

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Preparação e caracterização de fluidos
magnéticos de maghemita funcionalizada
com o aminoácido L-Lisina e dextrana para
carreamento de plasmídeos**

Breiner Gabriel Canedo Silva

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Pommé Confessori Sartoratto

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Zulmira Guerrero Marques Lacava

Goiânia - GO

2016

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação

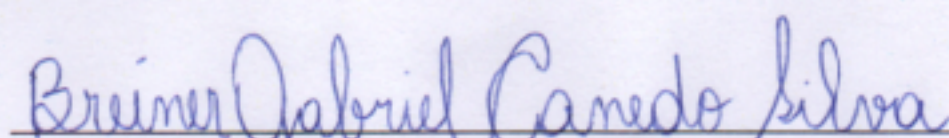
Nome completo do autor: Breiner Gabriel Canedo Silva

Título do trabalho: Preparação e caracterização de fluidos magnéticos de maghemita funcionalizada com o aminoácido L-Lisina e dextrana para carreamento de plasmídeos

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 29 / 07 / 16

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Preparação e caracterização de fluidos
magnéticos de maghemita funcionalizada
com o aminoácido L-Lisina e dextrana para
carreamento de plasmídeos**

Breiner Gabriel Canedo Silva

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade Federal de Goiás como
exigência parcial, para a obtenção do título de
Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Pommé Confessori Sartoratto

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Zulmira Guerrero Marques Lacava

Goiânia - GO

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Canedo Silva, Breiner Gabriel

Preparação e caracterização de fluidos magnéticos de maghemita
funcionalizada com o aminoácido L-Lisina e dextrana para
carreamento de plasmídeos [manuscrito] / Breiner Gabriel Canedo
Silva. - 2016.

vii, 87 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Pommé Confessori Sartoratto; co
orientadora Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava.

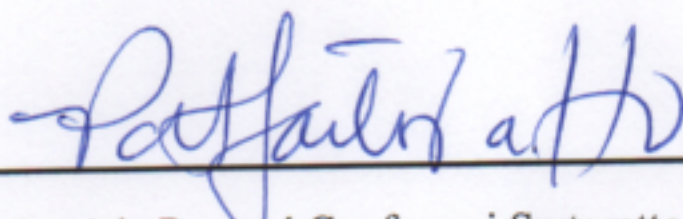
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2016.
Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

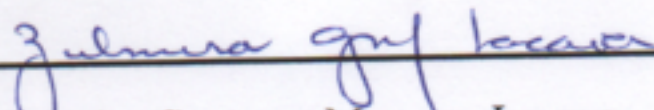
1. nanopartículas magnéticas. 2. maghemita. 3. dextrana. 4.
plasmídeos. I. Pommé Confessori Sartoratto, Patrícia, orient. II. Título.

Folha de Aprovação

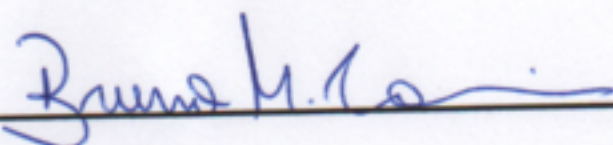
Membros da Comissão Julgadora de Dissertação de Mestrado em Química, apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás pelo discente Breiner Gabriel Canedo Silva, em 01/07/2016:



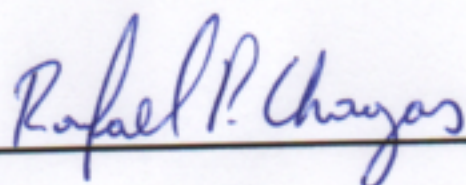
Prof. Dra. Patrícia Pommé Confessori Sartoratto - orientadora (UFG)



Prof. Dra. Zulmira Guerrero Marques Lacava - coorientadora (UnB)



Prof. Dr. Bruno Moreira Carneiro (UFMT)



Prof. Dr. Rafael Pavão das Chagas (UFG)

Aos meus pais e irmão, Edna, Auro e Caio.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por me possibilitar a concluir mais essa etapa na vida.

Agradeço aos meus pais e irmão, Edna Canedo, Auro Pereira e Caio Canedo pelo amor, carinho, motivação, compreensão e apoio em todas as etapas da vida.

À minha família, sobretudo meus tios e primos Hélio, Iraídes, Marta, Adriano, Hellen, Rhandy e Priscila.

À minha orientadora Prof^a. Patrícia Pommé Confessori Sartoratto, pelo apoio, dedicação, confiança e amizade durante esses anos trabalhando com ela.

Agradeço à minha co-orientadora Prof^a. Zulmira Guerrero Marques Lacava pela confiança e dedicação.

A todos os professores do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás – UFG, pelos ensinamentos e colaborações.

À Universidade Federal de Goiás pela formação, desde o ensino fundamental no Centro de Ensino e Pesquisa Aplicada à Educação (CEPAE) até a graduação e mestrado.

Aos colegas de laboratório, Sara, Eli, Karolina, Anna, Paulo Ricardo, Caroline, Chelry, Kely, Gustavo, Matheus, Mara, Ionara e Luiz pelo companheirismo e conhecimento compartilhado.

Ao INCT Nanobiotecnologia, pela parceria.

À Prof^a. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte e ao seu aluno Thiago Gimenez por auxiliarem no uso do equipamento Nanodrop.

Aos professores Rafael Pavão das Chagas e Gabriela Rodrigues Mendes Duarte pelas contribuições na banca de qualificação.

À Prof^a. Dr^a. Paula Rahal e ao pós-doutorando Bruno Moreira Carneiro, por terem me recebido tão bem no Laboratório de Estudos Genômicos da UNESP em São José do Rio Preto – SP e me auxiliado na preparação das amostras de plasmídeo codificadores de shRNA e de GFP.

Ao professor Márcio Poças da Universidade de Brasília, por ter cedido a amostra de DNA.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic) pelas análises de microscopia eletrônica.

Sumário

Lista de Figuras	i
Lista de Tabelas	iii
Lista de Abreviaturas e Siglas	iv
Lista de Símbolos	v
Resumo	vi
Abstract	vii
Capítulo 1 – INTRODUÇÃO	1
Capítulo 2 – OBJETIVOS	4
Capítulo 3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Nanopartículas magnéticas: estrutura da magnetita e maghemita.....	5
3.2. Propriedades Magnéticas da Magnetita e da Maghemita	7
3.3. Síntese de nanopartículas de magnetita e maghemita pelo método de coprecipitação.....	11
3.4. Funcionalização da superfície das nanopartículas.....	16
3.5. Estabilização de suspensões coloidais.....	17
3.6. Plasmídeos.....	21
3.7. RNA de interferência.....	22
3.8. Proteína Verde Fluorescente	24
Capítulo 4 – METODOLOGIA	26
4.1. Obtenção dos fluidos maghemita/L-Lisina e maghemita/DL-Histidina por coprecipitação de sais de ferro em hidróxido de amônio na presença do respectivo aminoácido	26
4.2. Obtenção do fluido maghemita/L-Lisina por posterior funcionalização das nanopartículas com o aminoácido (método B)	27
4.3. Obtenção do fluido maghemita/L-Lisina por sucessiva funcionalização da nanopartícula com o aminoácido (método C)	27
4.4. Obtenção do fluido maghemita/L-Lisina por coprecipitação de sais de ferro em hidróxido de sódio na presença do aminoácido (método D)	28
4.5. Experimentos preliminares de adsorção de DNA de <i>Humícola grísea</i> no fluido NPLis1A	29

4.5.1. Quantificação da adsorção de DNA de <i>Humícola grísea</i> no fluido NPLis1A	29
4.5.2. Medida de raio hidrodinâmico em função das adições da amostra de DNA.....	30
4.5.3. Recobrimento das nanopartículas maghemita/L-Lisina/DNA com dextrana	30
4.6. Experimentos de adsorção de plasmídeo/shRNA e plasmídeo/GFP no fluido NPLis1A	31
4.6.1. Medida de raio hidrodinâmico em função das adições de plasmídeo/shRNA e plasmídeo/GFP	32
4.6.2. Recobrimento das nanopartículas maghemita/L-Lisina/plasmídeo com dextrana.....	33
4.7. Caracterizações.....	33
4.7.1. Difração de raios X (DRX).....	33
4.7.2. Espectroscopia na região do infravermelho	34
4.7.3. Teor de ferro	34
4.7.4. Medidas de raio hidrodinâmico e potencial Zeta.....	35
4.7.5. Análise Termogravimétrica (TG)	35
4.7.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)	36
Capítulo 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. Caracterização das nanopartículas maghemita/aminoácido quanto à cristalinidade e composição	37
5.2. Caracterização morfológica das nanopartículas maghemita/aminoácido.....	45
5.3. Análise termogravimétrica das nanopartículas maghemita/aminoácido.....	50
5.4. Raio hidrodinâmico e potencial zeta dos fluidos magnéticos maghemita/aminoácido	53
5.5. Experimentos preliminares de adsorção de DNA de <i>Humícola grísea</i> no fluido NPLis1A	58
5.6. Experimentos preliminares de medida de raio hidrodinâmico em função das adições da amostra de DNA.....	60

5.7. Experimentos preliminares de recobrimento das nanopartículas maghemita/L-Lisina/DNA com dextrana.....	61
5.8. Experimento de adsorção de plasmídeo/shRNA e plasmídeo/GFP no fluido NPLis1A	64
5.9. Experimento de recobrimento das nanopartículas maghemita/L-Lisina/pshRNA e maghemita/L-Lisina/pGFP com dextrana	68
Capítulo 6 – CONCLUSÃO	71
Capítulo 7 - PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	72
Capítulo 8 - TRABALHOS APRESENTADOS E PUBLICADOS E PARTICIPAÇÃO EM PROJETOS DE PESQUISA.....	73
Capítulo 9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

Lista de Figuras

Figura 1.1	Moléculas de a) L-Lisina e b) DL-Histidina.	2
Figura 3.1	Coordenação octaédrica e tetraédrica dos íons Fe (II) e Fe (III) na estrutura de espinélio inverso da magnetita	5
Figura 3.2	Célula unitária da maghemita: estrutura cúbica do tipo espinélio inverso representada por poliedros	6
Figura 3.3	Arranjos dos momentos magnéticos da magnetita a) em uma célula unitária; b) em alinhamento antiparalelo dos sítios octaédricos e tetraédricos e de diferentes módulos do Fe^{2+} e Fe^{3+}	8
Figura 3.4	Curva de saturação e histerese para materiais ferrimagnéticos ..	9
Figura 3.5	Representação dos domínios magnéticos das nanopartículas em a) dimensões maiores que o diâmetro crítico D_c e; b) com dimensões inferiores ao diâmetro crítico D_c	10
Figura 3.6	Curva de magnetização (M) em função de um campo magnético externo aplicado (H), para materiais paramagnéticos e superparamagnético	11
Figura 3.7	Representação das reações de condensação entre: a) aquohidroxocomplexos $[(\text{M}(\text{OH})_x(\text{H}_2\text{O})_{y-x})^{n-x}]$ e b) oxohidroxocomplexos $[(\text{MOH})_x(\text{O})_y]^{n-x-2y}$	13
Figura 3.8	Estrutura core-shell	16
Figura 3.9	Aumento do potencial elétrico ao aproximar duas nanopartículas carregadas (de mesmo sinal) devido à repulsão eletrostática entre elas (adaptada de MYERS, 1999)	19
Figura 3.10	Mecanismo de estabilização estérica: a) efeito osmótico, responsável pelo deslocamento de moléculas do solvente para a região entre as superfícies, separando-as, b) efeito entrópico ou de restrição de volume, devido à perda de graus de liberdade das moléculas na superfície	20
Figura 3.11	Obtenção do DNA recombinante a partir de plasmídeo e fragmento de DNA e clonagem através da divisão celular	22
Figura 3.12	Mecanismo proposto para a formação do cromóforo p-hidroxibenzilideno imidazolinona da GFP, envolvendo uma etapa de ciclização autocatalítica e oxidação	25
Figura 5.1	Difratogramas de raios X dos sólidos NPLis1A, NPLis1B, NPLis1C, NPLis1D, NPLis2A e NPHis1A	37
Figura 5.2	Espectros de infravermelho do monoclórato de L-Lisina, DL-Histidina e nanopartículas de maghemita (NPM)	40
Figura 5.3	Espectros de infravermelho (FTIR) dos sólidos NPLis1A, NPLis1B, NPLis1C, NPLis1D, NPLis2A e NPHis1A	42
Figura 5.4	Tipos de interação entre a Lisina e nanopartículas de óxido de ferro: a) bidentada; b) bidentada em ponte; c) monodentada ...	43
Figura 5.5	Micrografias das amostras: a) NPLis1A; b) NPLis1B; c)	

	NPHis1A e d) NPLis1D	46
Figura 5.6	Histograma de tamanho das nanopartículas das amostras: a) NPLis1A; b) NPLis1B; c) NPHis1A e d) NPLis1D	48
Figura 5.7	Espectro de energia dispersiva de raios X de uma região em bastão da amostra NPHis1A	50
Figura 5.8	Curvas termogravimétricas a) Aminoácidos DL-Histidina e monoclórato de L-Lisina b) Sólidos NPLis1A, NPLis2A, NPLis1B, NPLis1C, NPLis1D e NPHis1A	51
Figura 5.9	Distribuição de raio hidrodinâmico dos agregados de nanopartículas suspensas.....	55
Figura 5.10	Curva de Potencial Zeta em função de pH dos fluidos NPLis1A, NPLis2A, NPLis1B, NPLis1D e NPHis1A	56
Figura 5.11	Espectros de infravermelho das amostras NPLis1A e NPLis1ADNA	59
Figura 5.12	Gráfico do raio hidrodinâmico médio para o fluido NPLis1A em função das adições sucessivas de DNA ($171 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$).....	60
Figura 5.13	Espectros de infravermelho das amostras dextrana T10 (DEX T10), NPDNA, NPDNA _{dex01a} , NPDNA _{dex02a} , NPDNA _{dex01b} , NPDNA _{dex02b}	63
Figura 5.14	Gráfico do raio hidrodinâmico médio para o fluido NPLis1A em função das adições sucessivas das soluções de plasmídeo (pshRNA e pGFP)	65
Figura 5.15	Distribuição de raio hidrodinâmico médio dos agregados de nanopartículas suspensas em função das adições de (a) pshRNA e (b) pGFP	67
Figura 5.16	Espectros de infravermelho das amostras NPpshRNA e NPpGFP	68
Figura 5.17	Espectros de infravermelho das amostras NPLis1ApGFP _{dex} e NPLis1ApshRNA _{dex}	69

Lista de Tabelas

Tabela 4.1	Quantidades e proporções de sais de ferro (II) e (III) e aminoácido utilizado nas sínteses, base utilizada e métodos de obtenção dos fluidos magnéticos	29
Tabela 4.2	Massa de NPLis1A, DNA e dextrana T10 e proporção maghemita/dextrana (m/m) utilizada para a preparação dos fluidos magnéticos NPDNAdex01 e NPDNAdex02.. . . .	31
Tabela 5.1	Parâmetro de rede e diâmetro médio dos cristalitos dos sólidos obtidos	38
Tabela 5.2	Teor de ferro total (g.L^{-1}) dos fluidos magnéticos	44
Tabela 5.3	Diâmetro médio das nanopartículas e índice de polidispersão	49
Tabela 5.4	Coeficiente de recobrimento dos sólidos de maghemita/aminoácido	53
Tabela 5.5	Raio hidrodinâmico (nm) e Índice de Polidispersão (PDI) dos sólidos de maghemita/aminoácido em suspensão	54
Tabela 5.6	Ponto Isoelétrico e Potencial Zeta em pH fisiológico das nanopartículas em suspensão	57
Tabela 5.7	Concentração de DNA e Razão 260nm/280nm na solução DNAD1 e no sobrenadante (DNAD1NP) após adsorção em NPLis1A	59
Tabela 5.8	Raio hidrodinâmico médio e Índice de Polidispersão das nanopartículas maghemita/L-Lisina/DNA após recobrimento com dextrana T10	61
Tabela 5.9	Raio hidrodinâmico médio e Índice de Polidispersão das nanopartículas em função das adições sucessivas das soluções de plasmídeo (pshRNA e pGFP).	66
Tabela 5.10	Raio hidrodinâmico médio e Índice de Polidispersão das nanopartículas maghemita/L-Lisina/plasmídeo após recobrimento com dextrana T10	69

Lista de Abreviaturas e Siglas

DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DRX	Difração de Raios X
DsiRNA	Dicer substrate siRNA
FWHM	Largura do pico a meia altura
FTIR	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier
GFP	Green Fluorescent Protein
ELS	Espalhamento Eletroforético de Luz
JCPDS	Joint Committee on Powder Diffraction Standards
NPM	Nanopartículas de maghemita
PDI	Índice de Polidispersão
PEI	Polietilenoimina
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RISC	RNA-induced silencing complex
shRNA	short hairpin RNA
TG	Análise Termogravimétrica

Lista de Símbolos

C	Concentração do soluto
C_o	Concentração de equilíbrio
D	Coeficiente de Difusão
H	Campo magnético
H_c	Campo Coercivo
k	Constante de Boltzmann
μ_B	magneton de Bohr
θ	Ângulo de Bragg
T_B	Temperatura de Bloqueio
D_C	Diâmetro Crítico
D_{SP}	Diâmetro superparamagnético
M	Magnetização
M_s	Magnetização de saturação
M_r	Magnetização remanescente
γ	Energia de Superfície
χ	Coercividade
λ	Comprimento de onda
t	Diâmetro médio dos cristalitos
Δμ	Potencial Químico
ξ	Coeficiente de recobrimento

Resumo

Neste trabalho, foram sintetizadas nanopartículas magnéticas constituídas de maghemita funcionalizada com L-Lisina ou DL-Histidina (cristalitos com diâmetro médio de 4,5 a 8,1 nm), pelo método da coprecipitação dos íons Fe (II) e (III). Os sólidos obtidos foram dispersos em água para obtenção de suspensões aquosas denominadas fluidos magnéticos. As amostras obtidas foram caracterizadas pelas técnicas de difração de raios X, espectroscopia de infravermelho, termogravimetria, espectrofotometria UV-Vis, microscopia eletrônica de transmissão e espalhamento de luz dinâmico e eletroforético. As nanopartículas em suspensão apresentaram potencial zeta positivo em pH fisiológico, possibilitando assim adsorção de moléculas de DNA (cromossômico e plasmidial) negativamente carregadas, além de um raio hidrodinâmico inferior ao relatado na literatura (100 nm) para que ocorra a fagocitose das nanoestruturas. Uma amostra maghemita/L-Lisina foi selecionada para adsorção de DNA (cromossômico de fungo *Humicola grisea* e de plasmídeos codificadores de shRNA e GFP) e posterior recobrimento com dextrana, para proteção de sua informação genética. A adsorção dos plasmídeos e da dextrana foi evidenciada pelo aumento do raio hidrodinâmico das amostras e pela presença das bandas relativas à dextrana e ao DNA nos espectros de infravermelho.

Abstract

In this work magnetic nanoparticles composed of maghemite coated with L-lysine or DL-Histidine (crystallite average diameter between 4.5 to 8.1 nm.) were synthesized via the Fe (II) and Fe (III) coprecipitation method. The synthesized solids were dispersed in water to obtain aqueous suspensions called magnetic fluids. The samples were characterized by X-ray diffraction, infrared spectroscopy, thermogravimetry, UV-Vis spectrophotometry, transmission electron microscopy, electrophoretic and dynamic light scattering. The suspended colloidal nanoparticles showed positive zeta potential at physiological pH, which enables the adsorption of negatively charged molecules of chromosomal and plasmid DNA on their surfaces. Their hydrodynamic radius were smaller than those reported in the literature (100nm) allowing phagocytosis of the nanostructure. A maghemite/L-Lysine sample was selected for DNA adsorption (chromosomal DNA of *Humicola grisea* fungus and shRNA and GFP encoding plasmids) and subsequent coating with dextran, for protection of its genetic information. Plasmids and dextran adsorption was evidenced by the increasing of the hydrodynamic radius of the samples, and the presence of DNA and dextran related bands in the infrared.

1. INTRODUÇÃO

As nanopartículas (partículas com dimensões de 1 a 100 nm) se tornaram uma ferramenta bastante estudada na área de saúde para o carreamento de drogas e obtenção de imagens, além de ter introduzido oportunidades no tratamento de doenças e aperfeiçoamento de diagnose. Nos últimos anos, a aplicação da nanociência na medicina (também chamada de nanomedicina) tem apresentado grande potencial para mudar o panorama das indústrias farmacêuticas e biotecnológicas (PERALTA-VIDEA et al., 2011; SHI et al., 2010; SHI et al., 2011).

Nanopartículas magnéticas constituídas de óxido de ferro são amplamente estudadas na veiculação de drogas devido à possibilidade de funcionalizar/recobrir sua superfície com moléculas específicas de forma a estabelecer interações entre a superfície e a droga a ser carregada (MAHDAVI et al., 2013). É necessário que a cobertura seja biocompatível, não-tóxica e que a veiculação permita entrega a um alvo específico. Diversos tipos de substâncias orgânicas e inorgânicas podem ser utilizados para a funcionalização das nanopartículas: sílica (SARTORATTO et al., 2007), surfactantes (DE CUYPER; JONIAU, 1991), polissacarídeos (GRACZYKOWSKI et al., 2011; GAO et al., 2010), polímeros (CHEN et al., 2013; BABIC et al., 2008), etc.

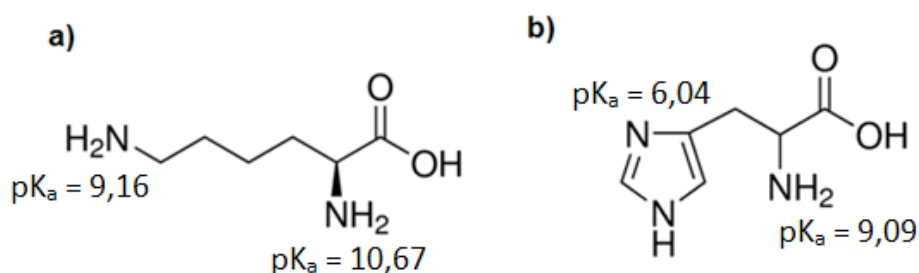
A funcionalização das nanopartículas com moléculas catiônicas tem sido empregada em aplicações biológicas, inclusive na terapia gênica devido à capacidade dessas moléculas de interagir eletrostaticamente com diversas biomoléculas que possuem grupos funcionais aniônicos, como DNA, RNA, proteínas, etc. (BABIC et al., 2008; CHEN et al., 2013; RAMOS et al., 2014).

Vários trabalhos na literatura utilizam nanopartículas recobertas com moléculas que contém grupos amina protonáveis - característica denominada “esponja de prótons”, capazes de interagir tanto com DNA quanto com RNA através de seus grupos fosfato (CHEN et al., 2013; THOMAS et al., 2013). Entre essas moléculas, podemos citar polímeros como polietilenoinima – PEI (MCBAIN et al., 2007; KIEVIT et al., 2009; ZHOU et al., 2009), poli(L-lisina) (BABIC et al., 2008; LI et al., 2013, WANG et al., 2012), espermina (COHEN et al., 2011), aminoácidos como a histidina e lisina (DURMUS et al., 2009; ÜNAL et al., 2010), aminopropiltriethoxysilano – APTS (KNEUER et al., 2000), etc.

A poli(L-lisina) é um agente de transfecção de DNA largamente utilizado devido à sua capacidade de estabelecer interação eletrostática com o DNA (LIU et al., 2001; MANN et al., 2008). Nanopartículas constituídas de óxido de ferro (entre eles, magnetita e maghemita) funcionalizadas com poli(L-lisina) têm sido estudadas por apresentarem Potencial Zeta (ζ) positivo em pH neutro e serem capazes de adsorver DNA na superfície das nanopartículas, introduzir o DNA no interior de células através da endocitose e apresentarem alta expressão gênica tanto *in vitro* como *in vivo* (BABIC et al., 2008; LI et al., 2013, WANG et al., 2012). Comparado ao carregamento de DNA pela poli(L-lisina), sistemas constituídos de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com poli(L-lisina) apresentam eficiência de transfecção ainda maior devido à sua grande área superficial em relação ao volume e maior especificidade a células tumorais (LI et al., 2013).

Neste trabalho, nanopartículas magnéticas constituídas de maghemita foram funcionalizadas com os aminoácidos L-lisina e DL-Histidina, os quais possuem menor custo que seus polímeros correspondentes e são capazes de conferir carga superficial positiva às nanopartículas devido aos valores de pK_a dos grupos amina protonáveis de sua estrutura, conforme Figura 1.1 (DURMUS et al., 2009; ÜNAL et al., 2010).

Figura 1.1 – Moléculas de a) L-Lisina e b) DL-Histidina.



As nanopartículas maghemita/aminoácido foram utilizadas para carregamento de moléculas de plasmídeo codificadores de GFP (proteína fluorescente largamente utilizada como marcador biológico) e plasmídeos codificadores de *short hairpin* RNA (shRNA), que são moléculas sintéticas capazes de inibir a expressão de RNA mensageiros (RNAm) específicos através de um mecanismo de silenciamento gênico conhecido como RNAi de interferência (ROZEMA et al., 2007).

Ensaio com RNAi *in vitro* têm apresentado grande potencial no tratamento e diagnóstico de diversas doenças humanas devido a sua defesa contra genes parasíticos (GITLIN et al., 2005; ROZEMA et al., 2007). Porém, moléculas de ácidos nucleicos, como as moléculas de plasmídeos codificadores de shRNA e GFP, quando administradas *in vivo*, são suscetíveis às nucleases presentes no soro humano e animal (CUI et al., 2012).

Uma das alternativas para proteger a informação genética do plasmídeo (ou de qualquer outra molécula de ácido nucleico) até o sítio alvo é recobrir a nanoestrutura maghemita/plasmídeo com dextrana, um polissacarídeo biocompatível, atóxico e solúvel em água, muito utilizado na veiculação de drogas (DIAS et al., 2011).

Este trabalho surgiu através da proposta de parceria de trabalho entre a Prof^a. Dr^a. Zulmira Guerrero Marques Lacava, Prof^a. Dr^a. Patrícia Pommé Confessori Sartoratto e Prof^a. Dr^a. Paula Rahal, para que fossem desenvolvidos fluidos magnéticos constituídos de maghemita e dextrana para carreamento de moléculas de plasmídeos codificadores de shRNA, capazes de silenciar o vírus da hepatite C. Os plasmídeos obtidos na IBILCE-UNESP foram previamente testados em aplicações *in vitro* durante o trabalho de Doutorado em Genética do aluno Bruno Moreira Carneiro, orientado pela Prof^a. Dr^a. Paula Rahal, apresentando resultados satisfatórios quanto ao silenciamento do vírus.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho de mestrado é preparar e caracterizar fluídos magnéticos biocompatíveis baseados em nanopartículas de maghemita funcionalizada com aminoácido e recoberta com dextrana para carregamento de plasmídeos codificadores de shRNA e plasmídeos codificadores GFP.

Os objetivos específicos do trabalho são: i) sintetizar nanopartículas de maghemita funcionalizada com aminoácidos (L-Lisina e DL-Histidina); ii) obter fluidos magnéticos constituídos de maghemita/aminoácido; iii) caracterizar os materiais obtidos quanto à composição, cristalinidade, estabilidade térmica e morfologia; iv) estudar a interação dos fluidos magnéticos com amostra de DNA (cromossômico e plasmidial); v) recobrir as nanopartículas constituídas de maghemita/aminoácido/plasmídeo com dextrana e vi) obter fluido magnético carreador de plasmídeo codificador de shRNA e GFP.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

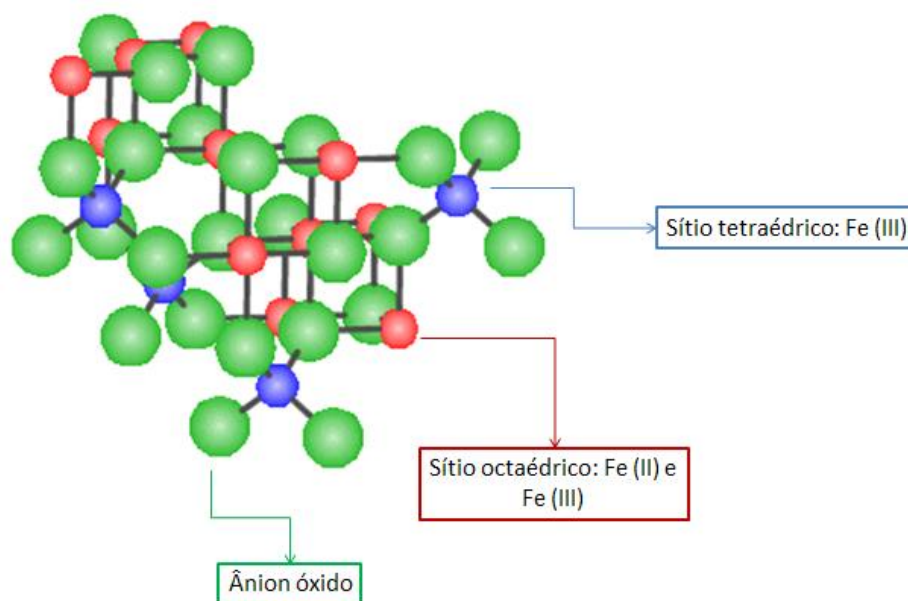
3.1. Nanopartículas magnéticas: estrutura da magnetita e maghemita

Nanopartículas magnéticas são estruturas da ordem de 1 a 100 nm que podem apresentar propriedades físicas e químicas diferentes daquelas observadas no material em volume (*bulk*) correspondente, devido à sua grande área superficial e por se comportarem como monodomínios magnéticos (GUBIN, 2009).

Nanopartículas magnéticas constituídas de óxido de ferro (como as de magnetita e maghemita) são as nanoestruturas mais empregadas em aplicações biomédicas (AKBARZADEH et al., 2012).

A magnetita é um óxido de ferro misto (óxido de ferro II e ferro III) do tipo ferrita, representada pela fórmula química Fe_3O_4 . É um sólido que apresenta estrutura cúbica compacta do tipo espinélio inverso, na qual os ânions O^{2-} estão arranjados em um empacotamento denso (em camadas do tipo abcabc...) e os íons ferro distribuídos entre os sítios tetraédricos e octaédricos: todos íons Fe^{2+} ocupando sítios octaédricos e metade dos íons Fe^{3+} ocupando sítios octaédricos e a outra metade ocupando sítios tetraédricos, $[\text{Fe}^{3+}]^{\text{tet}}[\text{Fe}^{2+}, \text{Fe}^{3+}]^{\text{oct}}\text{O}_4$ (WEST, 2014).

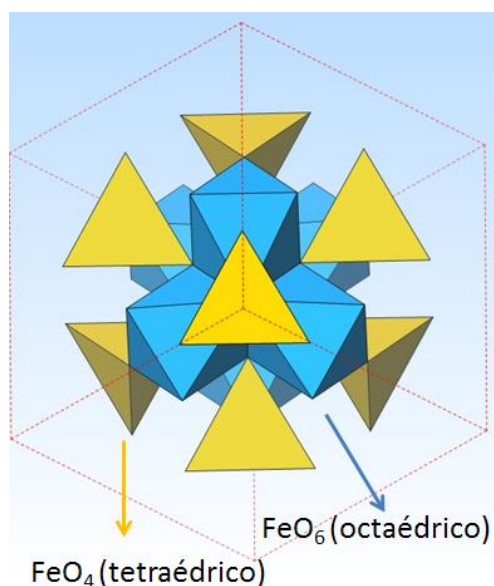
Figura 3.1 – Coordenação octaédrica e tetraédrica dos íons Fe (II) e Fe (III) na estrutura de espinélio inverso da magnetita.



Fonte – adaptada de <<http://www.chemexplore.net/mixed-valent.htm>>, com permissão de Robert Steele.

Sua célula unitária é constituída de 32 íons O^{2-} , 8 íons Fe^{2+} (sítios octaédricos) e 16 íons Fe^{3+} (sítios octaédricos e tetraédricos), distribuídos de modo que os sítios octaédricos compartilham arestas entre si e compartilham vértices com os sítios tetraédricos, que estão equidistantes dos sítios octaédricos e dos íons O^{2-} (WEST, 2014).

Figura 3.2 – Célula unitária da magnetita: estrutura cúbica do tipo espinélio inverso representada por poliedros.



Fonte – Imagem adaptada do CrystalMaker®. CrystalMaker Software Ltd, Oxford, Inglaterra (www.crystallmaker.com).

A maghemita é um óxido de ferro III, representado pela fórmula química $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, que, apesar de apresentar uma célula unitária semelhante à da magnetita, apresenta vacâncias em sua rede já que não há íons Fe^{3+} suficientes para o preenchimento de todos os sítios octaédricos, estando esses íons distribuídos desigualmente em sítios tetraédricos e octaédricos. A maghemita pode ser representada pela fórmula $[\text{Fe}^{3+}_{21,33}\square_{2,67}\text{O}_{32}]$, em que $\square_{2,67}$ representa as vacâncias catiônicas nos sítios octaédricos (FERGUSON; HASS, 1958; LAURENT et al., 2008).

3.2. Propriedades Magnéticas da Magnetita e Maghemita.

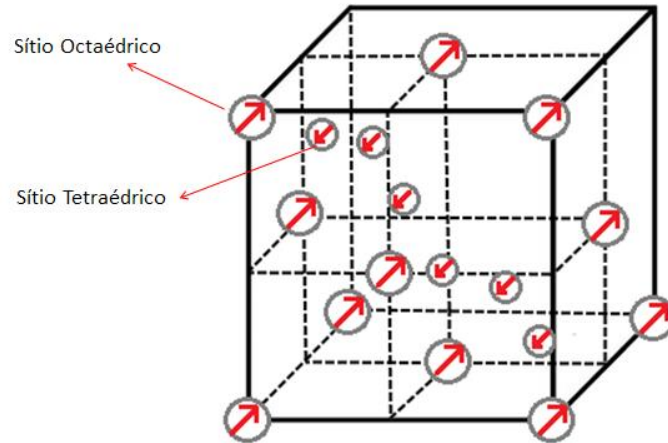
A magnetita e a maghemita, em volume, são materiais que apresentam comportamento ferrimagnético. Materiais ferrimagnéticos possuem elétrons desemparelhados, cujos momentos magnéticos estão acoplados antiparalelamente de forma a apresentar um momento magnético total diferente de zero, ou seja, apresentam magnetização espontânea à temperatura ambiente (CULLITY, 1972).

O comportamento ferrimagnético das ferritas é devido aos momentos magnéticos dos íons metálicos individuais que estas contêm. O momento magnético dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} da magnetita é igual à soma dos momentos magnéticos dos spins dos elétrons desemparelhados dos orbitais 3d, já que a contribuição do momento magnético orbital é desprezível para as ferritas. Cada elétron desemparelhado apresenta um momento magnético representado por 1 magneton de Bohr (μ_B), de forma que os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} apresentam momento magnético de $4 \mu_B$ e $5 \mu_B$, respectivamente (COEY, 2009).

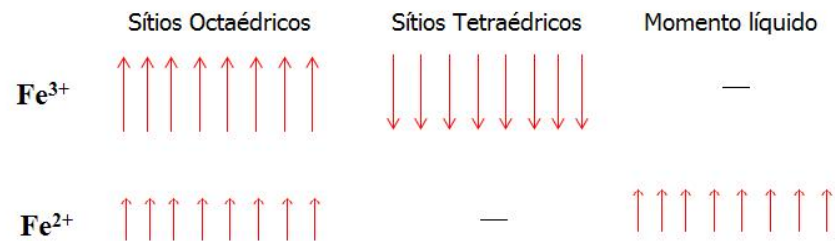
Na estrutura de espinélio inverso, os momentos magnéticos dos íons nos sítios tetraédricos e octaédricos apresentam magnitudes diferentes e ocorrem de forma antiparalela (Figura 3.3a). Na célula unitária da magnetita, como metade dos íons Fe^{3+} ocupa os sítios tetraédricos e a outra metade ocupa os octaédricos, as contribuições dos momentos dos íons Fe^{3+} se anulam, de forma que o momento resultante deve-se aos íons Fe^{2+} nos sítios octaédricos (Figura 3.3b).

Figura 3.3 – Arranjos dos momentos magnéticos da magnetita **a)** em uma célula unitária; **b)** em alinhamento antiparalelo dos sítios octaédricos e tetraédricos e de diferentes módulos do Fe^{2+} e Fe^{3+} .

a)



b)



Fonte – Produção do próprio autor.

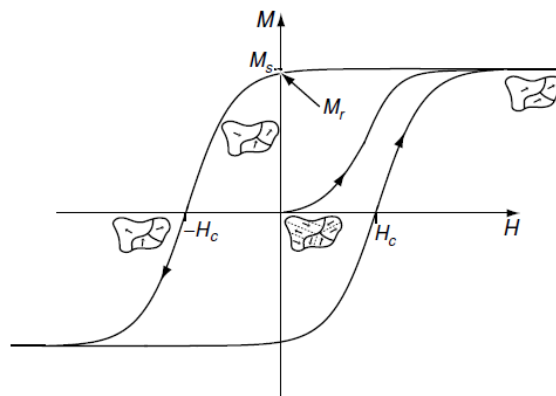
No caso da célula da maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), na qual todos os íons Fe são trivalentes, o comportamento ferrimagnético é devido à distribuição desigual desses íons nos sítios tetraédricos e octaédricos (CULLITY, 1972).

Materiais ferrimagnéticos apresentam os fenômenos de saturação magnética e histerese (CULLITY, 1972; COEY, 2009). Apesar desses materiais apresentarem magnetização espontânea devido ao acoplamento de spins antiparalelos de magnitudes diferentes, esse acoplamento ocorre em regiões microscópicas denominadas domínios magnéticos, porém, em materiais em volume (ou *bulk*), há a formação de multidomínios orientados aleatoriamente de maneira a minimizar a energia magnetostática. Na presença de um campo magnético, esses multidomínios tendem a crescer devido ao movimento das paredes/fronteiras dos domínios e então

rotacionarem para se alinhar ao campo. O aumento do campo magnético gera o aumento da magnetização do material até uma magnetização constante, chamada magnetização de saturação (M_s) (Figura 3.4).

Ao retirar-se o campo magnético externo ($H = 0$), a magnetização (M) do material diminui a um valor menor que a M_s (porém diferente de zero) devido a alguns domínios voltarem a se desorientar, apresentando assim uma curva de histerese (Figura 3.4). Nesse caso, o material ainda apresenta magnetização, denominada magnetização remanescente (M_r). Para que o material volte a apresentar magnetização nula, é necessário que seja aplicado um campo magnético de sinal inverso, denominado campo coercivo (H_c). Essa propriedade, na qual a magnetização do material é zero e o campo aplicado é diferente de zero é denominada coercividade do material - χ (COEY, 2009).

Figura 3.4 – Curva de saturação e histerese para materiais ferrimagnéticos.

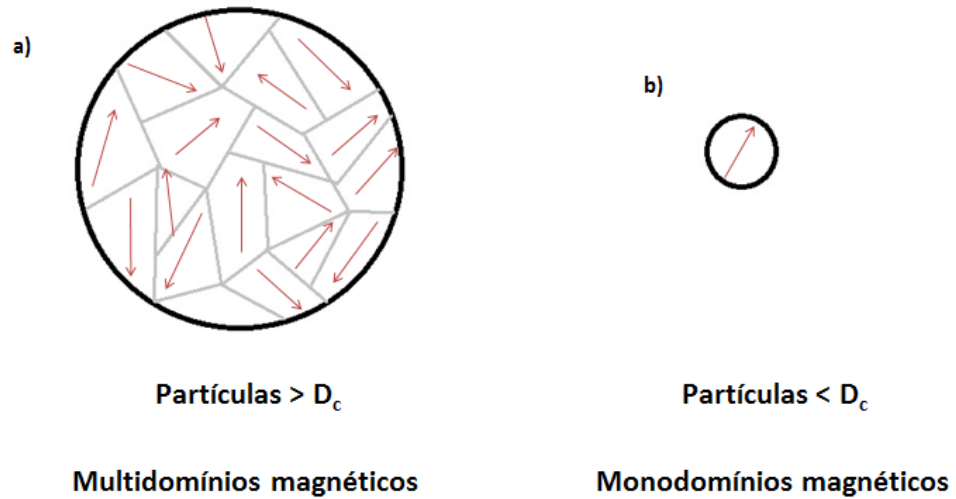


Fonte – adaptada de COEY (2009), com autorização de Cambridge University Press.

Quando em escala nanométrica, a magnetita e a maghemita apresentam comportamento magnético diferente daquele observado para esses materiais em volume (*bulk*). Nanopartículas magnéticas com dimensões muito pequenas (inferiores a um diâmetro crítico - D_c) se comportam como monodomínios magnéticos (Figura 3.5), de forma que cada nanopartícula apresenta um momento magnético resultante não-nulo oriundo do acoplamento dos momentos atômicos individuais (COEY, 2009). Para as nanopartículas de óxido de ferro, é descrito na

literatura que o diâmetro crítico é inferior a 50 nm, dependendo da constante de anisotropia (PETRACIC, 2010).

Figura 3.5 – Representação dos domínios magnéticos das nanopartículas em a) dimensões maiores que o diâmetro crítico D_c e; b) com dimensões inferiores ao diâmetro crítico D_c .

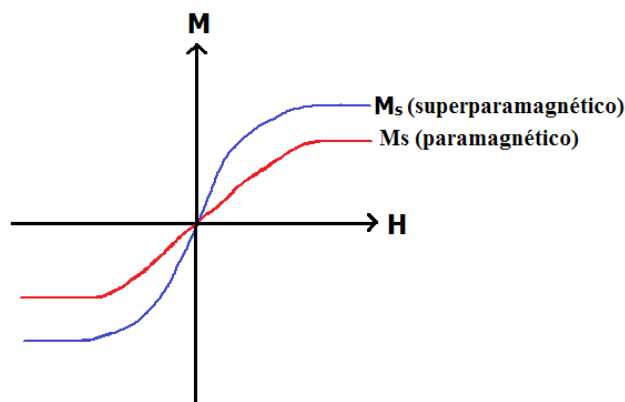


Fonte – Produção do próprio autor.

Nesses casos, esses monodomínios interagem entre si como materiais paramagnéticos, cujos momentos magnéticos tendem a se orientar paralelamente a um campo magnético externo até uma magnetização de saturação (Figura 3.6), porém, ao retirar-se o campo, a magnetização é nula (ou seja, a magnetização remanescente e a coercividade do material são nulas, não apresentando histerese).

Em diâmetros ainda menores (denominados diâmetros superparamagnéticos, D_{sp}), ou em temperaturas elevadas (acima da temperatura de bloqueio T_B), os momentos magnéticos das nanopartículas flutuam em um intervalo de tempo curto e seu comportamento magnético é similar ao dos materiais paramagnéticos, porém, com magnetização de saturação superior (COEY, 2009). A Figura 3.6 apresenta uma curva genérica de magnetização (M) em função de um campo magnético externo aplicado (H), para materiais paramagnéticos e superparamagnéticos.

Figura 3.6 – Curva de magnetização (M) em função de um campo magnético externo aplicado (H), para materiais paramagnéticos e superparamagnéticos.



Fonte – Produção do próprio autor.

Nanopartículas que apresentam comportamento superparamagnético são bastante estudadas em aplicações biomédicas, pois além de apresentarem valores superiores de magnetização aos materiais paramagnéticos, também podem ser direcionadas a tecidos-alvos na presença de um campo magnético externo (MAHDAVI et al., 2013).

Apesar da magnetita e da maghemita em escala nanométrica apresentarem comportamento magnético semelhante, experimentalmente é evidenciado que a magnetita apresenta magnetização de saturação superior à da maghemita. Apesar da magnetização de saturação depender de diversos fatores como tamanho do grão, composição, anisotropia etc., é possível encontrar trabalhos na literatura que atribui tal fato às características estruturais da maghemita, como um aumento de íons Fe^{3+} em sítios tetraédricos durante a oxidação ou a presença de vacâncias preferencialmente em sítios octaédricos (GOSS, 1988; HANEDA, MORRISH, 1977; GREAVES, 1983).

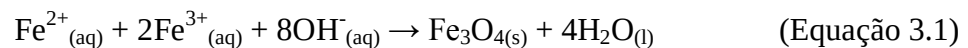
3.3.Síntese de nanopartículas de magnetita e maghemita pelo método de coprecipitação

As nanopartículas magnéticas de magnetita e maghemita podem ser obtidas por diversas metodologias, tais como: método poliol (FIEVET et al., 1989), sol-gel

(DEL MONTE et al., 1997), microemulsão (LIZ et al., 1994), reação hidrotermal (QIAN et al., 1994) e coprecipitação (MASSART, 1981).

Entre estes, o método de coprecipitação é o mais empregado devido à formação de nanopartículas com boa cristalinidade, morfologia regularmente esférica, alta pureza e composição estequiométrica, além de ser um método simples e eficaz (MAHDAVI et al., 2013; LAURENT et al., 2008). O diâmetro médio das nanopartículas obtidas por coprecipitação varia de 5 a 100 nm, dependendo das condições experimentais, porém, o sistema é sempre polidisperso em tamanho, devido sobretudo à maturação de Ostwald, no qual as nanopartículas menores se dissolvem e as espécies químicas se depositam na superfície de cristais maiores (LEE et al., 2004).

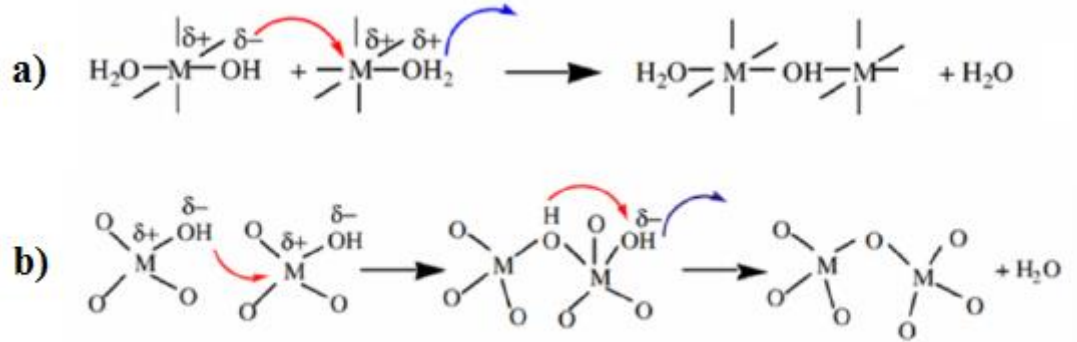
No método da coprecipitação, uma mistura estequiométrica de sais de ferro II e III é preparada e os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} são precipitados com uma solução alcalina de NaOH ou NH_4OH (GUPTA et al., 2005), formando a magnetita (Fe_3O_4). A equação química da precipitação de Fe_3O_4 é dada por:



Rapidamente após a adição da base na mistura de sais de ferro, a magnetita é formada, sendo facilmente observada a formação de um sólido de cor preta.

O processo de síntese da magnetita envolve reações de hidrólise e condensação. Os íons ferro em solução formam aquo-complexos $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_x]^{n+}$ que, em meio básico, sofrem reações de hidrólise formando espécies $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_{x-1}(\text{OH})]^{(n-1)+}$ e $[(\text{FeOH})_x(\text{O})_y]^{n-x-2y}$. Essas espécies sofrem reações de condensação hidrolítica que resultam em pontes hidroxio (OH) ou oxo (O^{2-}), com subsequente eliminação de moléculas de água, como mostrado na Figura 3.7 (AHN et al., 2012; JOLIVET et al., 2008):

Figura 3.7 – Representação das reações de condensação entre: a) aquohidroxocomplexos $[(M(OH)_x(H_2O)_{y-x})^{n-x}]$ e b) oxohidroxocomplexos $[(MOH)_x(O)_y]^{n-x-2y}$.



Fonte – Adaptada de JOLIVET et al. (2008) com autorização de Springer Copyright Clearance Center.

A formação das nanopartículas de magnetita envolve duas etapas: nucleação e crescimento. A primeira etapa, de nucleação, ocorre quando a concentração das espécies solúveis em solução atinge a supersaturação (sendo alta a energia livre de Gibbs, ΔG). Nessa etapa, formam-se inúmeros núcleos e a concentração de equilíbrio da solução é restaurada, de forma que há a diminuição da energia livre (SUGIMOTO, 2001). A redução de energia de Gibbs por unidade de volume pode ser expressa como:

$$\Delta G_V = \frac{-kT}{\Omega \cdot \ln(C/C_o)} = \frac{-kT}{\Omega \cdot \ln(1 + \sigma)} \quad (\text{Equação 3.2})$$

na qual k é a constante de Boltzmann, Ω o volume do cristal formado, C a concentração do soluto, C_o a concentração de equilíbrio (ou solubilidade da espécie) e σ a supersaturação definida como $(C-C_o/C_o)$. Se $C > C_o$; logo ΔG_V é negativo e a nucleação ocorre espontaneamente (CAO et al., 2011).

Considerando a formação de um núcleo esférico de raio R , o potencial químico associado ao volume ($\Delta\mu_v$) do núcleo cristalino formado é dado por:

$$\Delta\mu_v = \frac{4}{3}\pi R^3 \Delta G_V \quad (\text{Equação 3.3})$$

Entretanto, essa redução de energia é contrabalanceada pela introdução da energia de superfície ($\Delta\mu_s$), sempre positiva, relacionada à formação de uma nova fase, sendo γ a energia de superfície por unidade de área:

$$\Delta\mu_s = 4\pi R^2\gamma \quad (\text{Equação 3.4})$$

Assim, a energia livre de Gibbs total para que ocorra a nucleação é o somatório dos potenciais químicos associados ao volume ($\Delta\mu_v$) e à energia de superfície ($\Delta\mu_s$), de forma que:

$$\Delta G(R) = \Delta\mu_v + \Delta\mu_s = 4\pi R^2\gamma + \frac{4}{3}\pi R^3\Delta G_V \quad (\text{Equação 3.5})$$

Como a energia livre de Gibbs para o processo de nucleação é uma função do raio R do núcleo formado, possuindo um termo sempre negativo e outro sempre positivo, a estabilidade dos núcleos formados só será obtida acima de um raio crítico ($R_{\text{crít}}$), quando $\Delta G(R) < 0$ (THANH et al., 2014). Um núcleo possuindo raio menor que o raio crítico irá dissolver de forma a reduzir a energia de superfície do sistema, podendo ser reincorporado em cristais maiores, através do amadurecimento de Ostwald (RATKE et al., 2002).

Quando a concentração das espécies em solução se tornam inferiores à supersaturação, a nucleação para de ocorrer, dando início à etapa de crescimento. No crescimento das nanopartículas, o crescimento dos núcleos é controlado por dois mecanismos: difusão e reação na superfície (CAO et al., 2011; THANH et al., 2014).

Se o crescimento é controlado pela difusão das espécies entre a solução à superfície dos núcleos, o crescimento deverá ocorrer numa camada de difusão, em um fluxo total das espécies crescentes dado por:

$$J = \frac{4\pi DR(R+\gamma)}{d_v} (C_b - C_i) \quad (\text{Equação 3.6})$$

na qual J é o fluxo total das espécies crescentes na camada de difusão, D é o coeficiente de difusão, d_v é a distância da superfície do núcleo até o fim da camada de difusão, C_b é a concentração das espécies crescentes em solução e C_i a concentração das espécies crescentes na interface sólido/líquido do núcleo com a solução. Neste caso, considera-se que a difusão é o fator limitante para o crescimento (SUGIMOTO, 2001; CAO et al., 2011).

Se a difusão entre a superfície do núcleo e a solução é rápida, o mecanismo de controle é de reação na superfície. Neste caso, as concentrações das espécies crescentes na superfície do núcleo e na solução são iguais. No crescimento controlado por reação na superfície, as espécies crescentes reagem com a superfície, crescendo camada por camada. Caso a concentração das espécies crescentes na superfície seja muito alta, uma camada posterior pode crescer antes mesmo da camada anterior ter crescido completamente (SUGIMOTO, 2001).

A taxa de crescimento controlado pela reação na superfície é expressa como:

$$J = 4\pi R^2 k \cdot (C_b - C_i) \quad (\text{Equação 3.7})$$

Sendo k a constante de reação na superfície.

Apesar da magnetita poder ser obtida pelo método de coprecipitação dos íons Fe^{3+} e Fe^{2+} , nanopartículas de maghemita não podem ser obtidas pela coprecipitação de íons Fe^{3+} em meio alcalino, já que neste caso, haveria a formação de oxihidróxido de ferro (FeOOH) ou $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, a depender da metodologia de síntese (LI et al., 2015). Apesar disso, os íons Fe^{2+} da estrutura da magnetita podem ser oxidados, formando a maghemita $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (HANEDA et al., 1977; SALAZAR et al., 2011).

Naturalmente, a magnetita tende a oxidar à maghemita na presença de oxigênio e água (JOHNSON et al., 1972; ANAND et al., 1984). Desta forma, nanopartículas de magnetita obtidas sinteticamente, mantidas em suspensão aquosa, irão ter os íons Fe^{2+} de sua estrutura oxidados ao longo do tempo.

Além de oxidar naturalmente, as nanopartículas de magnetita podem ter sua oxidação induzida. Um dos métodos de realizar a oxidação de nanopartículas de magnetita é através do borbulhamento de oxigênio em uma suspensão de nanopartículas (SIDHU et al., 1977; WU et al., 2008; TANG et al., 2003).

Embora haja consenso entre diversos autores de que, durante a transformação de magnetita a maghemita, a oxidação dos íons Fe^{2+} a Fe^{3+} é acompanhada da migração de cátions na rede, formando vacâncias catiônicas, há bastante discussão sobre o mecanismo de oxidação da magnetita por este método quanto à perda de íons ferro ou a difusão de íons óxido na rede cristalina (LAURENT et al., 2008; SWADDLE et al., 1980).

Na literatura, além do método utilizando borbulhamento de oxigênio, também são descritos outros métodos de oxidação da magnetita à maghemita envolvendo

mecanismos de transferência de elétrons, como os que utilizam sais com alto potencial oxidante – por exemplo, nitrato e nitrito (VERGÉS et al., 2008; DHAKAL et al., 2013).

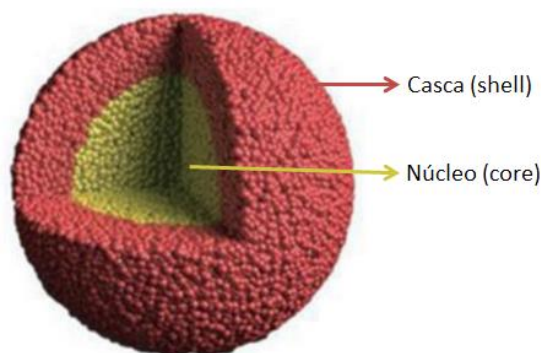
3.4. Funcionalização da superfície das nanopartículas

Nanopartículas magnéticas são capazes de permanecerem suspensas em líquidos carreadores, orgânicos ou aquosos, formando suspensões coloidais denominadas de fluidos magnéticos (ou ferrofluidos). Muitas vezes, essas suspensões permanecem estáveis devido apenas ao movimento Browniano, capaz de evitar a sedimentação das nanopartículas pela força gravitacional (SHAW, 1975).

Entretanto, a interação de Van der Waals e a atração dipolar magnética entre as nanopartículas tendem a aglomerá-las, provocando sua sedimentação e a desestabilização do sistema (HUNTER, 1986).

Para evitar a agregação das nanopartículas, modifica-se a superfície das mesmas, com materiais orgânicos e inorgânicos, como polímeros, surfactantes, sílica, etc., formando estruturas do tipo núcleo-casca (ou core-shell), nas quais o núcleo é constituído de óxido de ferro (núcleo magnético) e a casca constituída do material com o qual se modificou (ou funcionalizou) a superfície das nanopartículas (CHAUDHURI; PARIA, 2012).

Figura 3.8 - Estrutura core-shell



Fonte – adaptada de ZHANG e YAN, 2013.

Além de evitar a agregação, a funcionalização das nanopartículas proporciona maior interação com o solvente, dependendo do tipo de molécula utilizada para

funcionalização bem como do tipo de solvente utilizado para dispersá-las (CORR et al., 2008).

Assim, nanopartículas funcionalizadas com moléculas contendo cadeias apolares, como o caso de nanopartículas de maghemita funcionalizada com ácido oleico, nas quais as moléculas de oleato estão ligadas às nanopartículas por uma ligação ferro-carboxilato e a cadeia carbônica se encontra voltada para fora da superfície (voltadas para as moléculas do solvente), terão maior molhabilidade com solventes apolares, como óleo mineral, formando sistemas com maior estabilidade coloidal (VIALI et al., 2010).

Da mesma forma, nanopartículas funcionalizadas com moléculas polares, como aquelas funcionalizadas com ácido cítrico, terão maior molhabilidade em solventes polares como a água (NIGAM et al., 2011; CHERAGHIPOUR et al., 2012).

Além de possibilitar a dispersão das nanopartículas em diferentes líquidos carreadores, a funcionalização das nanopartículas também é capaz de fornecer-lhes diferentes funções, como fluorescência (PETERS et al., 2014; MEDAROVA et al., 2007), carregamento de drogas (RAMOS et al., 2014; MAHDAVI et al., 2013), direcionamento a diferentes tecidos ou órgãos (VAN BEERS et al., 2001; FRANK et al., 2003), reconhecimento de biomarcadores (GEORGANOPOULOU et al., 2005), etc.

Desta forma, a escolha do material a ser utilizado no recobrimento das partículas deve ser feita em conformidade com a aplicação a qual se destina o produto final, bem como ao líquido em que estas serão dispersas.

3.5. Estabilização de suspensões coloidais

Uma dispersão coloidal pode ser considerada estável enquanto as nanopartículas em suspensão mantiverem suas identidades originais - ou seja, não sofrerem processos de agregação, coagulação, sedimentação ou floculação (MYERS, 1999). As nanopartículas são estabilizadas em suspensão (do ponto de vista cinético) por dois mecanismos: estabilização eletrostática e/ou estabilização estérica.

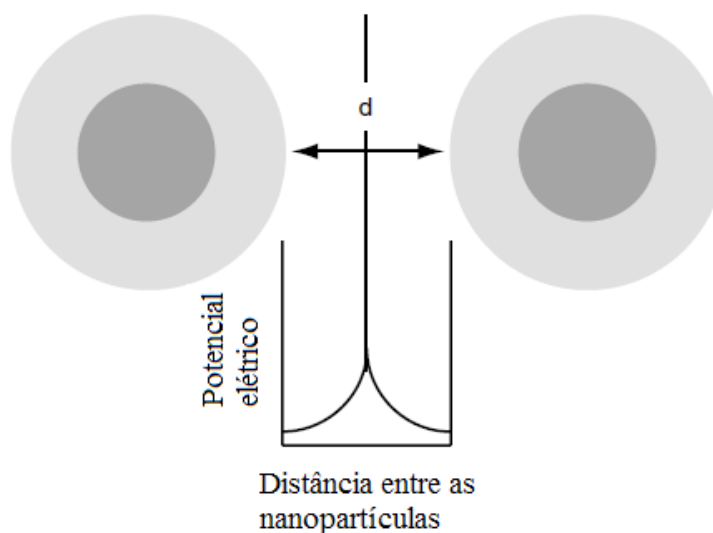
Para que a agregação de nanopartículas ocorra, elas precisam colidir com energia suficiente para que essa colisão seja efetiva. Quando duas nanopartículas

carregadas se aproximam em direção à colisão, as camadas elétricas destas interagem eletrostaticamente. Considerando um sistema coloidal no qual todas nanopartículas possuem cargas superficiais de mesmo sinal, quando estas nanopartículas carregadas se aproximam, há um aumento de potencial elétrico entre elas, fazendo com que sofram repulsão e assim se afastem novamente.

Porém, ao se aproximarem, as nanopartículas sofrem também interações atrativas do tipo van der Waals, capazes de desestabilizar a suspensão coloidal. Então, a energia total de interação para tais sistemas será o somatório das energias de atração (van der Waals) e repulsão (eletrostática). Se a energia de repulsão for superior à energia de atração, as nanopartículas em suspensão tenderão a não agregar, mantendo-se suspensas (MYERS, 1999; HIEMENZ, RAJAGOPALAN, 1997).

O potencial elétrico oriundo da superfície carregada da nanopartícula, chamado de potencial zeta, capaz de manter as nanopartículas em suspensão sem que haja agregação das mesmas, dependerá da concentração e da carga elétrica da espécie química presente na superfície da nanopartícula e responsável pela carga superficial. Assim, para nanopartículas que possuem em sua superfície moléculas carregadas, quanto maior for o número de moléculas na superfície, bem como maior o número de grupos catiônicos/aniônicos, maior será a força de repulsão entre as nanopartículas e menor a probabilidade de ocorrer colisões efetivas (MYERS, 1999).

Figura 3.9 – Aumento do potencial elétrico ao aproximar duas nanopartículas carregadas (de mesmo sinal) devido à repulsão eletrostática entre elas.



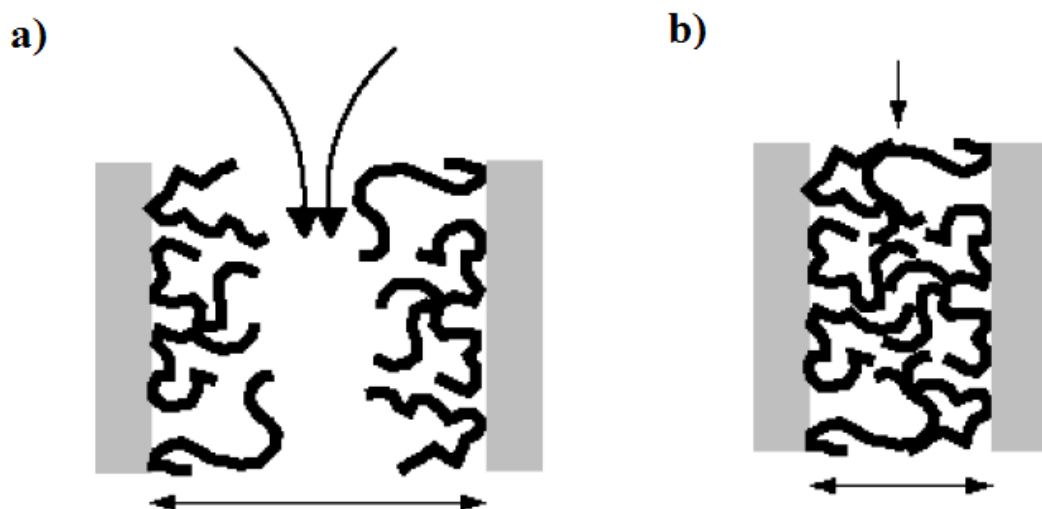
Fonte – Adaptada de Myers (1999).

Na estabilização estérica, as nanopartículas são funcionalizadas com moléculas (geralmente polímeros e outras moléculas de cadeia longa e/ou liofílicas) cujas cadeias começam a se interpenetrar quando as nanopartículas se aproximam. Esta interpenetração gera dois efeitos: um osmótico, devido ao aumento de concentração local das moléculas entre as duas nanopartículas, e um efeito entrópico, ou de restrição de volume devido à perda de graus de liberdade das moléculas da superfície que interagem entre si (MYERS, 1999; HIEMENZ, RAJAGOPALAN, 1997).

Em ambos casos, o sistema irá sofrer uma diminuição da entropia, o que não será favorável. No caso do efeito osmótico, pode ocorrer ainda a dessolvatação das moléculas superficiais que se aproximam.

Para superar a perda de entropia, as nanopartículas devem se afastar e adquirir maior liberdade de movimentação, possibilitando a ressolvatação das moléculas superficiais e garantindo uma barreira energética de aproximação entre as nanopartículas, a fim de evitar a agregação das mesmas. A figura 3.10 representa o efeito osmótico e o efeito entrópico da estabilização estérica de nanopartículas funcionalizadas:

Figura 3.10 – Mecanismo de estabilização estérica: a) efeito osmótico, responsável pelo deslocamento de moléculas do solvente para a região entre as superfícies, separando-as, b) efeito entrópico ou de restrição de volume, devido à perda de graus de liberdade das moléculas na superfície.



Fonte – Adaptada de Myers (1999).

Além disso, na estabilização estérica, uma forte repulsão entre as nanopartículas só será alcançada quando se tem tanto uma forte interação entre as moléculas e a superfície da nanopartícula quanto um alto grau de revestimento na superfície. Caso não sejam obtidos estes critérios, quando as nanopartículas funcionalizadas se aproximarem, as moléculas na superfície serão desorvidas da superfície, deixando uma região superficial “descoberta de moléculas”. Essa desorção de moléculas na superfície geraria um desequilíbrio osmótico, já que a concentração das moléculas desorvidas no restante da solução seria maior do que a concentração das mesmas entre as nanopartículas.

Outro fator importante na estabilização de colóides é o solvente no qual estes estarão dispersos. Em um solvente com boa molhabilidade, as moléculas da superfície adquirem conformações que favorecem a interação com o solvente. Caso os colóides sejam dispersos em um solvente com molhabilidade ruim, as moléculas superficiais irão colapsar na superfície do colóide, favorecendo a floculação.

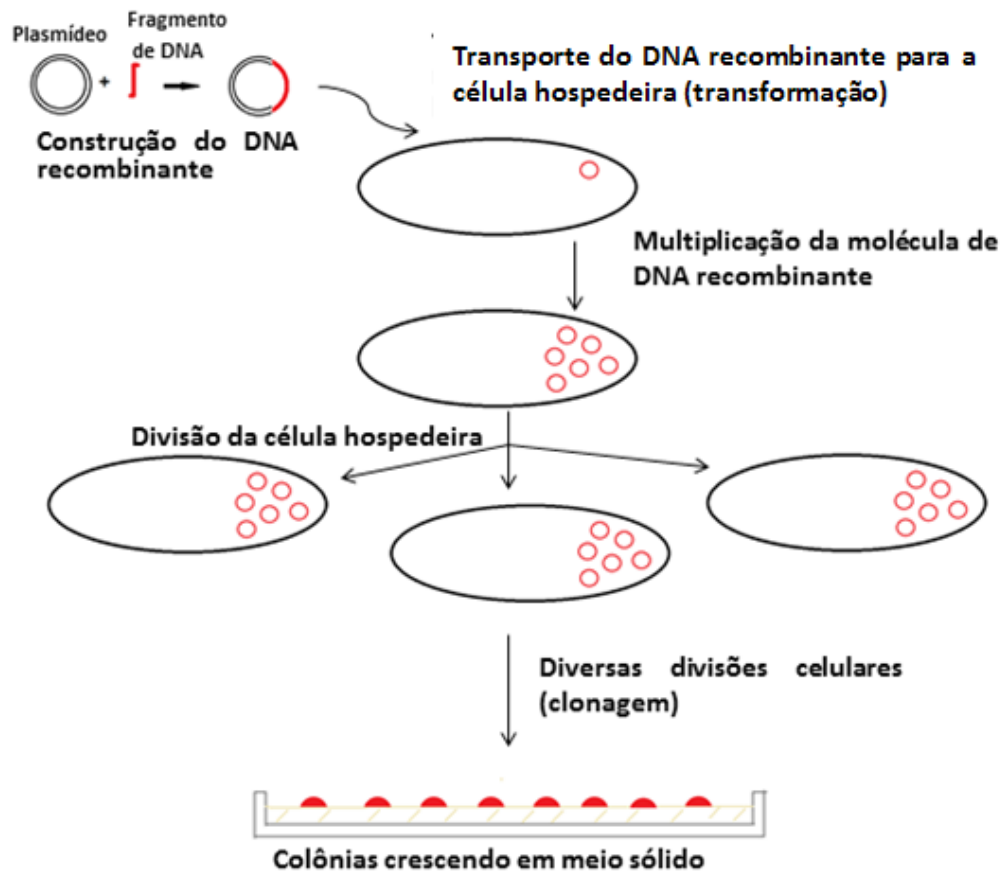
3.6. Plasmídeos

Plasmídeos são moléculas circulares de ácido desoxirribonucleico (DNA) extracromossomal, capazes de se replicarem autonomamente em células hospedeiras usando a mesma maquinaria celular que realiza a replicação do DNA cromossômico, e de copiar o DNA plasmidial para as células-filhas durante a divisão celular (ALLISON, 2011; COUTURIER et al., 1988).

Podem ser naturalmente encontrados em diversos micro-organismos (sobretudo bactérias) e conter de um único gene a milhares de genes, que são potencialmente úteis para, além de suas próprias funções, conferir vantagens seletivas aos seus hospedeiros, como por exemplo, resistência a antibióticos e transferência de material genético por conjugação (MILJKOVIC-SELIMOVIC et al., 2007).

Um dos principais usos dos plasmídeos em biologia molecular é como vetores de clonagem, já que por serem auto-replicantes, irão se multiplicar na célula hospedeira produzindo cópias de si próprio, bem como dos genes exógenos que transportam (DNA recombinante). Após a célula hospedeira passar por diversas divisões celulares, terá sido formada uma colônia de células hospedeiras idênticas contendo diversas cópias das moléculas de DNA recombinante (ALLISON, 2011).

Figura 3.11 - Obtenção do DNA recombinante a partir de plasmídeo e fragmento de DNA e clonagem através da divisão celular.



Fonte – Produção do próprio autor.

A transfecção de plasmídeos codificadores de proteínas marcadoras, como a proteína verde fluorescente (sigla em inglês, GFP), permite a visualização da localização e o comportamento da proteína em células vivas, bem como o estudo da morfologia e característica de crescimento das células (WEBB et al., 1995; HAAS et al., 2001). Também podem ser utilizadas em experimentos *in vitro*, para verificação de sua transfecção e expressão dessas proteínas em células de interesse (WANG et al., 2011).

Pelo mecanismo de silenciamento gênico conhecido como RNA de interferência (RNAi), também é possível prevenir a produção de proteínas específicas dentro da célula através da transfecção de plasmídeos codificadores de moléculas precursoras do RNAi (BRUMMELKAMP et al., 2002).

Apesar de que quando utilizados como vetores para transfecção serem capazes de garantir altas eficiências de transfecção em células e baixa antigenicidade (NISHI et al., 1996), os plasmídeos podem apresentar algumas limitações, como lenta acumulação e baixa concentração em tecidos-alvo (LUO; SALTZMAN, 2000).

Uma das alternativas que apresentam grande potencial para driblar tais limitações é o uso de nanopartículas para mediação da transfecção de plasmídeos, chamada de magnetofecção (WANG et al., 2011). Na magnetofecção, o DNA plasmídico forma complexos com partículas magnéticas, sendo o sistema nanopartícula/plasmídeo posteriormente transfectados nas células de interesse. Com o uso de um campo magnético externo, tais nanopartículas podem ser direcionadas aos tecidos-alvo.

3.7. RNA de interferência

O RNA de interferência (RNAi) está envolvido no mecanismo celular de silenciamento gênico pós-transcricional, sendo responsável pela clivagem, degradação ou inibição da tradução de RNAs mensageiros (RNAm) contendo sequências específicas (ZHOU et al., 2013).

No processo de silenciamento, várias enzimas são envolvidas: a enzima Dicer endonuclease é responsável pela clivagem de moléculas precursoras de RNA chamadas RNA de interferência (*small interfering* RNA ou siRNA), como as moléculas de RNA de fita dupla (*double-stranded* RNA ou dsRNA) e as de *short hairpin* RNA (shRNA).

A seguir, a fita de siRNA formada é capaz de se associar a um complexo ribonucleoprotéico através da proteína argonauta, formando o complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*). Após a associação, uma das fitas do siRNA é eliminada e o complexo RISC permite o pareamento entre a fita do siRNA incorporada e uma região específica do RNAm alvo por complementaridade de bases (CHENG; MAHATO, 2013).

Geralmente, as proteínas argonautas ligadas ao RNAi apresentam atividade de endonuclease contra a fita de RNAm, de forma a degradar o RNAm, porém também é possível haver uma complementaridade apenas parcial entre RNAi e RNAm de forma a ocorrer apenas a repressão da tradução (FRANÇA et al., 2010).

A via de transfecção do RNAi pode ser ativada experimentalmente por meio da transfecção *in vitro* ou *in vivo* de moléculas sintéticas de siRNA (small interfering RNA) (ELBASHIR et al., 2001), por outras moléculas precursoras de siRNA, como o shRNA (short hairpin RNA) (MOORE et al., 2010; ZHOU et al., 2013), bem como pelo complexo entre a enzima Dicer e o siRNA, chamado DsiRNA (Dicer substrate siRNA) (KIM et al., 2005).

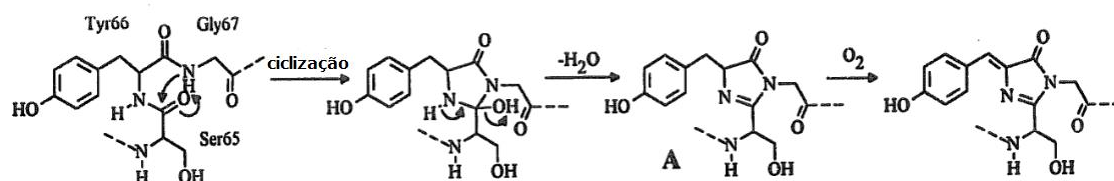
Ensaio clínico com RNAi têm apresentado grande potencial no tratamento e diagnóstico de diversas doenças humanas devido a sua defesa contra genes parasíticos, como Degeneração Macular Relacionada à Idade - AMD (DEJNEKA et al., 2008), Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – AIDS (DAS et al., 2004), poliomielite (GITLIN et al., 2005), além de diversas doenças genéticas, cardiovasculares e câncer (ROZEMA et al., 2007).

3.8. Proteína Verde Fluorescente

A classe de proteínas denominada proteína verde fluorescente (green fluorescent protein, sigla em inglês GFP) é utilizada como marcador biológico em biologia celular, biologia molecular e medicina. É uma proteína estável, tendo seu cromóforo formado pela ciclização autocatalítica (sem a necessidade de um cofator), possibilitando assim o uso do GFP em sistemas vivos. As GFP são encontradas em diversos seres vivos, porém, a primeira clonada e mais estudada é aquela encontrada na água-viva de espécie *Aequorea victoria* (ZIMMER, 2002).

A proteína GFP encontrada na espécie *Aequorea victoria* contém 238 aminoácidos, sendo a sequência de resíduos 65-67 (serina-tirosina-glicina, Ser-Tyr-Gly), a formadora do cromóforo p-hidroxibenzilideno imidazolinona por reações de ciclização autocatalítica e oxidação. A imagem abaixo (Figura 3.12) apresenta o mecanismo de formação de tal cromóforo proposto por Cubitt e colaboradores (1995):

Figura 3.12 – Mecanismo proposto para a formação do cromóforo p-hidroxibenzilideno imidazolinona da GFP, envolvendo uma etapa de ciclização autocatalítica e oxidação.



Fonte - Adaptada de CUBITT e colaboradores (1995)

Apesar de haver pequenas variações espectrais nas diferentes classes de GFP, o espectro de excitação do GFP, em suma, apresenta um máximo de excitação em torno de 400 nm e um máximo três vezes menor em 470 nm, enquanto que o espectro de emissão apresenta um máximo em 505 nm e um ombro em torno de 540 nm (TSIEN, 1998).

4. METODOLOGIA

Foram preparadas cinco amostras de fluidos magnéticos constituídos de maghemita funcionalizada com L-Lisina e um fluido magnético constituído de maghemita funcionalizada com DL-Histidina.

As metodologias empregadas para a preparação dos fluidos magnéticos de maghemita funcionalizada com L-Lisina diferenciaram-se entre si em relação à proporção molar ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$): aminoácido, ao método de funcionalização empregado e a base utilizada na coprecipitação.

4.1. Obtenção dos fluidos maghemita/L-Lisina e maghemita/DL-Histidina por coprecipitação de sais de ferro em hidróxido de amônio na presença do respectivo aminoácido (método A)

Foram realizadas três sínteses de magnetita na presença dos aminoácidos L-Lisina ou DL-Histidina pelo método A. Inicialmente, foram dissolvidos 20 mmol de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (JT Baker) e 40 mmol de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (VETEC) em 146 mL de água destilada contendo 1 mL de HCl concentrado (37%). Em seguida, 300 mL de uma solução aquosa do aminoácido (L-Lisina ou DL-Histidina) foi preparada e adicionada à solução de íons ferro. Posteriormente, despejou-se sobre a solução resultante, 100 mL de solução de hidróxido de amônio 28-30% (Nuclear), sob agitação (600 rpm) e aquecimento a 40° C por 20 minutos, permanecendo a agitação por mais 40 minutos sem aquecimento (DURMUS et al., 2009; ÜNAL et al., 2010). As proporções molares $\text{Fe}^{2+} : \text{Fe}^{3+} : \text{aminoácido}$ empregadas em cada uma das três sínteses estão descritas na Tabela 4.1.

As nanopartículas formadas foram sedimentadas com auxílio de uma placa magnética e, então, lavadas com água destilada até que as águas de lavagem apresentassem pH próximo a 7. Para cada síntese, uma pequena fração sólida da amostra foi retirada para análise de difração de raios X (DRX) e o restante do sólido foi redisperso em 250 mL de água destilada e sonicado por 30 minutos (UNIQUE Ultra-Sonic), sendo posteriormente mantido sob agitação por tombamento por 48 horas.

As suspensões coloidais obtidas foram centrifugadas para separação de qualquer fração sólida presente, formando os fluidos NPLis1A, NPHis1A e NPLis2A (Tabela 1). Uma alíquota de cada fluido foi retirada e seca em estufa a 70° C por 48 horas para caracterização por espectrometria no infravermelho (FTIR) e análise termogravimétrica (TG). Os fluidos obtidos foram caracterizados por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), Espalhamento Eletroforético de Luz (ELS) e teor de ferro (espectrofotometria UV-Vis pelo método da orto-fenantrolina).

4.2. Obtenção do fluido maghemita/L-Lisina por posterior funcionalização das nanopartículas com o aminoácido (método B)

O fluido de maghemita funcionalizada com L-Lisina obtido pelo método B foi preparado empregando-se um procedimento semelhante ao descrito no item 4.1, porém, as nanopartículas de magnetita foram inicialmente precipitadas na ausência do aminoácido e depois funcionalizadas com L-Lisina. Uma fração do sólido obtido antes da funcionalização foi lavado com água destilada e seco, originando a amostra NPM.

Após a síntese da magnetita, 40 mmol de monoclórato de L-Lisina (Synth) foi dissolvido em 250 mL da suspensão de nanopartículas e o pH foi ajustado para 5 com uma solução diluída de ácido clorídrico, deixando-se a suspensão sob agitação por tombamento por 48 horas (BABIC et al., 2008; WANG et al., 2012).

As nanopartículas funcionalizadas foram lavadas com água e redispersas em 250 mL de água destilada. Então, foram sonicadas, agitadas por 48 horas e centrifugadas, formando o fluido NPLis1B. As amostras obtidas foram caracterizadas por FTIR, DRX, DLS, ELS, TG, UV-Vis, de forma similar à relatada no subcapítulo 4.1.

4.3. Obtenção do fluido maghemita/L-Lisina por sucessiva funcionalização da nanopartícula com o aminoácido (método C)

O fluido maghemita/L-Lisina obtido pelo método C foi preparado nas mesmas proporções molares ($\text{Fe}^{2+} : \text{Fe}^{3+}$) : aminoácido utilizadas para o fluido NPLis1A (Tabela 4.1), bem como as mesmas condições de agitação e aquecimento.

Porém, neste método, foi adicionada rapidamente à solução de sais de ferro (II) e (III) a solução de hidróxido de amônio NH_4OH (28-30 %), seguida da adição rápida do monoclórato de L-Lisina.

As nanopartículas foram dispersas em água destilada, sonicadas, agitadas e centrifugadas, formando o fluido NPLis1C.

As amostras obtidas foram caracterizadas por FTIR, DRX, DLS, ELS, TG, UV-Vis, de forma similar à relatada no subcapítulo 4.1.

4.4.Obtenção do fluido maghemita/L-Lisina por coprecipitação de sais de ferro em hidróxido de sódio na presença do aminoácido (método D)

O fluido maghemita/L-Lisina obtido pelo método D foi preparado nas mesmas proporções molares ($\text{Fe}^{2+} : \text{Fe}^{3+}$) : aminoácido e mesmas condições utilizadas para o fluido NPLis1A. Assim como para o fluido NPLis1A, tal fluido foi obtido por coprecipitação dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} na presença do aminoácido L-Lisina, porém a base utilizada para a coprecipitação foi uma solução de hidróxido de sódio NaOH 2 mol.L^{-1} .

As nanopartículas foram então dispersas em água destilada, sonicadas, agitadas e centrifugadas, formando o fluido NPLis1D.

As amostras obtidas foram caracterizadas por FTIR, DRX, DLS, ELS, TG, UV-Vis, de forma similar à relatada no subcapítulo anterior.

Tabela 4.1 - Quantidades e proporções de sais de ferro (II) e (III) e aminoácido utilizado nas sínteses, base utilizada e métodos de obtenção dos fluidos magnéticos.

Fluidos Magnéticos	FeCl ₂ .4H ₂ O (mmol)	FeCl ₃ .6H ₂ O (mmol)	Base	Aminoácido (L-Lisina ou DL-Histidina) (mmol)	Proporção Molar Fe ²⁺ :Fe ³⁺ : Aminoácido	Método de Obtenção
NPLis1A	20	40	NH ₄ OH	40	1:2:2	A
NPHis1A	20	40	NH ₄ OH	40	1:2:2	A
NPLis2A	20	40	NH ₄ OH	60	1:2:3	A
NPLis1B	20	40	NH ₄ OH	40	1:2:2	B
NPLis1C	20	40	NH ₄ OH	40	1:2:2	C
NPLis1D	20	40	NaOH	40	1:2:2	D

4.5. Experimentos preliminares de adsorção de DNA de *Humicola grisea* no fluido NPLis1A

Uma amostra de DNA do fungo *Humicola grisea* (concentração de DNA 171 ng.µL⁻¹) foi cedida pelo Prof. Marcio Poças do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília-UnB, para ensaio de interação e adsorção do DNA com as nanopartículas funcionalizadas com aminoácido. Nos testes preliminares de adsorção esta amostra de DNA cromossômico genérico foi usada em substituição ao DNA plasmídico devido ao menor custo e simplicidade do método de obtenção.

Para tal estudo, foi selecionado o fluido NPLis1A por ter atingido potencial isoelétrico acima do pH fisiológico e por ter apresentado estabilidade coloidal durante o desenvolvimento do trabalho.

4.5.1. Quantificação da adsorção de DNA de *Humicola grisea* no fluido NPLis1A

Para quantificação do DNA adsorvido na maghemita/L-lisina, 20 µL de uma solução de DNA 171 ng.µL⁻¹ foi diluída a 500 µL com água deionizada, dando origem à solução DNAD1, cuja concentração foi determinada no espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Dessa solução, 400 µL foram adicionados a

80 μL do fluido NPLis1A e a mistura foi agitada por 30 minutos e deixada em repouso por 48 horas sob um imã. A suspensão foi posteriormente centrifugada por 40 minutos a 3500 rpm e o sobrenadante (amostra DNAD1NP) teve a concentração de DNA quantificada no espectrofotômetro Nanodrop 2000. O sólido isolado (amostra NPLis1ADNA) foi analisado por FTIR.

4.5.2. Medida de raio hidrodinâmico em função das adições da amostra de DNA

Acompanhou-se o crescimento do raio hidrodinâmico das nanopartículas em suspensão em função da adição de alíquotas de DNA do fungo *Humicola grisea*. Em 1 mL do fluido NPLis1A, foram feitas três adições sucessivas de 5 μL da solução de DNA (171 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de DNA) correspondentes às seguintes massas de DNA: 0,855 μg , 1,710 μg e 2,565 μg . Após cada adição, a suspensão foi agitada por 30 minutos e deixada em repouso por meia hora e, em seguida, mediu-se o raio hidrodinâmico. Após a adição de 15 μL de solução de DNA, o fluido magnético já não apresentava estabilidade coloidal, sendo observados sedimentos sólidos na amostra.

4.5.3. Recobrimento das nanopartículas maghemita/L-Lisina/DNA com dextrana

Para o recobrimento com dextrana, duas amostras contendo 1 mL de fluido NPLis1A e 5 μL da solução de DNA (171 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de DNA) foram preparadas e agitadas por meia hora. As suspensões preparadas nessa proporção de DNA/NPLis1A foram denominadas NPDNA.

Posteriormente, foram adicionados 2,71 mg e 0,82 mg de dextrana T10 (peso molecular médio 10.000 Da, Pharmacosmos) a cada suspensão NPDNA, dando origem aos fluidos NPDNAdex01 e NPDNAdex02, respectivamente. As proporções maghemita/dextrana (m/m) empregadas estão descritas na tabela 4.2. Essas proporções foram escolhidas com base em trabalhos anteriores do grupo da Prof^a. Patrícia P. C. Sartoratto, a fim de verificar a manutenção da estabilidade coloidal para as diferentes proporções (MIRANDA-VILELA et al., 2014, JESUS, 2014).

Tabela 4.2 - Massa de NPLis1A, DNA e dextrana T10 e proporção maghemita/dextrana (m/m) utilizada para a preparação dos fluidos magnéticos NPDNADEX01 e NPDNADEX02.

Fluido Magnético	Massa de NPLis1A (mg)	Massa de DNA (µg)	Massa de Dextrana T10 (mg)	Proporção maghemita/dextrana (m/m)
NPDNADEX01	1,16	0,855	2,71	0,43
NPDNADEX02	1,16	0,855	0,82	1,44

Os fluidos NPDNADEX01 e NPDNADEX02 foram analisados por DLS para a determinação do raio hidrodinâmico. Tais amostras foram divididas em duas frações, sendo que uma fração de cada (NPDNADEX01a e NPDNADEX02a) foi seca em estufa a 40° C por 24 horas para caracterização por FTIR. As outras duas frações foram submetidas a fracionamento por gradiente de campo magnético, visando à separação do sólido. Após a separação, os sólidos foram lavados com água deionizada e secos de forma semelhante à já descrita, dando origem às amostras NPDNADEX01b e NPDNADEX02b, que foram também caracterizadas por FTIR.

4.6. Experimentos de adsorção de plasmídeo/shRNA e plasmídeo/GFP no fluido NPLis1A

Os plasmídeos contendo genes codificadores de shRNA (pshRNA) e aqueles contendo genes codificadores de GFP (pGFP) foram obtidos no Laboratório de Estudos Genômicos na Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de São José do Rio Preto – SP, sob a supervisão da Professora Paula Rahal e do estagiário de pós-doutoramento Bruno Moreira Carneiro.

Para a obtenção destes plasmídeos, bactérias *Escherichia coli* (E. coli) contendo os plasmídeos de interesse (transformadas) foram cultivadas a fim de se obter uma maior quantidade dos plasmídeos. Na primeira etapa, tais bactérias foram cultivadas em meio de cultura sólido (contendo antibióticos específicos aos genes de resistência das células), durante 16 horas.

Após tal período, foi selecionado apenas um agregado de células (colônia) para o crescimento das bactérias em meio de cultura líquido, permanecendo em cultura por 8 horas.

Após cultura, as células foram centrifugadas e o sobrenadante (meio de cultura) foi descartado. Foi utilizado para lise e extração dos plasmídeos de interesse, o kit comercial GeneJET Plasmid Miniprep Kit da Thermo Fisher Scientific. Tal processo é constituído das etapas lise alcalina das células, neutralização e precipitação de impurezas, além da purificação do plasmídeo com o uso de uma coluna de sílica.

As soluções de plasmídeos foram quantificadas espectrofotometricamente com o uso do Nanodrop, em $298,2 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (plasmídeo/shRNA) e $459,2 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (plasmídeo/GFP). Para melhor comparação dos resultados de adição dos diferentes plasmídeos no fluido magnético, a solução de plasmídeo codificador de GFP foi diluída para a mesma concentração da solução plasmídeo/shRNA para a realização dos experimentos de adição de plasmídeo ao fluido e posterior recobrimento com dextrana.

4.6.1. Medida de raio hidrodinâmico em função das adições de plasmídeo/shRNA e plasmídeo/GFP

Acompanhou-se o crescimento do raio hidrodinâmico das nanopartículas em suspensão em função da adição de alíquotas de plasmídeo/shRNA e plasmídeo/GFP. Em 1 mL do fluido NPLis1A, foram feitas quatro adições sucessivas de 3 μL de cada solução de plasmídeo (pshRNA e pGFP) correspondentes à 0,896 μg , 1,789 μg , 2,684 μg e 3,578 μg de plasmídeo. Tais amostras foram denominadas NPLis1A/P3, NPLis1A/P6, NPLis1A/P9 e NPLis1A/P12 em referência ao volume de plasmídeo adicionado e ao fluido magnético utilizado. Após cada adição, a suspensão foi agitada por 30 minutos e deixada em repouso por meia hora e, em seguida, mediu-se o raio hidrodinâmico.

4.6.2. Recobrimento das nanopartículas maghemita/L-Lisina/plasmídeo com dextrana

Para recobrimento das nanopartículas maghemita/plasmídeo com dextrana T10 (Pharmacosmos), foram preparadas duas amostras contendo 1 mL do fluido NPLis1A e 6 µL das soluções de plasmídeo (uma contendo a solução pshRNA e a outra pGFP), de forma similar à empregada para preparação da amostra NPDNA citada anteriormente. Estas amostras foram denominadas NPpshRNA e NPpGFP.

A proporção em massa maghemita/dextrana utilizada foi de 1,44, devido aos resultados obtidos nos experimentos prévios de recobrimento da amostra NPDNA. Assim, foram adicionadas 0,82 mg de dextrana T10 a cada amostra NPpshRNA e NPpGFP, dando origem às amostras NPpshRNAdex e NPpGFPdex. Tais amostras foram caracterizadas por DLS. O sólido suspenso foi então fracionado por gradiente de campo magnético e então caracterizado por FTIR.

4.7. Caracterizações

As análises de Microscopia Eletrônica de Transmissão e Espectroscopia de Energia Dispersiva realizadas neste trabalho foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução (LabMic), do Instituto de Física (IF) da Universidade Federal de Goiás – UFG. As demais análises foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química (IQ) da mesma universidade.

4.7.1. Difração de raios X (DRX)

Os sólidos obtidos da síntese das nanopartículas de maghemita funcionalizadas com os aminoácidos L-Lisina/DL-Histidina foram triturados em almofariz de ágata e peneirados (em peneira de 100 mesh), até a obtenção de pós finos, sendo então caracterizados por difração de raios-X (DRX) pelo método do pó, em um difratômetro da marca Shimadzu, modelo XRD 6000, utilizando radiação CuK_α com comprimento de onda de $\lambda=1,54056\text{\AA}$, 40 kV, 30 mA e varredura de 2 θ de 10° a 80°.

Além de permitir a identificação da fase cristalina do sólido obtido, esta técnica também permite o cálculo do tamanho médio dos cristalitos através da

equação de Scherrer (CULLITY, 1978), que relaciona o diâmetro médio dos domínios cristalinos com a largura à meia altura (FWHM) do pico de maior intensidade, como demonstrado na equação 4.1.

$$t = \frac{0,9\lambda}{B \cos \theta} \quad \text{Equação 4.1}$$

Na qual,

t = diâmetro médio dos cristalitos;

B = largura à meia altura (FWHM) do pico mais intenso;

θ = ângulo de Bragg.

Os cálculos de parâmetro de rede dos sólidos obtidos foram estimados utilizando-se o software Unit Cell®, através dos valores de hkl dos planos cristalográficos apresentados e seus respectivos ângulos de difração (carta cristalográfica JCPDS#391346).

4.7.2. Espectroscopia na região do infravermelho

As análises por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) foram realizadas no espectrofotômetro Perkin Elmer modelo Spectrum 400, na região de 4000 a 400 cm^{-1} , resolução de 2 cm^{-1} , realizando-se 16 varreduras. As amostras foram pulverizadas em almofariz de ágata, juntamente com brometo de potássio previamente seco. Em seguida, o material foi prensado e as leituras foram realizadas com as pastilhas obtidas. Esta técnica permitiu obter informações qualitativas sobre a composição das amostras.

4.7.3. Teor de ferro

O teor de ferro dos fluidos magnéticos constituídos de maghemita/aminoácido foi determinado pelo método espectrofotométrico da orto-fenantrolina (TSAI et al., 2010). Uma curva de calibração foi preparada partir de soluções de íons Fe^{2+} e a absorbância de cada solução em 515 nm foi medida em um espectrofotômetro da marca BIOSPECTRO, modelo SP-220. As amostras, constituídas de óxido de ferro foram dissolvidas em HCl concentrado (37%) e todo o ferro em solução reduzido com uma solução de hidroxilamina. A absorbância das amostras foi medida em 515 nm e o teor de ferro nas dispersões foi calculado a partir de uma curva de calibração.

4.7.4. Medidas de raio hidrodinâmico e potencial Zeta

As medidas de raio hidrodinâmico e potencial Zeta dos fluidos magnéticos obtidos foram realizadas no equipamento Zetasizer Nano-ZS, modelo ZEN3600 da marca Malvern. O raio hidrodinâmico das nanopartículas foi calculado por meio da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), que é capaz de calcular o coeficiente de difusão relacionado ao movimento browniano de nanopartículas dispersas em um meio líquido. Irradiando-se a amostra com um laser ($\lambda = 532 \text{ nm}$), as nanopartículas irão espalhar a luz (Espalhamento Rayleigh). Devido ao movimento browniano, a distância entre as nanopartículas (centros espalhadores) varia em função do tempo, provocando interferências construtivas e destrutivas na intensidade da luz espalhada. Essas flutuações na intensidade de luz espalhada estão relacionadas com a velocidade na qual estes centros espalhadores se movem (coeficiente de difusão translacional), que é inversamente proporcional ao seu tamanho, segundo a equação de Stokes-Einstein (SHAW, 1975):

$$D_h = \frac{K_B T}{3\pi\eta D_t} \quad \text{Equação 4.2}$$

Na qual,

D_h é o diâmetro hidrodinâmico;

D_t é o coeficiente de difusão translacional;

K_B é a constant de Boltzmann;

T é a temperatura;

η é a viscosidade dinâmica.

O potencial zeta dos fluidos magnéticos foi medido através da técnica de Espalhamento Eletroforético de Luz (ELS), no mesmo equipamento. A dispersão é injetada em uma célula que contém dois eletrodos, então um campo elétrico é aplicado aos eletrodos e as partículas que possuem carga líquida migram em direção ao eletrodo de carga oposta com uma velocidade, conhecida como mobilidade, que está relacionada ao seu potencial zeta (MALVERN, 2005).

4.7.5. Análise Termogravimétrica (TG)

Análise Termogravimétrica (TG) é uma técnica que monitora a variação de massa de uma amostra em função da temperatura ou tempo de aquecimento, em uma

atmosfera controlada. Tal técnica permite analisar as perdas e ganhos de massa das amostras em uma determinada temperatura. As curvas termogravimétricas foram obtidas em um sistema de análise térmica diferencial e termogravimétrica Shimadzu, modelo DTG-60H. As amostras sólidas foram analisadas em cadinho de alumina, da temperatura ambiente até 800° C, a uma razão de aquecimento de 10°C/min e sob fluxo de ar sintético de 50 mL/min.

4.7.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

Na microscopia eletrônica de transmissão, um feixe de elétrons é incidido sobre uma amostra ultrafina, sofrendo fenômenos de transmissão, espalhamento ou difração ao interagir com a amostra, sendo os elétrons transmitidos coletados em uma tela fluorescente (ou câmera CCD), formando imagens contendo informações a respeito das variações de densidade eletrônica na amostra analisada (WILLIAMS; CARTER, 2009).

As nanopartículas maghemita/aminoácido foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), utilizando o microscópio eletrônico JEOL, JEM-2100 equipado com EDS, Thermo Scientific, operando a 200 kV. Através desta técnica, foi possível determinar o diâmetro médio das nanopartículas e o índice de polidispersão do diâmetro, bem como a morfologia das mesmas.

O diâmetro das nanopartículas foi mensurado através das micrografias no software ImageJ® e o histograma de tamanho (contagem de mais de 200 nanopartículas por amostra, com ajuste da curva em LogNormal) foi obtido no software Origin®8.0 Professional.

Alíquotas dos fluidos magnéticos analisados por MET foram diluídos em água com auxílio de um banho de ultrassom e então a suspensão foi depositada sobre uma placa de cobre e filme de carbono da marca Electron Microscopy Sciences (modelo FCF400-Cu).

A amostra NPHis1A, como apresentou nanopartículas com morfologia não-esférica, também foi caracterizada por EDS para verificar a constituição elementar dessas nanopartículas.

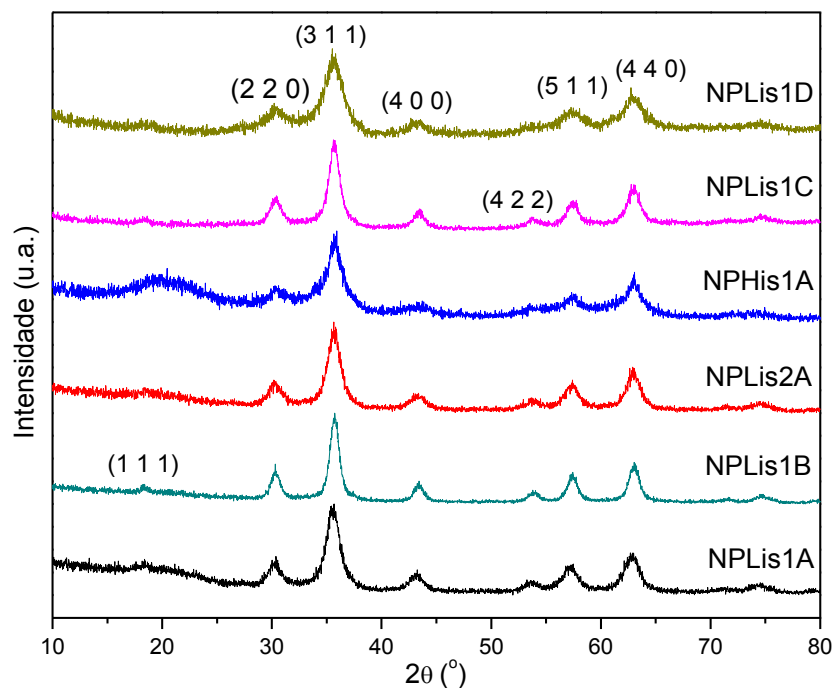
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização das nanopartículas maghemita/aminoácido quanto à cristalinidade e composição

Um sólido cristalino apresenta um conjunto de espaçamentos interplanares que resulta em um padrão de difração de raios X, que permite identificar as fases cristalinas do sólido (CULLITY, 1978). Através de bancos de dados existentes, pode-se comparar os picos de difração da amostra analisada com os padrões de difração contidos nos mesmos.

Os sólidos NPLis1A, NPLis1B, NPLis1C, NPLis1D, NPLis2A e NPHis1A foram caracterizados por difração de raios X (Figura 5.1) para verificação da fase cristalina e determinação do diâmetro do cristalito e parâmetro de rede. Os resultados obtidos por tal técnica foram comparados em função dos métodos de obtenção e funcionalização das nanopartículas.

Figura 5.1 - Difratogramas de raios X dos sólidos NPLis1A, NPLis1B, NPLis1C, NPLis1D, NPLis2A e NPHis1A.



Observa-se que a amostra NPLis1B, funcionalizada com o aminoácido posteriormente à precipitação do óxido de ferro, apresentou picos menos alargados, correspondendo a um maior diâmetro médio de cristalitos. A amostra NPHis1A, que foi precipitada na presença de DL-Histidina, apresentou maior alargamento dos picos quando comparada às outras amostras.

Observa-se em todos os casos que o padrão de planos de difração hkl é típico da estrutura cúbica do tipo espinélio inverso, sendo este o padrão de reflexão observado nos óxidos de ferro magnetita e maghemita (cartas cristalográficas JCPDS#190629 e JCPDS#391346, respectivamente).

A Tabela 5.1 apresenta os valores de parâmetro de rede dos sólidos, calculados a partir dos ângulos de difração dos planos (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2) e (4 4 0) com auxílio do software UnitCell®, além do diâmetro médio dos cristalitos, calculado pela equação de Scherrer (CULLITY, 1978) a partir do ângulo de difração do pico de maior intensidade, que corresponde ao plano cristalino (311), e sua respectiva largura a meia altura (FWHM).

Tabela 5.1 - Parâmetro de rede e diâmetro médio dos cristalitos dos sólidos obtidos.

Sólido	NPLis1A	NPHis1A	NPLis2A	NPLis1B	NPLis1C	NPLis1D
Parâmetro de rede (nm)	0,837	0,834	0,835	0,834	0,834	0,836
Diâmetro médio dos cristalitos (nm)	6,3	5,6	6,4	8,1	7,6	4,5

Todas as amostras apresentaram parâmetro de rede próximo ao relatado na carta cristalográfica JCPDS#391346 para a maghemita, que corresponde a 0,8351 nm.

Observa-se que não houve grande diferença de diâmetro médio entre as amostras NPLis1A e NPLis2A, de forma que o aumento da proporção do monoclórato de L-Lisina na coprecipitação não interferiu no tamanho dos cristalitos formados. Isso pode estar relacionado ao fato de que o aumento em massa de aminoácido utilizado na coprecipitação não gerou um aumento de força iônica no meio capaz de interferir significativamente nos processos de nucleação e crescimento dos cristalitos.

A amostra NPLis1B apresentou diâmetro médio maior do que as amostras NPLis1A e NPLis2A, provavelmente porque, no caso da síntese pelo método A, a L-Lisina se coordena aos íons ferro antes da coprecipitação, delimitando a nucleação e crescimento das nanopartículas (FOSHAY et al., 2004), o que resulta em diâmetros menores. No caso do método C (amostra NPLis1C), no qual o aminoácido foi adicionado rapidamente logo em seguida à adição da base, a nucleação (e parte do crescimento) dos cristalitos foi instantânea, de forma que o diâmetro médio dos cristalitos obtidos foi próximo ao da amostra NPLis1B, porém menor, devido à influência da adição sucessiva do aminoácido interferindo na etapa de crescimento e maturação de Ostwald.

A amostra NPLis1D, obtida da coprecipitação com hidróxido de sódio (NaOH), apresentou diâmetro médio de cristalito bem menor que todas as amostras, devido à maior força iônica do meio como decorrência do emprego de hidróxido de sódio ao invés de hidróxido de amônio (NH₄OH). Devido à magnetização ser inversamente proporcional ao diâmetro do cristalito (GUBIN, 2009), tal amostra não seria do ponto de vista magnético interessante para o uso em magnetofecção.

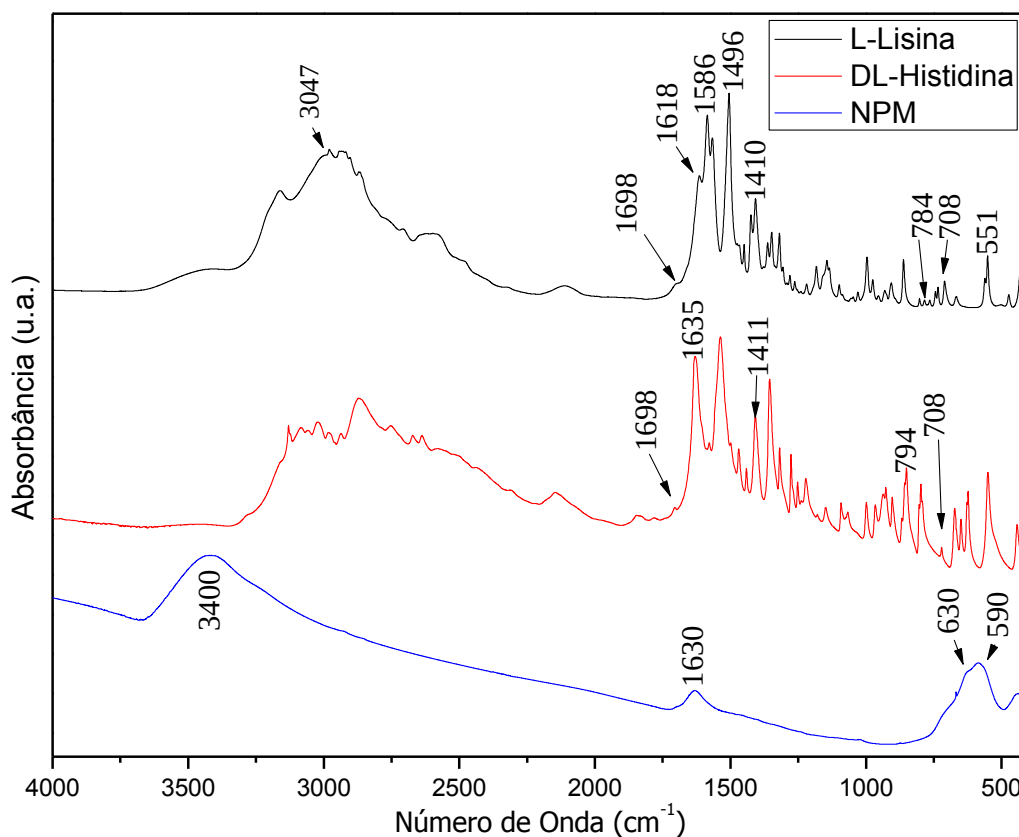
Segundo Bee e colaboradores (1995), íons orgânicos como o carboxilato são responsáveis por afetar a formação de óxidos e oxihidróxidos por dois processos: formação de quelato com íons metálicos que restringe a nucleação e, a adsorção desses íons orgânicos no núcleo formado que também restringe a etapa de crescimento. Bee e colaboradores (1995) investigaram a variação de tamanho das nanopartículas de maghemita obtidas por coprecipitação de íons ferro na presença de diferentes quantidades de citrato através da técnica de Difração de Raios X e concluíram que, à medida que se aumenta a quantidade de íons citrato na solução, menor é o tamanho médio de partícula, como decorrência da restrição da etapa de crescimento dos núcleos.

Por outro lado, Ishikawa e colaboradores (1993), ao investigar a formação de β -FeOOH na presença de EDTA, observaram que o tamanho das nanopartículas aumenta com o aumento da quantidade de EDTA em solução, devido à formação de um menor número de núcleos, favorecendo o crescimento desses.

A eficiência do processo de funcionalização das nanopartículas com aminoácido (para os quatro métodos) foi evidenciada pela presença das bandas do aminoácido nos espectros dos sólidos funcionalizados.

Na Figura 5.2 são apresentados os espectros dos aminoácidos utilizados na síntese, DL-Histidina e monoclóridato de L-Lisina, bem como das nanopartículas de maghemita não funcionalizada (NPM).

Figura 5.2 - Espectros de infravermelho do monoclóridato de L-Lisina, DL-Histidina e nanopartículas de maghemita (NPM).



O espectro das nanopartículas de maghemita (NPM) apresentou as seguintes bandas principais: uma banda larga em torno de 3400 cm^{-1} relativa ao estiramento O-H de grupos OH ligados à superfície das nanopartículas e à água adsorvida, uma banda em 1630 cm^{-1} referente à deformação angular H-O-H indicando também a presença de água adsorvida/coordenada na superfície e uma banda com picos máximos em 590 cm^{-1} e 630 cm^{-1} característica do estiramento da ligação Fe-O (NAMDURI; NASRAZADANI, 2008).

Apesar dos espectros da magnetita e da maghemita no infravermelho médio, ambos apresentarem bandas de estiramento Fe-O em uma região muito próxima, algumas diferenças já foram relatadas entre tais espectros: no caso da magnetita, a

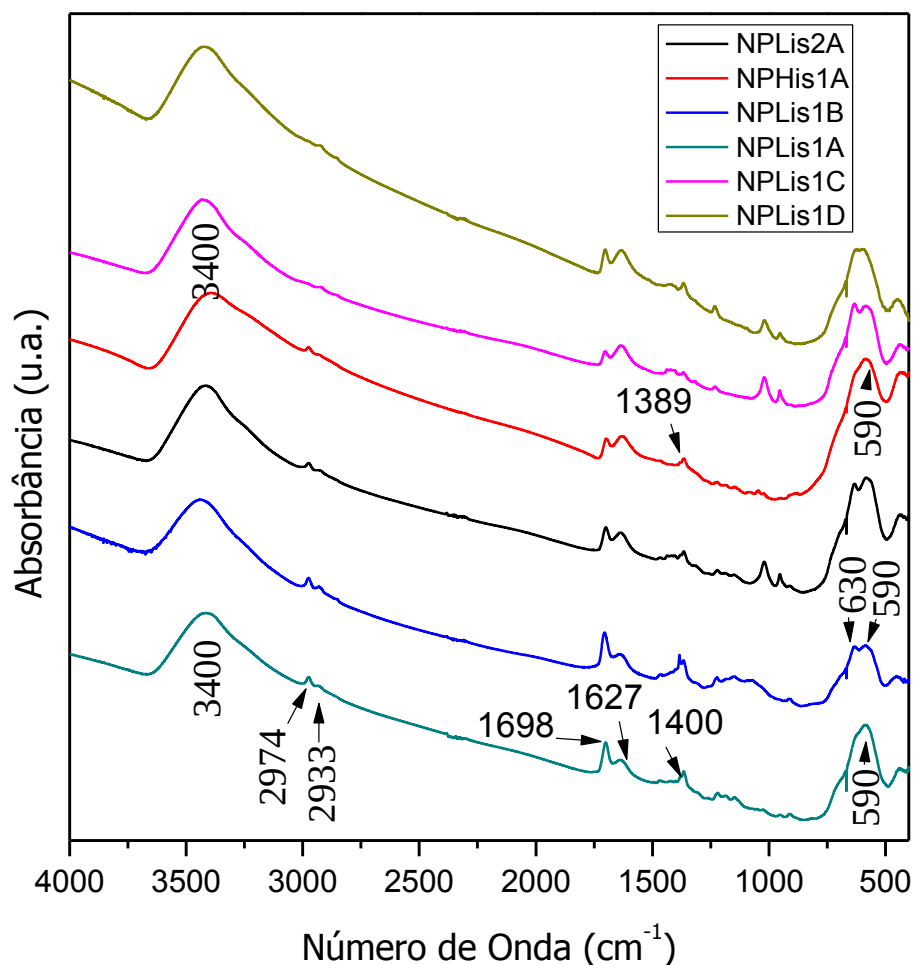
banda referente ao Fe-O é centrada em 570 cm^{-1} , possuindo apenas um pico máximo de absorção, enquanto que, a banda de estiramento Fe-O para a maghemita apresenta dois picos máximos, um em 590 cm^{-1} e outro em 630 cm^{-1} (NAMDURI; NASRAZADANI, 2008; ISHII; NAKAHIRA, 1972).

O espectro do monocloridrato de L-Lisina evidenciou as seguintes bandas principais: em 3047 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação N-H, sobreposta às bandas relativas ao estiramento C-H; em 1698 cm^{-1} devido ao estiramento C=O; em 1410 cm^{-1} e 1618 cm^{-1} relativas aos estiramentos simétrico e assimétrico do grupo carboxilato ($-\text{COO}^-$), respectivamente; em 784 cm^{-1} , 708 cm^{-1} e 551 cm^{-1} associadas às vibrações de deformação angular do grupo carboxilato; em 1496 cm^{-1} e 1586 cm^{-1} relativas às vibrações de deformação simétrica e assimétrica do grupo $-\text{NH}_3^+$, respectivamente (DURMUS et al., 2009; AYDIN et al., 2011).

Por sua vez, o espectro da DL-Histidina apresentou bandas em 1411 cm^{-1} e 1635 cm^{-1} referentes aos estiramentos simétrico e assimétrico do carboxilato ($-\text{COO}^-$), respectivamente; em 1698 cm^{-1} devido ao estiramento C=O e em 794 e 708 cm^{-1} devido à deformação do carboxilato (ÜNAL et al., 2010, PETROSYAN, 2007).

A Figura 5.3 apresenta os espectros de infravermelho (FTIR) dos sólidos de maghemita/aminoácido obtidos:

Figura 5.3 - Espectros de infravermelho (FTIR) dos sólidos NPLis1A, NPLis1B, NPLis1C, NPLis1D, NPLis2A e NPHis1A.



É conhecido que ao se funcionalizar nanopartículas de óxido metálico com aminoácidos (ou outros tipos de moléculas), as frequências vibracionais dessas moléculas sofrem alterações de acordo com o íon metálico ligado ao aminoácido e ao tipo de ligação/interação (KIRWAN et al., 2003).

Os espectros dos sólidos NPLis1A, NPLis2A, NPLis1B, NPLis1C, NPLis1D e NPHis1A apresentaram as seguintes principais bandas: estiramento da ligação Fe-O em 590 cm^{-1} e 630 cm^{-1} ; deformação angular H-O-H em 1627 cm^{-1} , estiramento O-H em 3400 cm^{-1} ; estiramento -CH₂ assimétrico e simétrico em 2974 cm^{-1} e 2933 cm^{-1} , respectivamente; estiramento C=O em 1698 cm^{-1} ; além da banda característica do estiramento simétrico do carboxilato (-COO⁻) em 1400 cm^{-1} para as nanopartículas funcionalizadas com L-Lisina e em 1389 cm^{-1} para as nanopartículas funcionalizadas

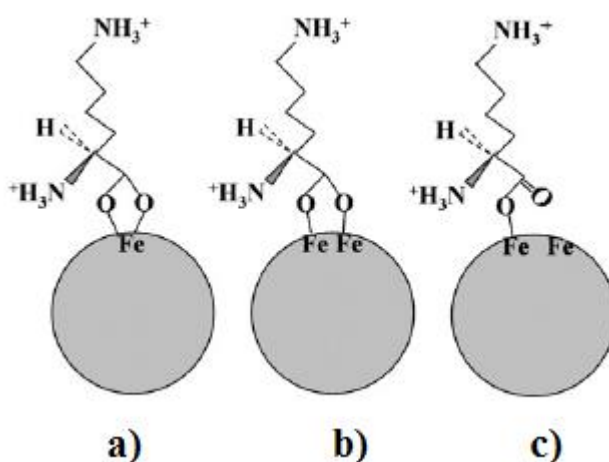
com DL-Histidina (DURMUS et al., 2009; ÜNAL et al., 2010, AYDIN et al., 2011; PETROSYAN, 2007).

Para os sólidos obtidos, a banda referente ao estiramento assimétrico do grupo carboxilato (que para a L-Lisina apresentou-se em 1618 cm^{-1} e para a DL-Histidina em 1635 cm^{-1}) não foi evidenciada, possivelmente devido à sobreposição da banda característica à deformação angular H-O-H em 1627 cm^{-1} .

O tipo de interação entre as nanopartículas e o grupo carboxilato do aminoácido pode ser determinado baseando-se na presença da banda referente ao estiramento C=O (para a interação do tipo monodentada) e na diferença do número de onda do estiramento assimétrico e simétrico do carboxilato ($\Delta\nu = \nu_{\text{assimétrico}} - \nu_{\text{simétrico}}$) quando comparado ao espectro na região de infravermelho do aminoácido livre, já que estas bandas sofrem deslocamentos ao se coordenar com o metal na superfície da nanopartícula (KIRWAN et al., 2003; NARA et al., 1996).

Park e colaboradores (2009), baseados em trabalhos utilizando técnicas espectroscópicas para estabelecer a relação entre as frequências do estiramento do carboxilato em complexos metal-carboxilato e o tipo de coordenação entre eles (MENDIVE et al., 2006; DUCKWORTH; MARTIN, 2001), afirmaram que os aminoácidos podem se ligar à superfície das nanopartículas de óxido de ferro através de uma complexação bidentada (a), bidentada em ponte (b) ou monodentada (c).

Figura 5.4 – Tipos de interação entre a Lisina e nanopartículas de óxido de ferro: a) bidentada; b) bidentada em ponte; c) monodentada.



Fonte – Adaptada de Park e colaboradores (2009)

Além das interações citadas por Park e colaboradores, também é possível que as nanopartículas e o aminoácido estabeleçam interações eletrostáticas. Como a lisina e a histidina possuem tanto grupos catiônicos como aniônicos, estas podem interagir eletrostaticamente com nanopartículas com carga superficial positiva bem como com aquelas com carga superficial negativa. No caso da maghemita, a carga superficial irá depender do pH da suspensão em que estas nanopartículas se encontram, já que o óxido de ferro é anfótero.

Observa-se que, nos espectros nanopartícula/aminoácido, a banda de estiramento simétrico do carboxilato ($-\text{COO}^-$) deslocou-se para menores números de onda, sendo este um indicativo de uma interação do tipo monodentada (KIRWAN et al., 2003). Porém, devido à sobreposição da banda de água (deformação H-O-H) sobre a de estiramento assimétrico do carboxilato, não se pode afirmar que haja um tipo de interação preferencial (monodentada, bidentada ou iônica) entre a superfície da nanopartícula e o aminoácido, sendo apenas evidenciada a presença do aminoácido na superfície da mesma.

O teor de ferro dos fluidos magnéticos foi determinado espectrofotometricamente pelo método da orto-fenantrolina. Neste método, o ferro (III) presente na amostra é todo reduzido à Fe^{2+} pelo agente redutor cloridrato de hidroxilamina, para então se complexar à orto-fenantrolina, formando um complexo de cor alaranjada. O teor de ferro de cada fluido magnético é mostrado na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Teor de ferro total (g.L^{-1}) dos fluidos magnéticos.

Teor de Ferro (g.L^{-1})	
NPLis1A	0,78
NPHis1A	0,99
NPLis2A	2,04
NPLis1B	1,02
NPLis1C	0,25
NPLis1D	2,70

Considerando a massa total de ferro utilizada na síntese das nanopartículas, teríamos uma suspensão coloidal com $13,40 \text{ g.L}^{-1}$ caso o rendimento de síntese e

suspensão das nanopartículas obtivesse 100 % de rendimento. Observa-se então, que todas as suspensões coloidais obtiveram rendimento baixo devido às perdas de nanopartículas não-estáveis em suspensão, sobretudo durante o processo de sedimentação magnética e centrifugação.

O teor de ferro (diretamente relacionado ao teor de nanopartículas) do fluido magnético a ser usado em aplicações biomédicas de carregamento de biomoléculas ou drogas, não só delimita a quantidade de moléculas a serem carregadas (KIEVIT et al., 2009), como também pode interferir na biocompatibilidade do fluido (MA et al., 2008).

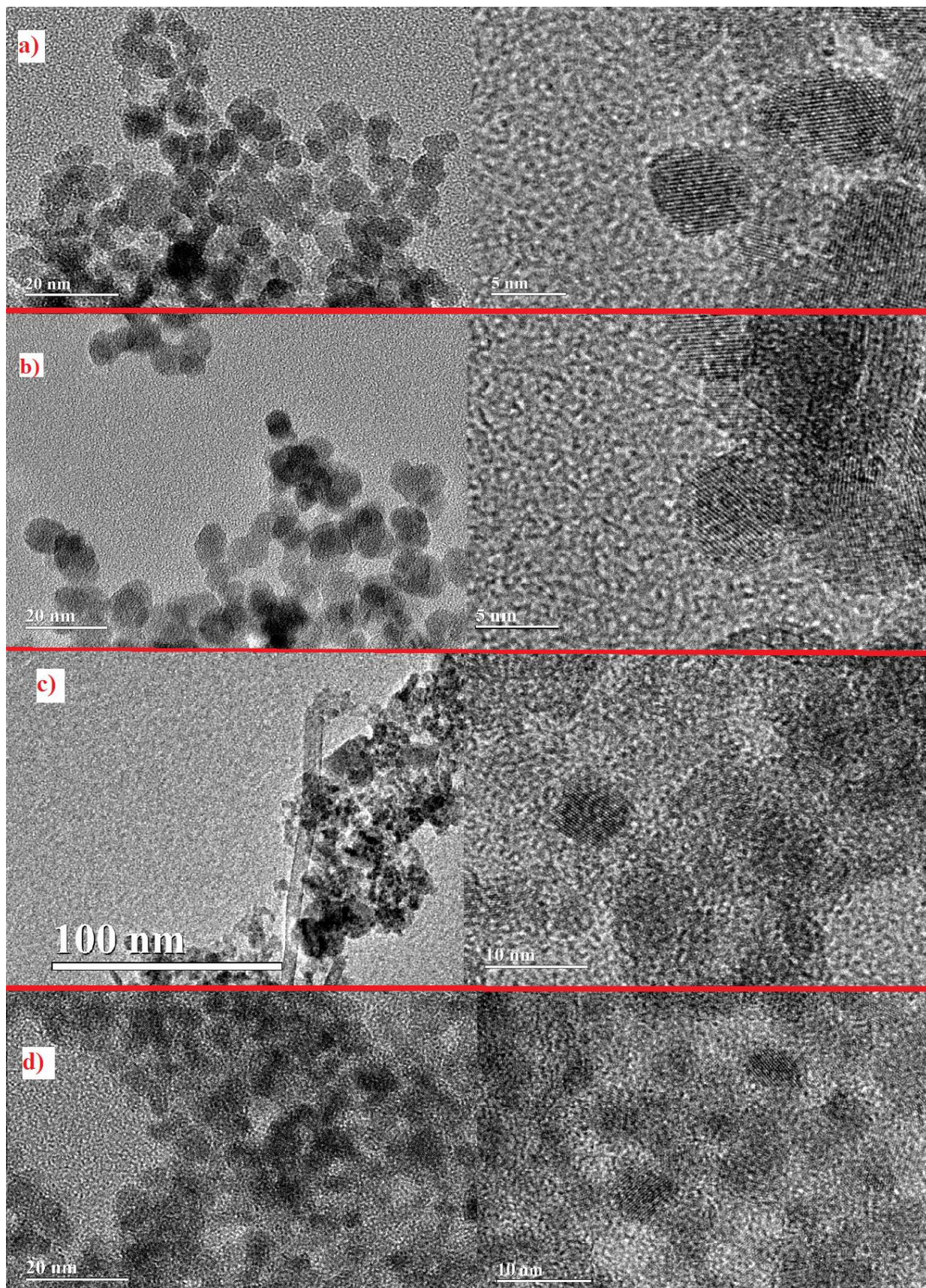
Ma e colaboradores (2008) demonstraram que, ao administrar fluidos magnéticos com teor de ferro de 2,08 a 5,74 g.L⁻¹ em uma suspensão de glóbulos vermelhos (eritrócitos) de coelhos, aqueles com maior teor de ferro apresentaram maiores taxas de rompimento da membrana plasmática (hemólise).

Fluidos magnéticos utilizados em aplicações biomédicas normalmente apresentam teores de ferro menores que aqueles destinados a outras aplicações. Na literatura, há relatos de trabalhos de obtenção de fluidos magnéticos constituídos de maghemita funcionalizada, com diferentes teores de ferro: 0,015 g.L⁻¹ (STEITZ et al., 2007), 0,15 g.L⁻¹ (PERLSTEIN et al., 2008), 4,42 g.L⁻¹ (MORNET et al., 2005) 8,44 g.L⁻¹ (TSAI et al., 2012), 10 g.L⁻¹ (TSAI et al., 2010), 11 g.L⁻¹ (BAUTISTA et al., 2005).

5.2.Caracterização morfológica das nanopartículas maghemita/aminoácido

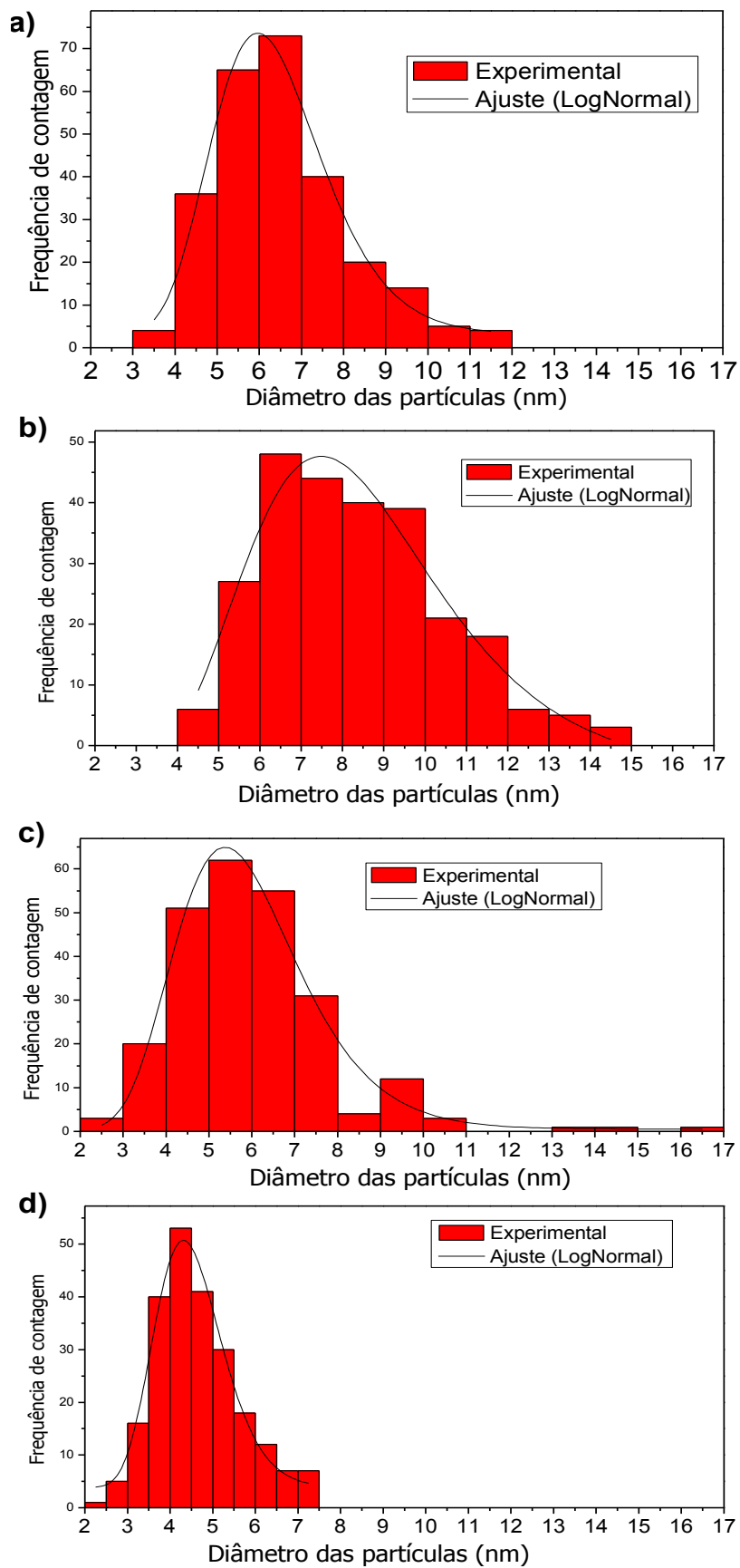
As nanopartículas magnéticas de maghemita funcionalizada com aminoácido foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão. Observa-se nas micrografias (Figura 5.5) das amostras constituídas de maghemita/L-Lisina (NPLis1A, NPLis1B e NPLis1D) que as nanopartículas obtidas apresentaram morfologia esférica. Já na amostra NPHis1A, constituída de maghemita/DL-Histidina, apesar da maior parte de nanopartículas apresentarem morfologia esférica, houve também a formação de nanopartículas com formato de bastões/agulhas, bem como nanopartículas maiores e de morfologia não-esférica.

Figura 5.5 – Micrografias das amostras: a) NPLis1A; b) NPLis1B; c) NPHis1A e d) NPLis1D.



Os histogramas de tamanho das nanopartículas para as quatro amostras (Figura 5.6) foram obtidos através das micrografias. As amostras maghemita/L-Lisina apresentaram comportamento monomodal, tendo a amostra NPLis1D apresentado uma distribuição de tamanho mais estreita. A amostra NPHis1A apresentou uma distribuição de tamanho mais larga, havendo nanopartículas com diâmetros maiores que 15 nm.

Figura 5.6 – Histograma de tamanho das nanopartículas das amostras: a) NPLis1A; b) NPLis1B; c) NPHis1A e d) NPLis1D.



A Tabela 5.3 mostra o diâmetro médio das nanopartículas e o índice de polidispersão obtidos da curva de ajuste em LogNormal dos histogramas. As amostras NPLis1A e NPLis1D, obtidas pela coprecipitação de íons ferro na presença do aminoácido, apresentaram os menores índices de polidispersão (Tabela 5.3). A amostra NPHis1A apresentou um índice de polidispersão superior a estas duas amostras (também obtidas pela coprecipitação das nanopartículas na presença do aminoácido) devido à formação de nanopartículas maiores e de diferentes morfologias.

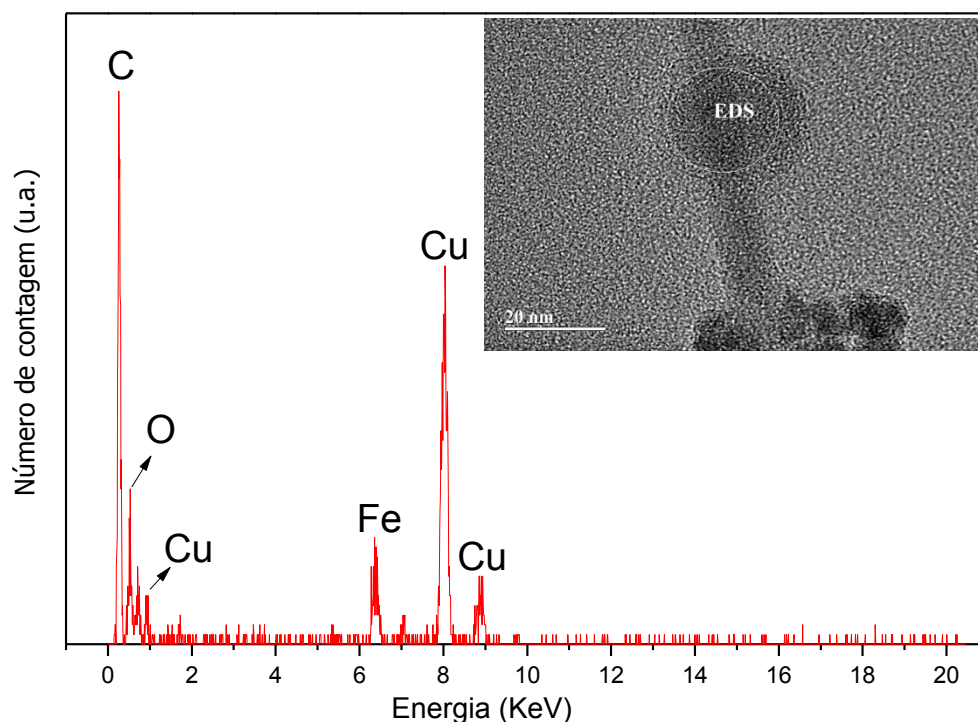
A amostra NPLis1B, obtida pela coprecipitação dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} e posterior funcionalização com aminoácido, apresentou o maior índice de polidispersão devido à ausência de aminoácido, capaz de coordenar aos íons ferro durante a coprecipitação e favorecer um crescimento de cristais mais homogêneo.

Tabela 5.3 – Diâmetro médio das nanopartículas e índice de polidispersão

	Diâmetro médio das nanopartículas (nm)	Índice de Polidispersão
NPLis1A	6,3	0,21
NPLis1B	8,2	0,31
NPHis1A	5,7	0,26
NPLis1D	4,4	0,18

A amostra NPHis1A foi analisada por EDS para verificar a constituição elementar da mesma. A região da tela de microscopia selecionada para ser analisada por EDS continha uma nanopartícula em formato de bastão/agulha (Figura 5.7). O espectro de EDS evidenciou transições eletrônicas características dos elementos constituintes da tela de microscopia, como em 0,273 keV característica da transição K_{α} do carbono (C), em 0,950 keV, 8,045 keV e 8,904 keV características das transições $L_{\beta 1}$, $K_{\alpha 1}$, e $K_{\beta 1}$ do cobre (Cu), respectivamente, bem como dos elementos constituintes da nanopartícula, como em 0,535 keV característica da transição K_{α} do oxigênio (O) e em 6,382 keV característica da transição K_{α} do ferro (Fe), evidenciando que o sólido em formato de agulha/bastão também é constituído de óxido de ferro.

Figura 5.7 – Espectro de energia dispersiva de raios X de uma região em bastão da amostra NPHis1A.



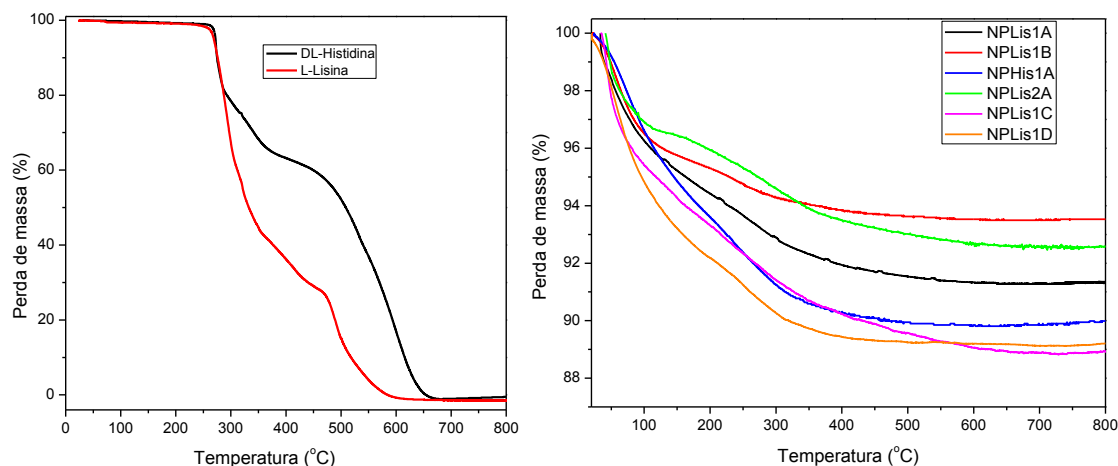
Na literatura, é possível encontrar trabalhos nos quais nanopartículas de óxido de ferro são obtidas em diferentes morfologias, já que, tal característica do cristal é fortemente influenciada pelas condições de síntese. Em alguns trabalhos, também são encontradas metodologias capazes de gerar mais de uma morfologia para a mesma síntese (MATIJEVIC et al., 1987). Variação de solvente, temperatura, sal de ferro precursor, presença de dopantes ou impurezas e presença de moléculas coordenantes são algumas das variáveis capazes de gerar diferentes morfologias nas nanopartículas obtidas (MAABONG et al., 2016; SAGHI et al., 2011; SAYED et al., 2015).

5.3. Análise termogravimétrica das nanopartículas maghemita/aminoácido

A análise termogravimétrica (TG) foi utilizada neste trabalho para verificar a presença do aminoácido na superfície da nanopartícula através da quantificação das perdas de massa referentes à decomposição do aminoácido na superfície da nanopartícula e assim estimar a quantidade de moléculas dos aminoácidos L-Lisina e DL-Histidina por unidade de área superficial.

Os sólidos NPLis1A, NPLis2A, NPLis1B, NPLis1C, NPLis1D e NPHis1A foram caracterizados por análise termogravimétrica (TG), bem como os aminoácidos DL-Histidina e monoclóridrato de L-Lisina (Figura 5.8).

Figura 5.8 - Curvas termogravimétricas a) Aminoácidos DL-Histidina e monoclóridrato de L-Lisina b) Sólidos NPLis1A, NPLis2A, NPLis1B, NPLis1C, NPLis1D e NPHis1A.



As curvas termogravimétricas da DL-Histidina e do monoclóridrato de L-Lisina evidenciam estabilidade térmica dessas moléculas até aproximadamente 250° C. Ambas apresentam dois eventos de decomposição térmica, um se iniciando a 250° C e outro acima de 420° C (AYDIN et al., 2011; DURMUS et al., 2009; ÜNAL et al., 2010).

Segundo Durmus e colaboradores (2009) e Ünal e colaboradores (2010), a decomposição da L-Lisina ou da DL-Histidina sobre as nanopartículas de maghemita inicia em temperatura bem inferior àquela observada para os aminoácidos puros. No caso dos aminoácidos sobre as nanopartículas, esta decomposição térmica iniciaria a 140° C, devido ao comportamento catalítico do óxido de ferro na decomposição do aminoácido.

Considera-se então que, para as curvas termogravimétricas das nanopartículas funcionalizadas com aminoácidos, a perda de massa inferior a 140° C é referente à perda de moléculas de água adsorvidas na superfície das nanopartículas, enquanto que a perda de massa superior a esta temperatura é referente à decomposição térmica do aminoácido.

Os termogramas dos aminoácidos DL-Histidina e L-Lisina puros apresentaram 100 % de perda total de massa, não havendo formação de resíduo. Desta forma, considerando que a decomposição dos aminoácidos nas amostras maghemita/aminoácido é também completa, foi possível calcular o coeficiente de recobrimento das nanopartículas em termos de número médio de moléculas de aminoácido por unidade de área da superfície das nanopartículas, considerando-se que essas são esféricas.

As curvas termogravimétricas das nanopartículas funcionalizadas apresentaram um perfil semelhante ao da decomposição dos aminoácidos. Porém, a amostra NPLis2A apresentou uma decomposição mais lenta entre 110 a 350° C, podendo indicar uma interação diferente nanopartícula-aminoácido quando comparada às outras amostras.

O coeficiente de recobrimento das nanopartículas (Tabela 5.4) foi estimado a partir dos valores de perda de massa obtidos das curvas de TG e dos diâmetros médios dos cristalitos obtidos por DRX. Considerou-se que a perda de massa inferior a 140° C seria referente à água adsorvida na amostra e que, acima desta temperatura seria referente à decomposição total do aminoácido, sendo o resíduo constituído apenas de óxido de ferro ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

Assim, o coeficiente de recobrimento foi calculado de acordo com as Equações 5.1 e 5.2 abaixo:

$$\frac{N_{\text{aminoác.}}}{N_{\text{NP}}} = \frac{(P_{>140^\circ\text{C}} / MM_{\text{aminoác.}})}{(R / M_{\text{NP}})} \quad \text{Equação 5.1}$$

$N_{\text{aminoác.}}$ = número de moléculas de aminoácido

N_{NP} = número de nanopartículas calculado

$P_{>140^\circ\text{C}}$ = perda de massa obtida pelo TG acima de 140° C.

$MM_{\text{aminoác.}}$ = massa molar do aminoácido (Lisina ou Histidina)

R = massa do resíduo (sendo todo considerado como Fe_2O_3)

M_{NP} = massa de uma nanopartícula (calculada pela densidade da maghemita e o diâmetro do cristalito obtido por DRX).

$$\xi = \frac{(N_{\text{aminoác.}} / N_{\text{NP}})}{A_{\text{média}}} \quad \text{Equação 5.2}$$

ξ = coeficiente de recobrimento em moléculas de aminoácido por nm^2

$A_{\text{média}}$ = área superficial média de uma nanopartícula (nm^2) calculada

O coeficiente de recobrimento também pode ser calculado pelo diâmetro médio das nanopartículas, obtido pela técnica de MET. Neste trabalho, como apenas algumas amostras foram analisados por MET, decidiu-se utilizar o diâmetro médio dos cristalitos obtidos por DRX para cálculo do coeficiente. Além, como foi apresentado anteriormente, os valores de diâmetro médio do cristalito (DRX) e o diâmetro médio das nanopartículas (MET) das amostras analisadas, apresentaram valores muito próximos, de forma que os valores de coeficiente de recobrimento não apresentariam considerável diferença sendo calculado por um dos dois valores de diâmetro.

Tabela 5.4 - Coeficiente de recobrimento dos sólidos de maghemita/aminoácido.

	Coeficiente de recobrimento (moléculas de aminoácido por nm²)
NPLis1A	1,3
NPHis1A	1,2
NPLis2A	1,2
NPLis1B	1,0
NPLis1C	1,7
NPLis1D	1,1

Não houve grande variação de coeficiente de recobrimento entre as amostras obtidas pelas metodologias A, B e D. As nanopartículas obtidas pela metodologia C apresentaram maior coeficiente de recobrimento.

5.4. Raio hidrodinâmico e potencial zeta dos fluidos magnéticos maghemita/aminoácido

A Tabela 5.5 apresenta os valores de raio hidrodinâmico médio em número, bem como o Índice de Polidispersão (PDI) dos sólidos em suspensão.

Tabela 5.5 - Raio hidrodinâmico (nm) e Índice de Polidispersão (PDI) dos sólidos de maghemita/aminoácido em suspensão.

	Raio Hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão (PDI)
NPLis1A	88	0,24
NPHis1A	70	0,28
NPLis2A	42	0,20
NPLis1B	79	0,30
NPLis1C	132	0,30
NPLis1D	68	0,36

Como as nanopartículas apresentaram raios hidrodinâmicos dezenas de vezes superiores ao diâmetro das nanopartículas evidenciado por MET (ou dos cristalitos, evidenciado por DRX), conclui-se que as nanopartículas encontram-se agregadas na suspensão aquosa.

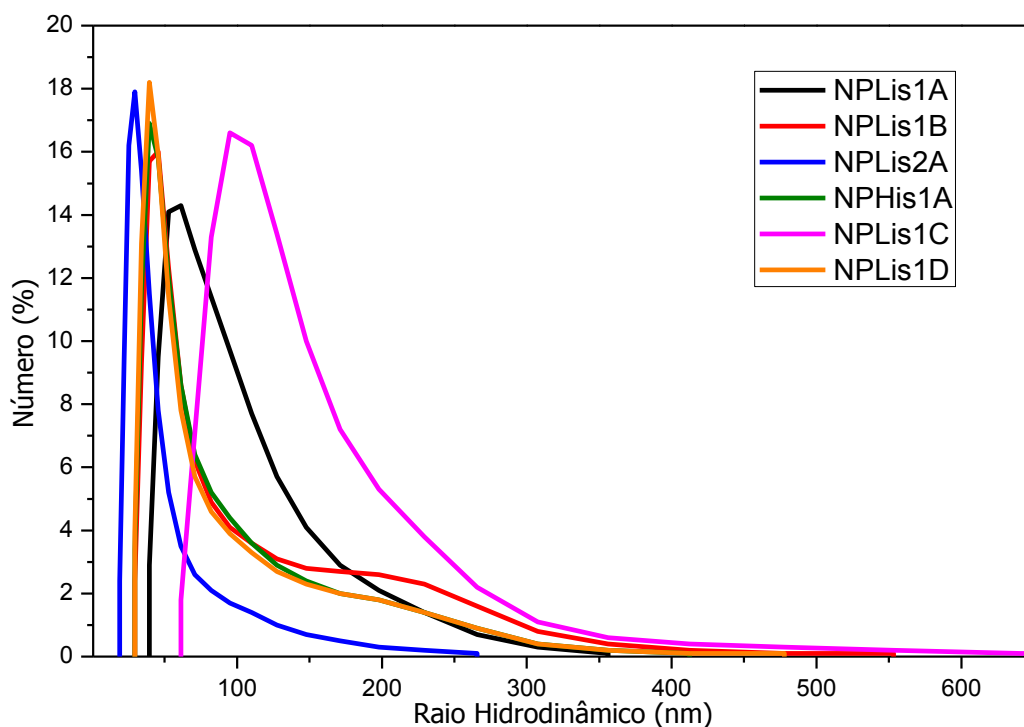
Observa-se que o fluido NPLis2A, obtido pela coprecipitação das nanopartículas na presença de maior quantidade do aminoácido Lisina apresentou raio hidrodinâmico e índice de polidispersão menor do que os de todos os outros fluidos, sugerindo que o aumento da proporção de aminoácido na coprecipitação desfavoreceu a agregação das nanopartículas.

A amostra NPLis1D, apesar de apresentar raio hidrodinâmico semelhante às amostras do método A e B, apresentou PDI maior.

A amostra NPLis1C apresentou o maior raio hidrodinâmico, acima de 100 nm, o que poderia dificultar a endocitose da estrutura pelas células (GUPTA et al., 2005).

A Figura 5.9 apresenta o gráfico de distribuição de raio hidrodinâmico (em número) das nanopartículas.

Figura 5.9 - Distribuição de raio hidrodinâmico dos agregados de nanopartículas suspensas.



Observa-se que as nanopartículas suspensas possuem uma distribuição de raio hidrodinâmico larga. Nas amostras NPLis1C e NPLis1B, é possível ainda observar a presença de um “ombro” no gráfico de distribuição, indicando que uma considerável porcentagem de nanopartículas possui um diâmetro maior que a média.

Durmus e colaboradores (2009), ao sintetizarem nanopartículas magnéticas de maghemita funcionalizada com L-Lisina, pelo método da coprecipitação na presença do aminoácido (similar ao método A), obtiveram uma suspensão coloidal bimodal, na qual 95% das nanopartículas possuíam diâmetro centrado em 330 nm (ou, 115 nm de raio), valor bastante superior à maioria das amostras aqui apresentadas.

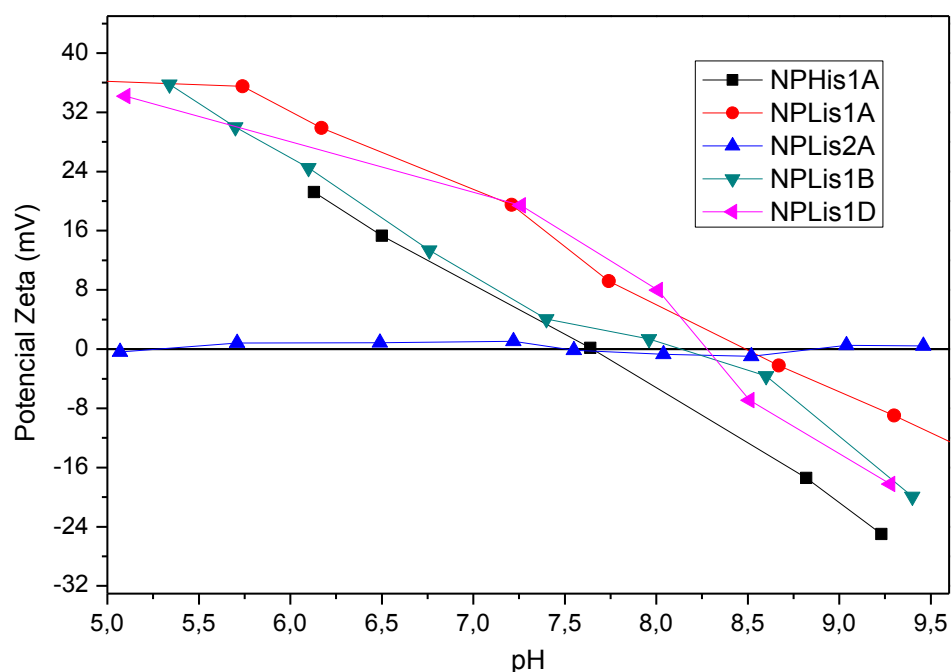
Já Patel e colaboradores (2009), ao coprecipitarem sais de ferro (II) e (III) na presença do aminoácido L-Lisina e dissolvidos em uma solução salina ($0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaCl), obtiveram nanopartículas de maghemita-Lisina dispersas na mesma solução salina com diâmetro hidrodinâmico médio de 88 nm. Observa-se que, neste trabalho de Patel e colaboradores, o aumento de força iônica oriundo da dissolução do aminoácido e dos sais de ferro em solução salina seja responsável pela obtenção de nanopartículas de menor diâmetro, como observado para as amostras NPLis2A

(coprecipitação na presença de maior quantidade de monoclórato de L-Lisina) e NPLis1D (substituição do NH_4OH pelo NaOH na coprecipitação).

Segundo a literatura, o tamanho das nanopartículas afeta drasticamente não só a endocitose das nanoestruturas pelas células, bem como o tempo de meia-vida dessas nanoestruturas no sistema circulatório. Partículas com tamanhos menores do que 10 nm são removidas do sistema circulatório principalmente por depuração renal, enquanto que as partículas maiores do que 200 nm são retidas no baço e fígado, de forma a reduzir a concentração no plasma sanguíneo (BLANCO et al., 2015; WAHAJUDDING, ARORA; 2012).

O ponto isoelétrico (pI) dos fluidos magnéticos foi determinado pela técnica de ELS, a partir de medidas do potencial zeta em função do pH dos fluidos.

Figura 5.10 - Curva de Potencial Zeta em função de pH dos fluidos NPLis1A, NPLis2A, NPLis1B, NPLis1D e NPHis1A.



Os pontos isoelétricos das nanopartículas em suspensão são mostrados na Tabela 5.6:

Tabela 5.6 – Ponto Isoelétrico e Potencial Zeta em pH fisiológico das nanopartículas em suspensão

	NPLis1A	NPLis2A	NPLis1B	NPLis1D	NPHis1A
Ponto Isoelétrico (PI)	8,49	-	8,13	8,28	7,65
Potencial Zeta em pH fisiológico	+ 17,27	-	+ 4,01	+ 15,71	+ 3,21

Os fluidos constituídos de maghemita/L-Lisina apresentaram ponto isoelétrico inferior ao da L-Lisina livre, $pI=9,47$ (LIDE, 1995), enquanto que o pI do fluido NPHis1A está muito próximo ao relatado na literatura para a DL-Histidina livre, $pI = 7,59$ (LIDE, 1995). Isso sugere uma interação mais fraca entre a NP-Histidina quando comparada à interação NP-Lisina.

Os valores de pI e de potencial zeta em pH fisiológico ($pH = 7,4$) das nanopartículas funcionalizadas com aminoácido evidenciam o maior caráter básico da L-Lisina frente a DL-Histidina, favorecendo a utilização das nanopartículas funcionalizadas com L-Lisina para o carreamento de moléculas de DNA ou RNA, já que em pH fisiológico as nanopartículas de maghemita/L-Lisina apresentam um potencial zeta maior que aquelas de maghemita/DL-Histidina, garantindo maior interação eletrostática entre as nanopartículas e as moléculas de DNA/RNA.

Além disso, um maior potencial zeta na mesma faixa de pH indica maior força eletrostática repulsiva entre as partículas, o que contribui para que as partículas não agreguem, garantindo maior estabilidade da suspensão coloidal (MYERS, 1999).

O fluido NPLis2A apresentou variação de potencial zeta em função do pH quase nula, não sendo possível a determinação do ponto isoelétrico. Isto sugere que a interação estabelecida pelas moléculas de L-Lisina e as nanopartículas nesta amostra deve ser diferente da estabelecida entre as outras amostras. Provavelmente, a interação entre aminoácido-nanopartícula para o fluido NPLis2A tenha um caráter mais iônico do que covalente, enquanto que para os outros fluidos a ligação covalente prevaleça. Há também a possibilidade de ocorrer interação eletrostática por pares iônicos em múltiplas camadas, de forma que a nanopartícula de maghemita (que em pH fisiológico, possui carga superficial negativa), interagiria com um grupo $-NH_3^+$ do aminoácido, deixando um grupo carboxilato disponível ($-CO_2^-$), que

poderia estabelecer interação eletrostática com outro grupo -NH_3^+ de outra molécula de aminoácido e assim em diante.

O fluido NPLis2A, além de ter apresentado este comportamento anômalo na curva de potencial zeta em função do pH, também apresentou um comportamento diferente das outras amostras na análise termogravimétrica (TG), como relatado previamente, podendo indicar um caráter mais iônico da interação nanopartícula-aminoácido para esta amostra.

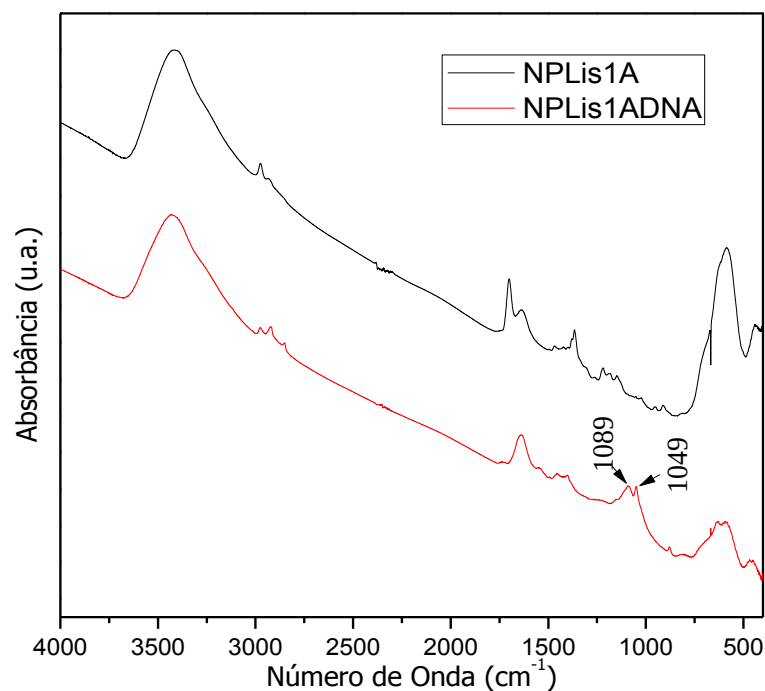
As suspensões de nanopartículas que apresentaram maior potencial zeta em pH fisiológico foram as dos fluidos NPLis1A e NPLis1D.

5.5. Experimentos preliminares de adsorção de DNA de *Humicola grisea* no fluido NPLis1A

O experimento preliminar de adsorção do DNA de *Humicola grisea* no fluido NPLis1A foi realizado para verificar a interação das nanopartículas maghemita/L-Lisina com o DNA e sua capacidade de adsorção.

O sólido NPLis1ADNA, constituído de nanopartículas de maghemita/L-Lisina, contendo DNA adsorvido na superfície, foi caracterizado por FTIR. Nessa amostra, uma quantidade do fluido NPLis1A foi adicionado a uma solução contendo DNA segundo a proporção de 26,5 μg de DNA/mg de maghemita (de acordo com a concentração de DNA da amostra, apresentada na Tabela 5.7, e do teor de ferro do fluido, ambos determinados espectrofotometricamente).

Figura 5.11 - Espectros de infravermelho das amostras NPLis1A e NPLis1ADNA.



A amostra NPLis1ADNA apresentou, além das bandas características do fluido NPLis1A, a banda em 1089 cm^{-1} referente ao estiramento simétrico do grupo fosfato (ARAKAWA et al., 2011), a banda em 1049 cm^{-1} , referente ao estiramento C-O da ligação ribose-fosfato e a banda em 2850 cm^{-1} referente ao estiramento C-H simétrico dos grupos CH_2 dos fragmentos de DNA (ARAKAWA et al., 2011; THEOPHANIDES, 1981), evidenciando a adsorção das moléculas de DNA na superfície das nanopartículas.

As amostras DNAD1 e DNAD1NP (sobrenadante obtido após a sedimentação das nanopartículas) foram caracterizadas no espectrofotômetro Nanodrop 2000, para quantificação, por diferença, da adsorção de DNA na superfície das nanopartículas.

Tabela 5.7 - Concentração de DNA e Razão 260nm/280nm na solução DNAD1 e no sobrenadante (DNAD1NP) após adsorção em NPLis1A.

Amostra	Concentração ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de DNA)	Razão 260nm/280nm
DNAD1	5,9	1,24
DNAD1NP	4,0	1,15

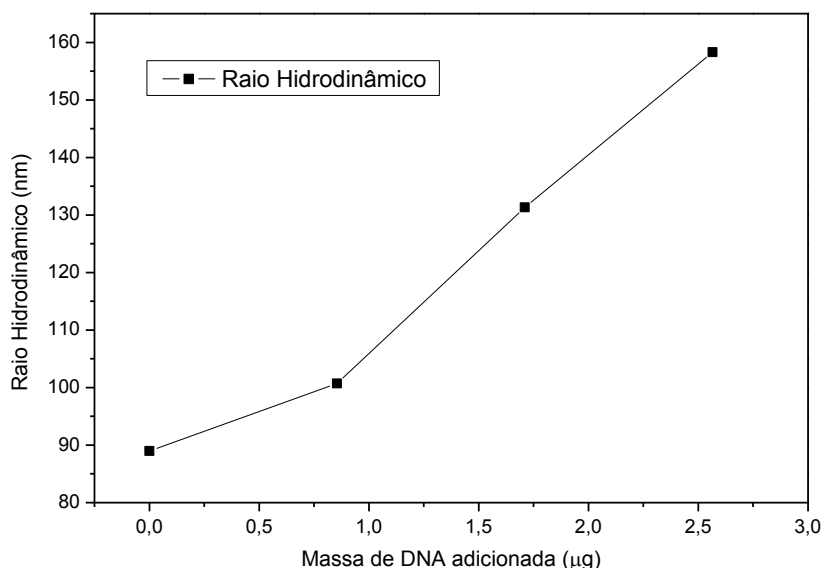
Considerando a diluição de 400 μL na amostra DNAD1 após a adição de 80 μL do fluido NPLis1A, bem como o teor de ferro do fluido NPLis1A e a diferença das concentrações acima, obtidas espectrofotometricamente, pode-se concluir que o fluido magnético NPLis1A foi capaz de adsorver 4,86 μg de DNA/mg de maghemita.

A razão de intensidade 260nm/280nm está relacionada à relação entre a concentração de DNA e proteínas na amostra, de forma que uma amostra com alta pureza de DNA apresenta uma razão igual a 1,8, enquanto que uma amostra com alta pureza de proteínas apresenta uma razão igual a 0,6 (HU et al., 2015; MIN et al., 2014). Observa-se uma redução da razão de intensidade 260nm/280nm da amostra DNAD1NP, que pode estar relacionada ao fato das nanopartículas adsorverem preferencialmente o DNA, de forma que reduz a proporção DNA/proteína.

5.6. Experimentos preliminares de medida de raio hidrodinâmico em função das adições da amostra de DNA

O crescimento do raio hidrodinâmico do fluido NPLis1A após adições sequenciais de 0,855 μg de DNA de *Humicola grisea*, correspondente à 5 μL da solução de DNA 171 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, foi acompanhado pela técnica de DLS (Figura 5.12).

Figura 5.12 - Gráfico do raio hidrodinâmico médio para o fluido NPLis1A em função das adições sucessivas de DNA (171 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$).



O fluido NPLis1A apresentou aumento do raio hidrodinâmico médio à medida em que foi adicionada a solução de DNA. Após adição de 2,565 µg de DNA, as nanopartículas já haviam coagulado, inviabilizando a adição de mais DNA.

Após a adição de 0,855 µg de DNA (5 µL), o raio hidrodinâmico foi igual a 101 nm, raio muito próximo ao limite, segundo a literatura, para que as nanopartículas adentrem na célula através da fagocitose (GUPTA et al., 2005). Assim, determinou-se que para 1 mL de fluido NPLis1A, apenas 5 µL da solução de DNA de *Humícola grísea* (171 ng.µL⁻¹) seriam adicionados ao fluido para o posterior recobrimento com dextrana, obtendo assim uma razão mássica DNA/maghemita de 0,77 µg de DNA/mg de maghemita.

5.7. Experimentos preliminares de recobrimento das nanopartículas maghemita/L-Lisina/DNA com dextrana

O raio hidrodinâmico médio (em número) das nanopartículas maghemita/L-Lisina/DNA após recobrimento com dextrana T10 foi determinado pela técnica de DLS, conforme mostra a tabela abaixo.

Tabela 5.8 - Raio hidrodinâmico médio e Índice de Polidispersão das nanopartículas maghemita/L-Lisina/DNA após recobrimento com dextrana T10.

Amostra	Raio Hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão (PDI)
NPDNAdex01	105	0,30
NPDNAdex02	107	0,35

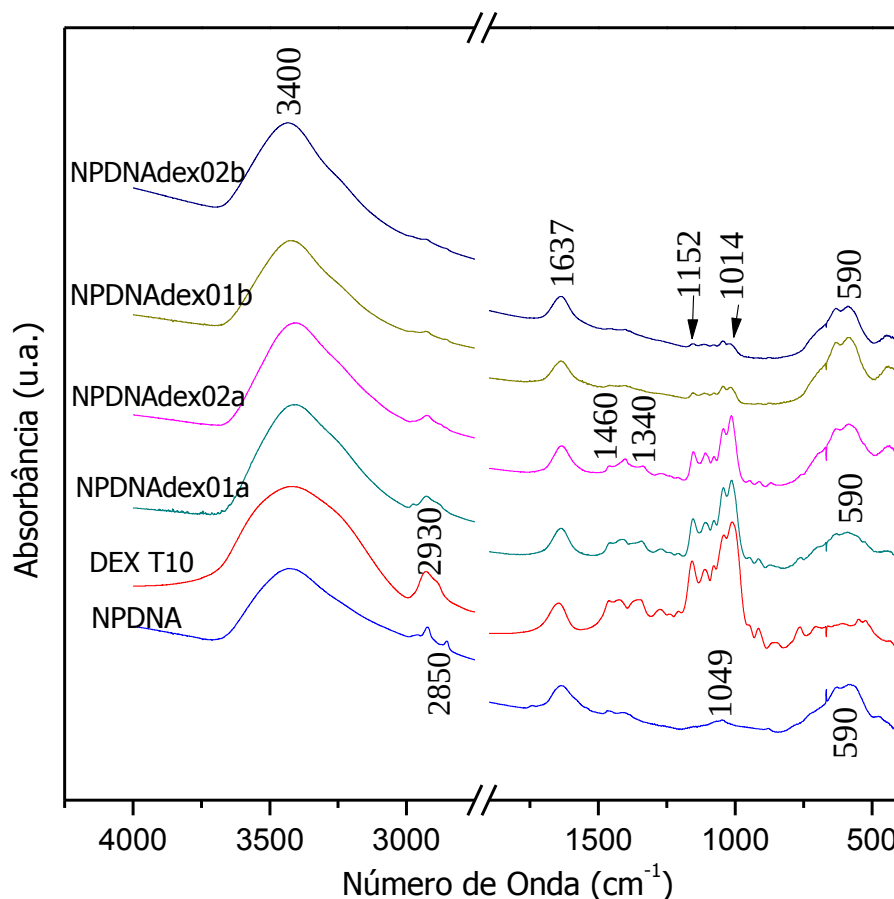
A dextrana é capaz de associar-se à superfície das nanopartículas de maghemita através de interação de van der Waals, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas (HONG et al., 2008), de forma que o raio hidrodinâmico após recobrimento com a dextrana deve aumentar.

O aumento do raio hidrodinâmico médio (em número), quando comparado ao fluido NPLis1A ($R_H = 88$ nm) e ao mesmo fluido após serem adicionados 0,855 µg (5 µL) de DNA (fluido NPDNA, $R_H = 101$ nm), indica que o recobrimento das nanopartículas com dextrana ocorreu nas duas amostras. Ambas apresentaram um PDI superior ao da amostra NPLis1A, evidenciando que a adsorção de DNA e o recobrimento com dextrana T10 favorece a agregação das nanopartículas.

Apesar da grande diferença de quantidade em massa de dextrana adicionada a cada amostra, os raios hidrodinâmicos obtidos para ambas foram semelhantes. Isso indica que, provavelmente, parte da dextrana nas suspensões NPDNA_{dex01} e NPDNA_{dex02} estão interagindo com a superfície das nanopartículas e, parte da dextrana, está apenas dissolvida no meio líquido. Assim, justifica-se para os experimentos de recobrimento do sistema maghemita/plasmídeo, a utilização da menor quantidade em massa de dextrana (ou maior proporção maghemita/dextrana).

As amostras NPDNA_{dex01a} e NPDNA_{dex02a} foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho (FTIR), bem como as amostras NPDNA_{dex01b} e NPDNA_{dex02b}, oriundas do fracionamento das amostras, como descrito na parte experimental. A amostra NPDNA (1 mL NPLis1A + 5µL DNA), precursora das amostras acima citadas, bem como a dextrana T10 (DEX T10) utilizada para recobrimento das nanopartículas, também foram caracterizadas por FTIR. Os espectros são mostrados na Figura 5.13.

Figura 5.13 - Espectros de infravermelho das amostras dextrana T10 (DEX T10), NPDNA, NPDNA_{dex01a}, NPDNA_{dex02a}, NPDNA_{dex01b}, NPDNA_{dex02b}.



A amostra NPDNA apresentou, além das bandas referentes ao óxido de ferro funcionalizado com L-Lisina, banda em 1049 cm^{-1} característica do estiramento C-O da ligação ribose-fosfato e a banda em 2850 cm^{-1} referente ao estiramento C-H simétrico dos grupos CH_2 dos fragmentos de aminoácido e DNA (ARAKAWA et al., 2011; THEOPHANIDES, 1981).

As quatro amostras NPDNA_{dex} apresentaram na região de 960 a 1190 cm^{-1} , perfil muito semelhante ao da dextrana pura. Além das bandas características das nanopartículas maghemita/L-Lisina, apresentaram também as bandas em 1460 cm^{-1} e 1340 cm^{-1} relativas à deformação C-H-OH e bandas em 1152 cm^{-1} e 1014 cm^{-1} referentes ao estiramento C-O do anel α -glicosídeo (SHEN et al., 2005; BAUTISTA et al., 2005). Nessas quatro amostras, as bandas de dextrana se sobrepuseram à banda em 1049 cm^{-1} referente ao DNA.

Observa-se que, mesmo após a separação e lavagem do sólido maghemita/DNA/dextrana, uma quantidade de dextrana ainda se mantém adsorvida à

superfície da nanopartícula, como evidenciado pela diminuição das intensidades das bandas relativas à dextrana.

5.8. Experimento de adsorção de plasmídeo/shRNA e plasmídeo/GFP no fluido NPLis1A

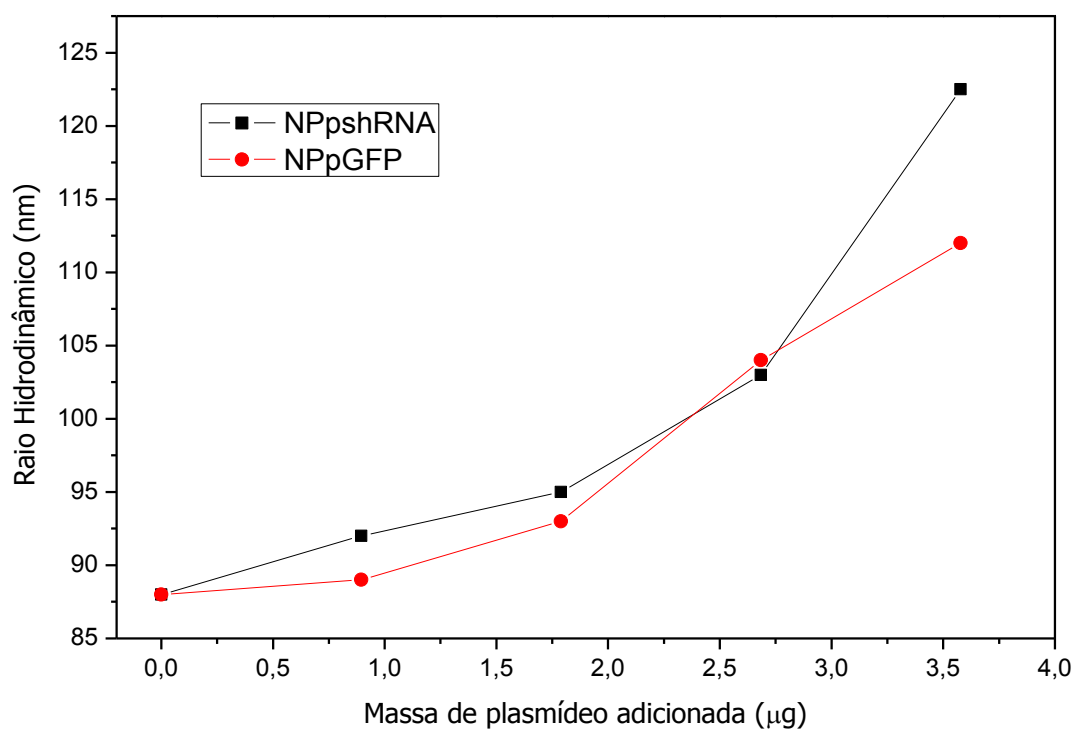
Observa-se que, na medida em que foram adicionadas as soluções de plasmídeo/shRNA e plasmídeo/GFP ao fluido NPLis1A, o raio hidrodinâmico médio (em número) e o índice de polidispersão das amostras aumentaram (Tabela 5.9).

Após adição de 1,789 µg (6 µL) de pshRNA, a amostra já apresentava raio hidrodinâmico de 95 nm, valor próximo ao relatado na literatura para que as nanopartículas adentrem às células através da fagocitose. Assim, determinou-se que para 1 mL do fluido, seriam adicionados 6 µL de pshRNA para posterior recobrimento com dextrana. Da mesma forma, após adição de 1,789 µg (6 µL) de pGFP, a amostra apresentou raio hidrodinâmico médio de 93 nm, determinando assim o volume de pGFP a ser adicionado para recobrimento da amostra nanopartícula/pGFP com dextrana.

Considerando a concentração de plasmídeo em 6 µL das soluções pshRNA e pGFP (ambas de concentração 298,2 ng.µL⁻¹), bem como o teor de ferro em 1 mL do fluido NPLis1A, tem-se que as soluções NPpshRNA e NPpGFP utilizadas para posterior recobrimento com dextrana possuem uma razão mássica plasmídeo/maghemita de 1,61 µg de plasmídeo/mg de maghemita.

Devido ao menor tamanho do DNA plasmídico (aproximadamente 4 kb) quando comparado ao DNA cromossômico de *Humicola grisea* (aproximadamente 25 Mb), pôde-se adicionar à suspensão coloidal aproximadamente o dobro de plasmídeo em massa, gerando um aumento de raio hidrodinâmico inferior àquele observado para a amostra NPDNA (101 nm).

Figura 5.14 – Gráfico do raio hidrodinâmico médio para o fluido NPLis1A em função das adições sucessivas de plasmídeo (pshRNA e pGFP).



Ao adicionar no fluido NPLis1A, soluções de pGFP e pshRNA de mesmas concentrações, a amostra apresentou comportamento semelhante quanto ao aumento do raio hidrodinâmico médio em função do volume da solução de plasmídeo adicionada (Figura 5.14). Tal comportamento era esperado devido ao tamanho similar (em pares de base) entre os plasmídeos.

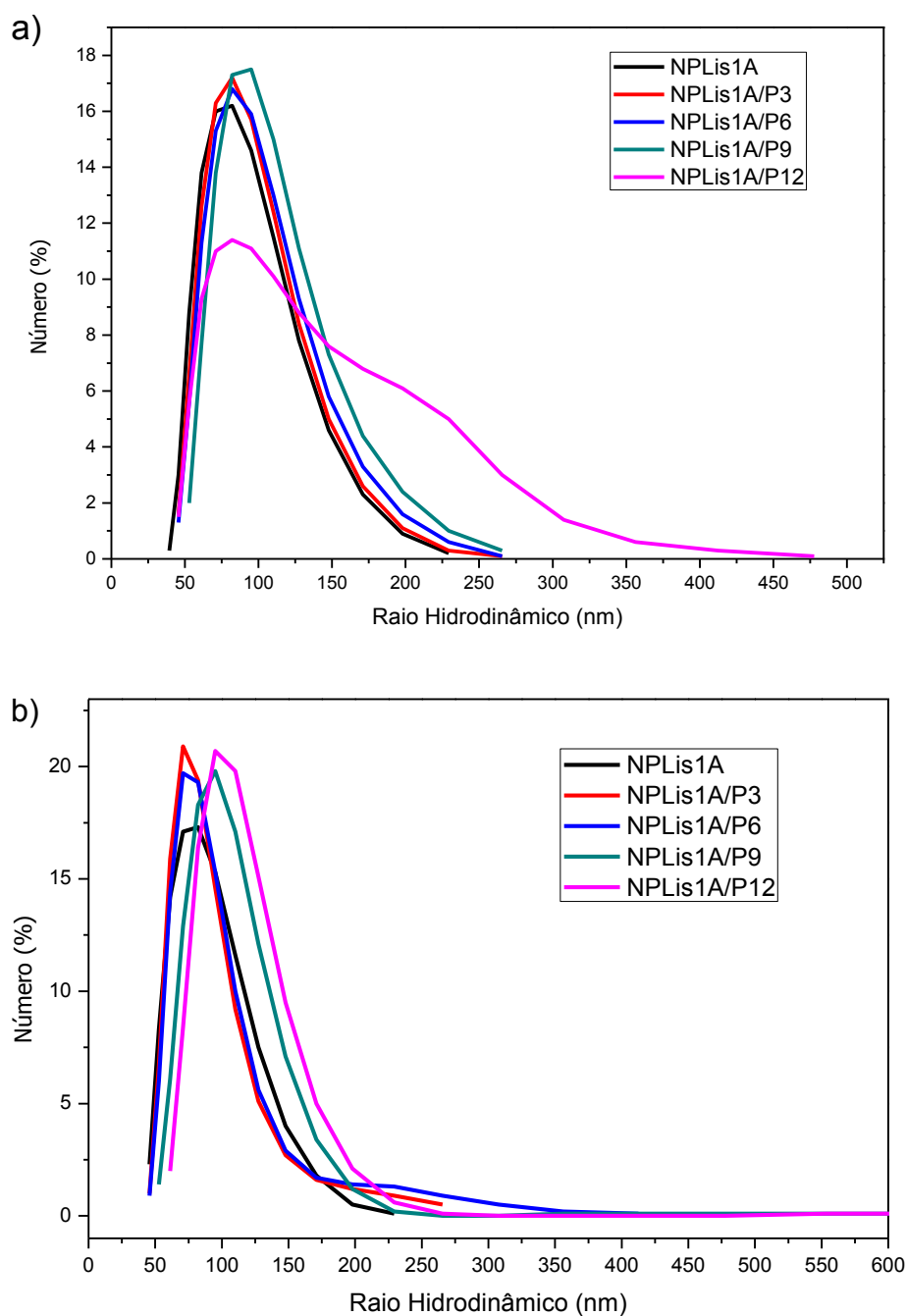
Tabela 5.9 - Raio hidrodinâmico médio e Índice de Polidispersão das nanopartículas em função das adições sucessivas das soluções de plasmídeo (pshRNA e pGFP).

Amostra	Razão mássica plasmídeo/ maghemita (µg plasmídeo/mg maghemita)	pshRNA		pGFP	
		Raio Hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão (PDI)	Raio Hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão (PDI)
NPLis	-	88	0,18	88	0,19
NPLis1A/P3	0,81	92	0,19	89	0,22
NPLis1A/P6	1,61	95	0,27	93	0,25
NPLis1A/P9	2,42	103	0,36	102	0,28
NPLis1A/P12	3,97	122	0,44	112	0,26

Após adição de 2,684 µg (12 µL) de pshRNA, a amostra apresentou um comportamento modal mais polidisperso e observou-se a coagulação das nanopartículas (Figura 5.15).

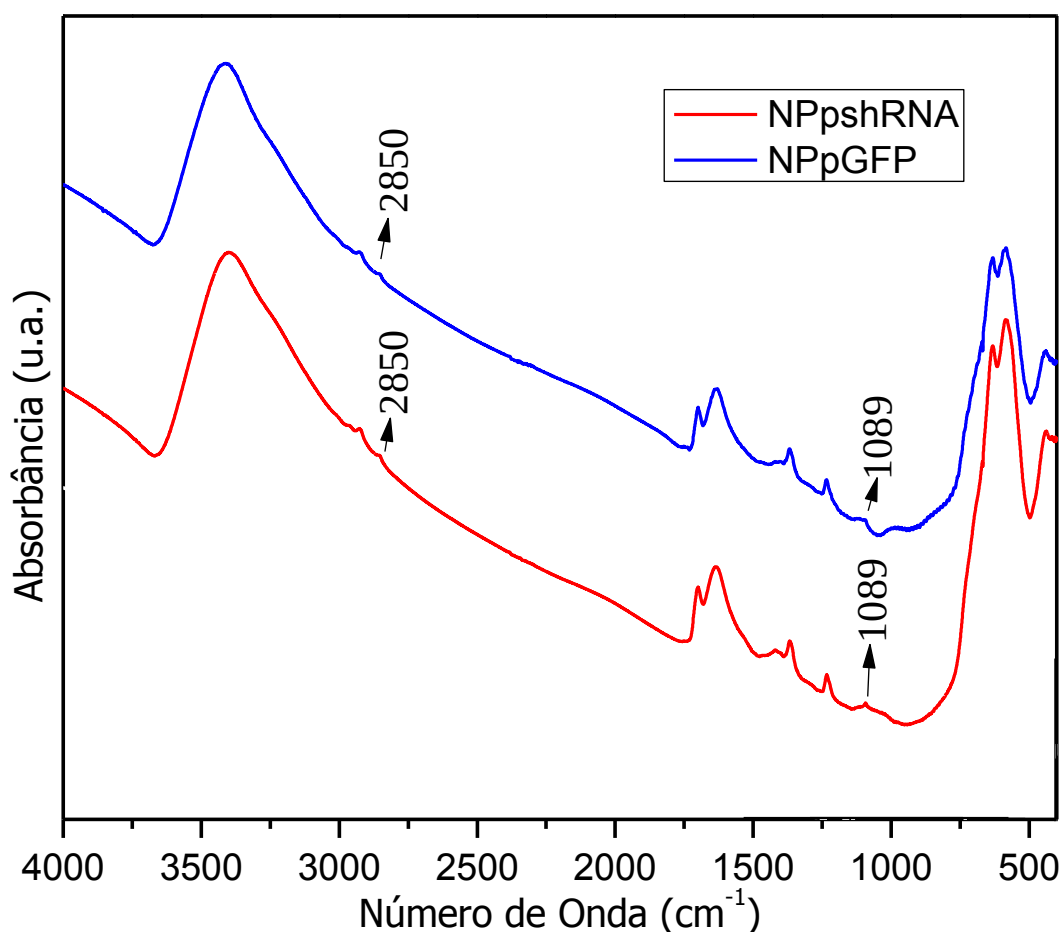
Para a amostra em que foi adicionada a solução de pGFP, o aumento do índice de polidispersão da amostra foi mais discreto ao se adicionar 12 µL da solução (Figura 5.15). Porém, foram detectadas, após adição de 1,789 µg (9 µL) e 2,684 µg (12 µL) de pGFP ao fluido NPLis1A, a presença de agregados superiores a 400 nm em porcentagens inferiores a 1 %.

Figura 5.15 - Distribuição de raio hidrodinâmico dos agregados de nanopartículas suspensas em função das adições de (a) pshRNA e (b) pGFP.



As amostras de nanopartículas/plasmídeos (maghemita/pshRNA e maghemita/pGFP) após fracionadas por gradiente de campo magnético, tiveram seu sólido caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho (Figura 5.16):

Figura 5.16 - Espectros de infravermelho das amostras NPpshRNA e NPpGFP.



Além das bandas características da maghemita/aminoácido, já discutidas na Figura 5.3, os espectros das amostras nanopartículas/plasmídeo apresentaram a banda em 2850 cm^{-1} referente ao estiramento C-H simétrico dos grupos CH_2 do DNA plasmídico, bem como a banda em 1089 cm^{-1} característica do estiramento simétrico do grupo fosfato - PO_4^- (ARAKAWA et al., 2011; THEOPHANIDES, 1981).

5.9. Experimento de recobrimento das nanopartículas maghemita/L-Lisina/pshRNA e maghemita/L-Lisina/pGFP com dextrana

Assim como no recobrimento com dextrana da amostra NPDNA, houve o aumento do raio hidrodinâmico médio após adição da dextrana nas amostras NPpshRNA e NPpGFP, indicando que houve o recobrimento das nanopartículas. Ambas apresentaram um PDI superior ao da amostra NPLis1A, evidenciando que a

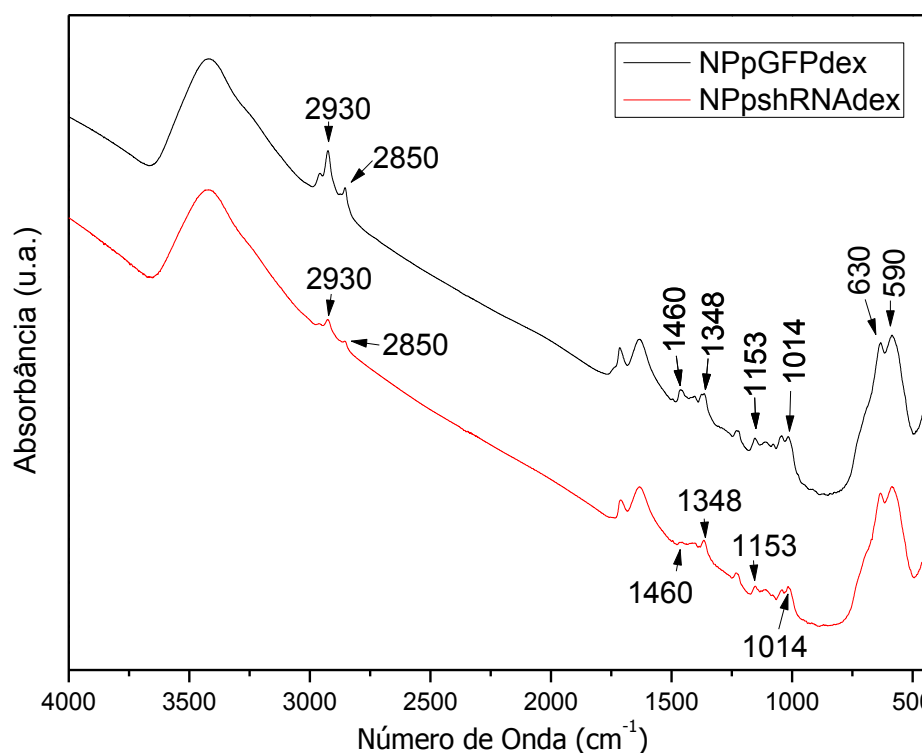
adsorção do plasmídeo e o recobrimento com dextrana T10 favorece a agregação das nanopartículas.

Tabela 5.10 – Raio hidrodinâmico médio e Índice de Polidispersão das nanopartículas maghemita/L-Lisina/plasmídeo após recobrimento com dextrana T10.

	Raio Hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersão (PDI)
NPpshRNA_{dex}	100	0,36
NPpGFP_{dex}	100	0,40

Os sólidos NPpshRNA_{dex} e NPpGFP_{dex} isolados e lavados com água deionizada foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho:

Figura 5.17 - Espectros de infravermelho das amostras NPLis1ApGFP_{dex} e NPLis1ApshRNA_{dex}.



Além das bandas características das nanopartículas maghemita/L-Lisina, tais amostras apresentaram também as bandas referentes à dextrana, como em 1460 cm⁻¹

e 1340 cm^{-1} relativas à deformação C-H-OH e bandas em 1152 cm^{-1} e 1014 cm^{-1} referentes ao estiramento C-O do anel α -glicosídeo (SHEN et al., 2005; BAUTISTA et al., 2005), bem como a banda em 2850 cm^{-1} referente ao estiramento C-H simétrico dos grupos CH_2 dos fragmentos de plasmídeo (ARAKAWA et al., 2011; THEOPHANIDES, 1981). Assim como nas amostras NPDNAdex, as bandas de dextrana se sobrepuseram à banda em 1089 cm^{-1} referente ao DNA plasmídico.

6. CONCLUSÃO

Nanopartículas de maghemita funcionalizada com os aminoácidos L-Lisina/DL-Histidina foram obtidas através da coprecipitação de sais de ferro na presença do aminoácido, bem como através da posterior funcionalização das nanopartículas.

As nanopartículas na suspensão coloidal apresentaram carga superficial positiva em pH fisiológico, o que garante estabilidade coloidal aos fluidos magnéticos obtidos e indica a possibilidade de serem utilizadas em aplicações biológicas *in vivo* e *in vitro*.

O fluido magnético NPLis1A, utilizado para a adsorção de moléculas de DNA e plasmídeos codificadores de GFP e shRNA, foi eficiente para estabelecer interações eletrostáticas entre os grupos amina do aminoácido presente na superfície da nanopartícula e os grupos fosfato presentes nas moléculas de DNA cromossômico e plasmidial, podendo ser utilizado para carregamento de biomoléculas aniônicas.

Estabeleceu-se interações entre a dextrana e as nanopartículas do fluido constituído de maghemita/aminoácido/plasmídeo, de forma a possibilitar posteriores estudos da plataforma maghemita/L-Lisina como carreadora de plasmídeos codificadores de shRNA para aplicações *in vivo*, já que a dextrana seria capaz de proteger essas moléculas sintéticas precursoras do mecanismo de RNA de interferência (RNAi) das nucleases presentes no soro humano e animal.

A adsorção de plasmídeo e dextrana à superfície da nanopartícula gerou o aumento do raio hidrodinâmico médio das nanopartículas ao limite relatado na literatura para que ocorra a fagocitose nas células, bem como o aumento do índice de polidispersão.

7. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, outros estudos podem ser desenvolvidos:

- Estudo de citotoxicidade do sistema maghemita/plasmídeo/dextrana
- Aplicação *in vitro* das nanopartículas maghemita/pshRNA/dextrana para silenciamento de vírus da hepatite C em células hepáticas.
- Estudo da expressão da proteína verde fluorescente (GFP) *in vitro* e *in vivo*.
- Obtenção do sistema bifuncional de nanopartículas carreadoras dos dois tipos de plasmídeos estudados neste trabalho (pshRNA + pGFP).

8. TRABALHOS APRESENTADOS E PUBLICADOS E PARTICIPAÇÃO EM PROJETOS DE PESQUISA

- SILVA, B. G. C.; SARTORATTO, P. P. C. Plataforma Maghemita/L-lisina para Carreamento de Biomoléculas. 2014. (Apresentação de Trabalho no V Encontro do INCT em Nanobiotecnologia, Reunião da Rede Centro-Oeste-Norte de Pós Graduação em Nanobiotecnologia (CON-NANO) e Simpósio de Nanotecnologia do Nordeste).
- ZAFRED, A. F. D.; SILVA, B. G. C.; JESUS, A. F. C.; SARTORATTO, P. P. C. Estudo do Fluido Maghemita/Dextrana por Espalhamento Dinâmico de Luz. 2014. (Apresentação de Trabalho no V Encontro do INCT em Nanobiotecnologia, Reunião da Rede Centro-Oeste-Norte de Pós Graduação em Nanobiotecnologia (CON-NANO) e Simpósio de Nanotecnologia do Nordeste).
- GONCALVES, K. O.; Silva, B. G. C.; SARTORATTO, P. P. C. Caracterização morfológica e textural de compósitos $\text{SiO}_2/\text{PDMS}/\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. In: IV Reunião Anual de Usuários do LabMic, 2014, Goiânia. IV Reunião Anual dos Usuários do LabMic - Resumos, p. 23-23, 2014.
- GONCALVES, K. O. ; SILVA, B. G. C.; SARTORATTO, P. P. C. Preparação e Caracterização de Compósitos $\text{SiO}_2/\text{PDMS}/\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. In: XI Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão - CONPEEX, 2014, Goiânia. Anais do Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão - CONPEEX (2014), p. 154-154, 2014.
- CANEDO SILVA, B. G.; SARTORATTO, P. P. C. ; LACAVA, Z. G. M. ; FONSECA, M. J. P. . Preparação e caracterização de fluido magnético maghemita/L-Lisina/DNA/dextrana. In: 55º Congresso Brasileiro de Química, 2015, Goiânia - GO. Anais do 55º Congresso Brasileiro de Química, 2015.
- SARTORATTO, P. P. C. ; ARRUDA, A. F. ; CAIADO, K. L. ; SILVA, B. G. C. ; BALDORI, J. L. ; ABREU, J. P. S. ; SILVA, A. C. R. ; GONCALVES, K. O. . Estudo da Capacidade de Adsorção dos Metais Potencialmente Tóxicos por Material Magnético Nanoestruturado. In: 55º

Congresso Brasileiro de Química, 2015, Goiânia - GO. Anais do 55º Congresso Brasileiro de Química, 2015.

- CANEDO SILVA, B. G.; SARTORATTO, P. P. C. ; LACAVA, Z. G. M. ; FONSECA, M. J. P. . Síntese e Caracterização de fluidos magnéticos constituídos de maghemita funcionalizada com L-Lisina/DL-Histidina e adsorção de moléculas de DNA. In: I Workshop das Pós-Graduação em Química, 2015, Goiânia. Resumos I WSPGQ, 2015.
- CANEDO SILVA, B. G.; LACAVA, Z. G. M. ; FONSECA, M. J. P. ; SARTORATTO, P. P. C. . L-Lysine and DL-Histidine/iron oxide - based magnetic fluids for DNA adsorption. In: XIV Brazil MRS Meeting, 2015, Rio de Janeiro - RJ. XIV Brazil MRS Meeting Proceedings, 2015.
- Canedo Silva, B. G., Sartoratto, P. P. C., Lacava, Z. G. M., Rahal, P., Carneiro, B. M. Adsorção de plasmídeos contendo genes codificadores de GFP e shRNA em fluido magnético constituído de maghemita/L-Lisina. 2016. (Apresentação Oral de Trabalho na 39ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química).
- Participação no projeto de pesquisa “Meninas na Química: nanomateriais magnéticos para aplicações em avaliação ambiental”, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Patrícia Pommé Confessori Sartoratto (2014-2015).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, T.; KIM, J. H.; YANG, H.-M.; LEE, J. W.; KIM, J.-D. Formation pathways of magnetite nanoparticles by coprecipitation method. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, p. 6069-6076, 2012.

AKBARZADEH, A.; SAMIEI, M.; DARAVAN, S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. **Nanoscale Research Letters**, v. 7, n. 144, 2012.

ALLISON, L. A. **Fundamental Molecular Biology**. 2nd Edition. Williamsburg: Blackwell Publishing, 2011.

ANAND, R. R.; GILKES, R. J. Mineralogical and chemical properties of weathered magnetite grains from lateritic saprolite. **Journal of Soil Science**, v. 35, n. 4, p. 559–567, 1984

ARAKAWA, H.; NEAULT, J. F.; TAJMIR-RIAH, H. A. Silver(I) Complexes with DNA and RNA Studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Capillary Electrophoresis. **Biophysical Journal**, v. 81, n. 3, p. 1580–1587, 2001.

AYDIN, M.; KARTAL, Z.; OSMANOĞLU, Ş.; BAŞKAN, M. H.; TOPKAYA, R. EPR and FT-IR spectroscopic studies of l-lysine monohydrochloride and l-glutamic acid hydrochloride powders. **Journal of Molecular Structure**, v. 994, n. 1–3, p. 150-154, 2011.

BABIC, M.; HORÁK, D.; TRCHOVÁ, M.; JENDELOVÁ, P.; GLOGAROVÁ, K.; LESNÝ, P.; HERYNEK, V.; HÁJEK, M.; SYKOVÁ, E. Poly(L-lysine)-modified iron oxide nanoparticles for stem cell labeling. **Bioconjugate Chemistry**, v. 19, n. 3, p. 740-750, 2008.

BAUTISTA, C. M.; MIGUEL, B. O.; MORALES, P. M. Surface characterization of dextran-coated iron oxide nanoparticles prepared by laser pyrolysis and coprecipitation. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 20-27, 2005.

BEE, A.; MASSART, R.; NEVEU, S. Synthesis of very fine maghemite particles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 149, p. 6-9, 1995.

BLANCO, E.; SHEN, H.; FERRARI, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 9, p. 941–951, 2015.

BRUMMELKAMP, T. R.; BERNARDS, R.; AGAMI, R. A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. **Science**, v. 296, n. 5567, p. 550-553, 2002.

CAIADO, K. L. **Nanoesferas Magnéticas: Estudo do Sistema Maghemita/Sílica**. Goiânia, 2014. 188 p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás.

CAO, G.; WANG, Y. **Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications**. 2nd Ed. London, 2011.

CHAUDHURI, R. G.; PARIA, S. Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 4, p. 2373–2433, 2012.

CHENG, K.; MAHATO, R. I. **Advanced Delivery and Therapeutic Applications of RNAi**. Nova York: John Wiley & Sons, 2013.

CHEN, Y.; LIAN, G.; LIAO, C.; WANG, W.; ZENG, L.; QIAN, C.; HUANG, K.; SHUAI, X. Characterization of polyethylene glycol-grafted polyethylenimine and superparamagnetic iron oxide nanoparticles (PEG-g-PEI-SPION) as an MRI-visible vector for siRNA delivery in gastric cancer in vitro and in vivo. **Journal of Gastroenterology**, v. 48, n. 7, p. 809-821, 2013.

CHERAGHIPOUR, E.; JAVADPOUR, S.; MEHDIZADEH, A. R. Citrate capped superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for hyperthermia therapy. **Journal of Biomedical Science and Engineering**, v. 5, n. 2, p. 715-719, 2012.

COEY, J. M. D. **Magnetism and Magnetic Materials**. New York: Cambridge, 2009.

COHEN, J. L.; SCHUBERT, S.; WICH, P. R.; CUI, L. COHEN, J. A.; MYNAR, J. L.; FRÉCHET, J. M. J. Acid-Degradable Cationic Dextran Particles for the Delivery of siRNA Therapeutics. **Bioconjugate Chemistry**, v. 22, n.6, p. 1056–1065, 2011.

CORR, S. A.; RAKOVICH, Y. P.; GUN'KO, Y. K. Multifunctional Magnetic-fluorescent Nanocomposites for Biomedical Applications. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, n. 3, p. 87-104, 2008.

COUTURIER, M.; BEX, F.; BERGQUIST, P. L.; MAAS, W. K. Identification and classification of bacterial plasmids. **Microbiological Reviews**, v. 52, n. 3, p. 375-395, 1988.

CUBITT, A. B.; HEIM, R.; ADAMS, S. R.; BOYD, A. E.; GROSS, L. A.; TSIEN, R. Y. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 20, n. 11, p. 448–455, 1995.

CUI, L.; COHEN, J. L.; CHU, C. K.; WICH, P. R.; KIERSTEAD, P. H.; FRÉCHET, J. M. Conjugation chemistry through acetals toward a dextran-based delivery system for controlled release of siRNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 38, p. 15840–15848, 2012.

CULLITY, B. D. **Elements of X-Ray Diffraction**, 2nd Edition, Canada: Addison-Wesley 1774, 1978.

CULLITY, B. D. **Introduction to magnetic materials**, Addison-Wesley, 1972.

DAS, A. T.; BRUMMELKAMP, T. R.; WESTERHOUT, E. M.; VINK, M.; MADIREDO, M.; BERNARDS, R.; BERKHOUT, B. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Escapes from RNA Interference-Mediated Inhibition. **Journal of Virology**, v. 78, n.5, p. 2601-2605, 2004.

DHAKAL, P.; MATOCHA, C. J.; HUGGINS, F. E.; VANDIVIERE, M. M. Nitrite reactivity with magnetite. **Environmental Science and Technology**, v. 47, n. 12, p. 6206–6213, 2013.

DE CUYPER, M.; JONIAU, M. Mechanistic aspects of the adsorption of phospholipids onto lauric acid stabilized Fe₃O₄ nanocolloids. **Langmuir**, v. 7, n. 4, p. 647-62, 1991.

DEJNEKA, N.S.; WAN, S.; BOND, O. S.; KORNBRUST, D.J.; REICH, S.J. Ocular biodistribution of bevasiranib following a single intravitreal injection to rabbit eyes. **Molecular Vision**, v.14, p. 997–1005, 2008.

DEL MONTE, F.; MORALES, M. P.; LEVY, D.; FERNANDEZ, A.; OCAÑA, M.; ROIG, A.; MOLINS, E.; O'GRADY, K.; SERNA, C. J. Formation of γ -Fe₂O₃ isolated nanoparticles in a silica matrix. **Langmuir**. v.13, p. 3627-3634, 1997.

DIAS, A. C.; HUSSAIN, A.; MARCOS, A. S.; ROQUE, A. A biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 142-155, 2011.

DUCKWORTH, O. W.; MARTIN, S. T. Surface complexation and dissolution of hematite by C1-C6 dicarboxylic acids at pH = 5.0. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 65, n. 23, p. 4289–4301, 2001.

DURMUS, Z.; KAVAS, H.; TOPRAK, M. S.; BAYKAL, A.; ALTINÇEKİÇ, T. G.; ASLAN, A.; BOZKURT, A.; COŞGUN, S. L-lysine coated iron oxide nanoparticles: synthesis, structural and conductivity characterization. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 484, n. 1, p. 371-376, 2009.

ELBASHIR, S.M.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W.; YALCIN, A.; WEBER, K.; TUSCHL, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v. 411, n. 6836, p. 494-498, 2001.

FERGUSON, G. A.; HAAS, M. Magnetic Structure and Vacancy Distribution in γ - Fe_2O_3 by Neutron Diffraction. **Physical Review**, v. 112, n. 4, p. 1130-1131, 1958.

FIEVET, F.; LAGIER, J. P.; BLIN, B.; BEAUDOIN, B.; FIGLARZ, M. Homogeneous and Heterogeneous Nucleations in the Polyol Process for the Preparation of Micron and Submicron Size Metal Particles. **Solid State Ionics**, v. 32/33, p. 198-205, 1989.

FOSHAY, M. C.; VITELLO, L. B.; ERMAN, J. E. pH Dependence of Heme Iron in Coordination, Hydrogen Peroxide Reactivity, and Cyanide Binding in Cytochrome *c* Peroxidase (H52K). **Biochemistry**, n. 43, v. 1, p. 5065-5072, 2004.

FRANÇA, N. R.; JÚNIOR, D. M.; LIMA, A. B.; PUCCI, F. V. C.; ANDRADE, L. E. C.; SILVA, N. P. Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 6, 2010.

FRANK, J. A.; MILLER, B. R.; ARBAB, A. S.; ZYWICKE, H. A.; JORDAN, E. K.; LEWIS, B. K.; BRYANT, L. H.; BULTE, J. W. M. Clinically Applicable Labeling of Mammalian and Stem Cells by Combining Superparamagnetic Iron Oxides and Transfection Agents. **Radiology**, v. 228, n. 2, 2003.

GAO, F.; CAI, Y.; ZHOU, J.; XIE, X.; OUYANG, W.; ZHANG, Y.; WANG, X.; ZHANG, X.; WANG, X.; ZHAO, L.; TANG, J. Pullulan acetate coated magnetite nanoparticles for hyper-thermia: Preparation, characterization and in vitro experiments. **Nano Research**, v. 3, n. 1, 2010.

GABBOT, P. **Principles and Applications of Thermal Analysis**. Australia: Blackwell Publishing; 2008.

GEORGANOPOULOU, D. G.; CHANG, L.; NAM, J.-M.; THAXTON, C. S.; MUFSON, E. J.; KLEIN, W. L.; MIRKIN, C. A. Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 7, p. 2273-2276, 2005.

GITLIN, L.; STONE, J. K.; ANDINO, R. Poliovirus escape from RNA interference: short interfering RNA-target recognition and implications for therapeutic approaches. **Journal of Virology**, v. 79, n.2, p. 1027-1035, 2005.

GOSS, C. J. Saturation magnetisation, coercivity and lattice parameter changes in the system Fe_3O_4 - $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, and their relationship to structure. **Physics and Chemistry of Minerals**, v. 16, n. 2, p. 164-171, 1988.

GRACZYKOWSKI, B.; DOBEK, A. Iron-dextran complex: Geometrical structure and magneto-optical features. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 363, n. 2, p. 551-556, 2011.

GREAVES, C. A powder neutron diffraction investigation of vacancy ordering and covalence in γ -Fe₂O₃. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 325-333, 1983.

GUBIN, S. P. (Ed.). **Magnetic Nanoparticles**. Weinheim: Wiley-VCH, 2009.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, 2005.

HAAS, K.; SIN, W. C.; JAVAHERIAN, A.; LI, Z.; CLINE, H. T. Single-Cell Electroporation for Gene Transfer In Vivo. **Neuron**, v. 29, n. 3, p. 583-591, 2001.

HANEDA, K.; MORRISH, A. H. Magnetite to maghemite transformation in ultrafine particles. **Journal de Physique**, v. 38, n. 4, p. C1-321-C1-323, 1977.

HIEMENZ, P. C.; RAJAGOPALAN, R. **Principles of colloid and surface chemistry**. 3rd. ed. rev. exp. New York: M. Dekker, 1997.

HONG, Y. R.; FENG, B.; CHEN, L. L.; LIU, H. G.; LI, Z. H.; ZHENG, Y.; WEI, G. D. Synthesis, characterization and MRI application of dextran-coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, p. 290-300, 2008.

HU, L. L.; HU, B.; SHEN, L. M.; ZHANG, D. D.; CHEN, X. W.; WANG, J. H. Polyethyleneimine-iron phosphate nanocomposite as a promising adsorbent for the isolation of DNA. **Talanta**, v. 132, n. 1, p. 857-863, 2015.

HUNTER, J. R. **Foundations of Colloid Science**. 2. ed. California: Clarendon Press, 1989.

ISHII, M.; NAKAHIRA, M. Infrared absorption spectra and cation distribution in (Mn,Fe)₃O₄. **Solid State Communications**, n. 11, p. 209-212, 1972.

ISHIKAWA, T.; KATAOKA, S.; KANDORI, K. The influence of carboxylate ions on the growth of β -FeOOH particles. **Journal of Materials Science**, v. 28, p. 2693-2698, 1993.

JESUS, C. F. A. **Síntese e caracterização de nanopartículas de maghemita associada com dextrana funcionalizada com rodamina B**. Goiânia, 2014. 94 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás.

JOHNSON, H. P.; MERRILL, R. T. Magnetic and mineralogical changes associated with low-temperature oxidation of magnetite. **Journal of Geophysical Research**, v. 77, n. 2, p. 2156-2202, 1972.

JOLIVET, J.-P.; CASSAIGNON, S.; CHANÉAC, C.; CHICHE, D.; TRONC, E. Design of oxide nanoparticles by aqueous chemistry. **Journal of Sol-Gel Science**

and Technology, v. 46, p.299-305, 2008.

KIEVIT, F. M.; VEISEH, O.; BHATTARAI, N.; FANG, C.; GUNN, J. W.; LEE, D.; ELLENBOGEN, R. G.; OLSON, J. M.; ZHANG, M. PEI-PEG-Chitosan Copolymer Coated Iron Oxide Nanoparticles for Safe Gene Delivery: synthesis, complexation, and transfection. **Advanced Functional Materials**, v. 19, n. 14, p. 2244–2251, 2009.

KIM, D. H.; BEHLKE, M. A.; ROSE, S. D.; CHANG, M. S.; CHOI, S.; ROSSI, J. J. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. **Nature Biotechnology**, v. 23, n.2, p. 222 – 226, 2005.

KIRWAN, L. J.; FAWELL, P. D.; BRONSWIJK, W. In Situ FTIR-ATR Examination of Poly(acrylic acid) Adsorbed onto Hematite at Low pH. **Langmuir**, v. 19, n. 14, p. 5802–5807, 2003.

KNEUER, C.; SAMETI, M.; HALTNER, E. G.; SCHIESTEL, T.; SCHIRRA, H.; SCHMIDT, H.; LEHR, C. M. Silica nanoparticles modified with aminosilanes as carriers for plasmid DNA. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, n. 2, p. 257-261, 2000.

LAURENT, S.; FORGE, D.; PORT, M.; ROCH, A.; ROBIC, C.; ELST, L. V.; MULLER, R. N. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 2064–2110, 2008.

LEE, S.-J.; JEONG, J.-R.; SHIN, S.-C.; KIM, J.-C.; KIM, J.-D. Synthesis and characterization of superparamagnetic maghemite nanoparticles prepared by coprecipitation technique. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 282, n. 1, p. 147–150, 2004.

LI, Z.; SHUAI, C.; LI, X.; LI, X.; XIANG, J.; LI, G. Mechanism of poly-L-lysine-modified iron oxide nanoparticles uptake into cells. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 101, n. 10, p. 2846-2850, 2013.

LI, Z.; MENG, G.; CHEN, R.; SONG, X. Eco-friendly synthesis and photodegradation of hierarchical nanostructures of β -FeOOH and α -Fe₂O₃. **RSC Advances**, v. 5, n. 108, p. 88787-88795, 2015.

LIDE, D. R. (Ed.). **CRC handbook of chemistry and physics: A ready-reference book of chemistry and physical data**, 75.ed. CRC Press: Florida, 1995.

LIU, G.; MOLAS, M.; GROSSMANN, G. A.; PASUMARTHY, M.; PERALES, J. C.; COOPER, M. J.; HANSON, R. W. Biological properties of poly-L-lysine-DNA complexes generated by cooperative binding of the polycation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 37, p. 34379-34387, 2001.

LIZ, L.; LÓPEZ QUINTELA, M. A.; MIRA, J.; RIVAS, J. Preparation of colloidal

Fe₃O₄ ultrafine particles in microemulsions. **Journal of Materials Science**. v. 29, p. 3797-3801, 1994.

LUO, D.; SALTZMAN, M. Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at the cell surface. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 893 – 895, 2000.

MAHDAVI, M.; AHMAD, M. B.; HARON, M. J.; NAMVAR, F.; NADI, B.; RAHMAN, M. Z. A.; AMIN, J. Synthesis, Surface Modification and Characterisation of Biocompatible Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 7533-7548, 2013.

MAABONG, K.; MACHATINE, A. G.; HU, Y.; BRAUN, A.; NAMBALA, F. J. DIALE, M. Morphology, structural and optical properties of iron oxide thin film photoanodes in photoelectrochemical cell: Effect of electrochemical oxidation. **Physica B: Condensed Matter**, v. 480, p. 91-94, 2016.

MA, H. L.; QI, X. R.; DING, W. X.; MAITANI, Y.; NAGAI, T. Magnetic targeting after femoral artery administration and biocompatibility assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 84, n. 3, p. 598-606, 2008.

MANN, A.; RICHA, R.; GANGULI, M. DNA condensation by poly-l-lysine at the single molecule level: Role of DNA concentration and polymer length. **Journal of Controlled Release**, v. 125, n. 3, p. 252–262, 2008.

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

MATIJEVIC, E.; CIMAS, S. Formation of uniform colloidal iron (III) oxides in ethylene glycol-water solutions. **Colloid & Polymer Science**, v. 265, n. 2, p. p 155-163, 1987.

MCBAIN, S. C.; YIU, H. H. P.; EL HAJ, A.; DOBSON, J. Polyethylenimine-functionalized iron oxide nanoparticles as agents for DNA delivery and transfection. **Journal of Materials Chemistry**, v. 17, n.1, p. 2561-2565, 2007.

MEDAROVA, Z.; PHAM, W.; FARRAR, C.; PETKOVA, V.; MOORE A. *In vivo* imaging of siRNA delivery and silencing in tumors. **Nature Medicine**, v. 13, n. 1, pg. 372 – 377, 2007.

MENDIVE, C. B.; BREDOW, T.; BLESÁ, M. A.; BAHNEMANN, D. W. ATR-FTIR measurements and quantum chemical calculations concerning the adsorption and photoreaction of oxalic acid on TiO₂. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 8, n. 27, p. 3232-3247, 2006.

MILJKOVIC-SELIMOVIC, B.; BABIC, T.; KOCIC, B.; STOJANOVIC, P.; RISTIC, L.; DINIC, M. Bacterial Plasmids. **Acta Medica Medianae**, v. 46, n. 4, p. 61-65, 2007.

MIN, J. H.; WOO, M. K.; YOON, H. Y.; JANG, J. W.; WU, J. H.; LIM, C. S.; KIM, Y. K. Isolation of DNA using magnetic nanoparticles coated with dimercaptosuccinic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 447, n. 1, p. 114-118, 2014.

MIRANDA-VILELA, A. L.; YAMAMOTO, K. R.; MIRANDA, K. L. C. ; MATOS, B. R.; ALMEIDA, M. C.; LONGO, J. P. F.; SOUZA FILHO, J.; FERNANDES, J. M. S.; SARTORATTO, P. P. C.; LACAVA, Z. G. M. Dextran-functionalized magnetic fluid mediating magnetohyperthermia for treatment of Ehrlich-solid-tumor-bearing mice: toxicological and histopathological evaluations. **Tumor Biology**, v. 35, n.1, p. 3391-3403, 2014.

MOORE, C.B.; GUTHRIE, E. H.; HUANG, M. T.; TAXMAN, D. J. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. **Methods in Molecular Biology**, v. 629, p. 139-156, 2010.

MORNET, S.; PORTIER, J.; DUGUET, E. A method for synthesis and functionalization of ultrasmall superparamagnetic covalent carriers based on maghemite and dextran. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p. 127–134, 2005.

MYERS, D. **Surfaces, interfaces and colloids: Principles and Applications**, 2. Ed., Nova York: John Willey & Sons, 1999.

NAMDURI, H.; NASRAZADANI, S. Quantitative analysis of iron oxides using Fourier transform infrared spectrophotometry. **Corrosion Science**, n. 50, p. 2493–2497, 2008

NARA, M.; TORII, H.; TASUMI, M. Correlation between the Vibrational Frequencies of the Carboxylate Group and the Types of Its Coordination to a Metal Ion: An ab Initio Molecular Orbital Study. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 51, p. 19812–19817, 1996.

NIGAM, S.; BARICK, K. C.; BAHADUR, D. Development of citrate-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles: Conjugation and release of doxorubicin for therapeutic applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 323, n. 2, p. 237–243, 2011.

NISHI, T.; YOSHIZATO, K.; YAMASHIRO, S.; TAKESHIMA, H.; SATO, K.; HAMADA, K.; KITAMURA, I.; YOSHIMURA, T.; SAYA, H.; KURATSU, J.; USHIO, Y. High-efficiency in vivo gene transfer using intraarterial plasmid DNA injection following in vivo electroporation. **Cancer Research**, v. 56, p. 1050-1055, 1996.

PARK, J. Y.; CHOI, E. S.; BAEK, M. J.; LEE, G. H. Colloidal stability of amino acid coated magnetite nanoparticles in physiological fluid. **Material Letters**, v. 63, n. 3-4, p. 379–381, 2009.

PERALTA-VIDEA, J. R.; ZHAO, L.; LOPEZ-MORENO, M. L.; ROSA, G.; HONG, J.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008–2010. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 1, p. 1-15, 2011.

PERLSTEIN, B.; RAM, Z.; DANIELS, D.; OCHERASHVILLI, A.; ROTH, Y.; MARGEL, S.; MARDOR, Y. Convection-enhanced delivery of maghemite nanoparticles: Increased efficacy and MRI monitoring. **Neuro Oncology**, v. 10, n. 2, p. 153–161, 2008.

PETRACIC, O. Superparamagnetic nanoparticle ensembles. **Superlattices and Microstructures**, v. 47, p. 569-578, 2010.

PETROSYAN, A. M. Vibrational spectra of l-histidine perchlorate and l-histidine tetrafluoroborate. **Vibrational Spectroscopy**, v. 43, n. 2, p. 284–289, 2007.

PETTERS, C.; BULCKE, F.; THIEL, K.; BICKMEYER, U.; DRINGEN, R. Uptake of Fluorescent Iron Oxide Nanoparticles by Oligodendroglial OLN-93 Cells. **Neurochemical Research**, v. 39, n. 2, p. 372-383, 2014.

QIAN, Y.; XIE, Y.; HE, C.; LI, J.; CHEN, Z. Hydrothermal preparation and characterization of ultrafine magnetite powders. **Materials Research Bulletin**, v. 29, n. 9, p. 953-957, 1994.

RAMOS, J.; FORCADA, J.; HIDALGO-ALVAREZ, R. Cationic Polymer Nanoparticles and Nanogels: From Synthesis to Biotechnological Applications. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 1, p. 367–428, 2014.

RATKE, L.; VOORHEES, P. W. **Growth and Coarsening: Ostwald Ripening in Material Processing**. Nova York: Springer, 2002.

ROZEMA, D. B.; LEWIS, D. L.; WAKEFIELD, D. H.; WONG, S. C.; KLEIN, J. J.; ROESCH, P. L.; BERTIN, S. L.; REPPEN, T. W.; CHU, Q.; BLOKHIN, A. V.; HAGSTROM, J. E.; WOLFF, J. A. Dynamic PolyConjugates for targeted in vivo delivery of siRNA to hepatocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2007.

SAGHI, Z.; HOLLAND, D. J.; LEARY, R.; FALQUI, A.; BERTONI, G.; SEDERMAN, A. J.; GLADDEN, L. F.; MIDGLEY, P. A. Three-Dimensional Morphology of Iron Oxide Nanoparticles with Reactive Concave Surfaces. A Compressed Sensing-Electron Tomography (CS-ET) Approach. **Nano Letters**, v. 11, n. 11, p. 4666–4673, 2011.

SALAZAR, J. S.; PEREZ, L.; ABRIL, O.; PHUOC, L. T.; IHIAWAKRIM, D.; VAZQUEZ, M.; GRENECHE, J.-M.; BEGIN-COLIN, S.; POURROY, G. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in 10–40 nm Range: Composition in Terms of Magnetite/Maghemite Ratio and Effect on the Magnetic Properties. **Chemistry of Materials**, v. 23, n. 6, p. 1379–1386, 2011.

SARTORATTO, P. P. C.; CAIADO, K. L.; SILVA, W. S.; MORAIS, P. C. The Thermal stability of maghemite-silica nanocomposites: An investigation using x-ray diffraction and Raman spectroscopy. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 434-435, n. in press, p. 650-654, 2007.

SAYED, F. N.; POLSHETTIWAR, V. Facile and Sustainable Synthesis of Shaped Iron Oxide Nanoparticles: Effect of Iron Precursor Salts on the Shapes of Iron Oxides. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-14, 2015.

SHAW, D. J. **Introdução à Química dos coloides e de superfícies**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975.

SHEN, H.; XU, Q. X.; XU, R. J.; XU, J.; LI, J. X.; XIONG, M. X. Core-shell structure and magnetic properties of magnetite magnetic fluids stabilized with dextran. **Applied Surface Science**, v. 252, n. 1, p. 494-500, 2005.

SHI, J.; VOTRUBA, A. R.; FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications. **Nano letters**, v. 10, n.9, p. 3223–3230, 2010.

SHI, J.; XIAO, Z.; KAMALY, N.; FAROKHZAD, O. C. Self-assembled targeted nanoparticles: evolution of technologies and bench to bedside translation. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 10, p. 1123-1134, 2011.

SIDHU, P. S.; GILKES, R. J.; POSNER, A. M. Mechanism of the low temperature oxidation of synthetic magnetites. **Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry**, v. 39, p. 1953-1958, 1977.

STEELE, R. **New Solar Cells from Mixed-Valent Metallic Compounds**. Disponível em <http://www.chemexplore.net/mixed-valent.htm>. Acessado em 27 de fevereiro de 2015.

STEITZ, B.; HOFMANN, H.; KAMAU, S. W.; HASSA, P. O.; HOTTIGER, M. O.; RECHENBERG, B.; HOFMANN-AMTENBRINK, M.; PETRI-FINK, A. Characterization of PEI-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for transfection: Size distribution, colloidal properties and DNA interaction. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, n. 1, p. 300-305, 2007.

SUGIMOTO, T. **Monodispersed Particles**. Amsterdam: Elsevier, 2001.

SWADDLE, T. W.; OLTMANN, P. Kinetics of the magnetite-maghemite-hematite transformation, with special reference to hydrothermal systems. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 58, n. 17, p. 1763-1772, 1980.

TANG, J.; MYERS, M.; BOSNICK, K. A.; BRUS, L. E. Magnetite Fe_3O_4 Nanocrystals: Spectroscopic Observation of Aqueous Oxidation Kinetics. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 30, p. 7501–7506, 2003.

THANH, N. T. K.; MACLEAN, N.; MAHIDDINE, S. Mechanisms of Nucleation and Growth of Nanoparticles in Solution. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 15, p. 7610–7630, 2014.

THEOPHANIDES, T. Fourier Transform Infrared Spectra of Calf Thymus DNA and its Reactions with Anticancer Drug cis-platin. **Applied Spectroscopy**, v. 35, n. 1, p. 461-465, 1981.

THOMAS, R.; PARK, I.-K.; JEONG, Y. Y. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Multimodal Imaging and Therapy of Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 8, p. 15910-15930, 2013.

TSAI, Z. T.; TSAI, F. Y.; YANG, W. C.; WANG, J. F.; LIU, C. L.; SHEN, C. R.; YEN, T. C. Preparation and characterization of ferrofluid stabilized with biocompatible chitosan and dextran sulfate hybrid biopolymer as a potential magnetic resonance imaging (MRI) T2 contrast agent. **Marine Drugs**, v. 10, n. 11, p. 2403-14, 2012.

TSAI, Z. T.; WANG, J. F.; KUO, H. Y.; SHEN, C. R.; WANG, J. J.; YEN, T. C. *In situ* preparation of high relaxivity iron oxide nanoparticles by coating with chitosan: A potential MRI contrast agent useful for cell tracking. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 322, n. 2, p. 208–213, 2010.

TSIEN, R. Y. The green fluorescent protein. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 509-544, 1998.

ÜNAL, B.; DURMUS, Z.; BAYKAL, A.; SÖZERI, H.; TOPRAK, M. S.; ALPSOY, L. L-Histidine coated iron oxide nanoparticles: Synthesis, structural and conductivity characterization. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 505, n. 1, p. 172–178, 2010.

VAN BEERS, B. E.; SEMPOUX, C.; MATERNE, R.; DELOS, M.; SMITH, A. M. Biodistribution of ultrasmall iron oxide particles in the rat liver. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 13, n. 1, p. 594–599, 2001.

VERGÉS, M. A.; COSTO, R.; ROCA, A. G. MARCO, J. F.; GOYA, G. F.; SERNA, C. J.; MORALES, M. P. Uniform and water stable magnetite nanoparticles with diameters around the monodomain–multidomain limit. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 41, n. 13, p. 134003, 2008.

VIALI, W. R.; ALCANTARA, G. B.; SARTORATTO, P. P. C.; SOLER, M. A. G.; MOSINIEWICZ-SZABLEWSKA, E.; ANDRZEJEWSKI, B.; MORAIS, P. C. Investigation of the Molecular Surface Coating on the Stability of Insulating Magnetic Oils. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 1, p. 179-188, 2010.

WAHAJUDDING; ARORA, S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. **International Journal of Nanomedicine**. v. 7, p. 3445-3471, 2012.

WANG, C.; DING, C.; KONG, M.; DONG, A.; QIAN, J.; JIANG, D.; SHEN, Z. Tumor-targeting magnetic lipoplex delivery of short hairpin RNA suppresses IGF-1R overexpression of lung adenocarcinoma A549 cells in vitro and in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 410, n. 3, p. 537-542, 2011.

WAN, J.; CHEN, X.; WANG, Z.; YANG, X.; QIAN, Y. A soft-template-assisted hydrothermal approach to single-crystal Fe₃O₄ nanorods. **Journal of Crystal Growth**, v. 276, n. 3, p. 571–576, 2005.

WANG, X.; WEI, F.; LIU, A.; WANG, L.; WANG, J.; REN, L.; LIU, W.; TU, Q.; LI, L.; WANG, J. Cancer stem cell labeling using poly(l-lysine)-modified iron oxide nanoparticles. **Biomaterials**, v. 33, n. 14, p. 3719–3732, 2012.

WEBB, C. D.; DECATUR, A.; TELEMAN, A.; LOSICK, R. Use of green fluorescent protein for visualization of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 20, 1995.

WEST, A. R. **Solid State Chemistry and its Applications**, 2nd Edition. New Delhi: Wiley, 2014.

WILLIAMS, D. B.; CARTER, C. B. **Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science**. New York: Springer, 2009.

WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, p. 397–415, 2008.

YU, B.; HUANG, W.-J.; CHIOU, P.W.-S. Bioavailability of iron from amino acid complex in weanling pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 86, n. 1-2, p. 39-52, 2000.

ZHANG, B.; YAN, N. Towards Rational Design of Nanoparticle Catalysis in Ionic Liquids. **Catalysts**, v. 3, n. 1, p. 543-562, 2013.

ZHOU, J.; HUANG, L.; WANG, W.; PANG, J.; ZOU, Y.; SHUAI, X.; GAO, X. Prostate cancer targeted MRI nanoprobe based on superparamagnetic iron oxide and

copolymer of poly(ethylene glycol) and polyethyleneimin. **Chinese Science Bulletin**, v. 54, n. 18, p. 3137-3146, 2009.

ZHOU, J.; SHUM, K. T.; BURNETT, J. C.; ROSSI, J. J. Nanoparticle-Based Delivery of RNAi Therapeutics: Progress and Challenges. **Pharmaceuticals**, v. 6, p. 85-107, 2013.

ZIMMER, M. Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior. **Chemical Reviews**, n. 102, p. 759–781, 2002.