation Using Microemulsion Systems. **Microemulsions - An Introduction to Properties and Applications**, p. 229–250, 2012.

ZIMMERMANN, R. et al. Charging and structure of zwitterionic supported bilayer lipid membranes studied by streaming current measurements, fluorescence microscopy, and attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. **Biointerphases**, v. 4, n. 1, p. 1–6, 2009.