



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

LEANDRO CARNEIRO FONSECA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITOS DE ÓXIDO DE GRAFENO
DECORADO COM NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA MESOPOROSA COMO
NANOCARREADORES DE FÁRMACOS: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E
INTERAÇÕES COM SISTEMAS BIOLÓGICOS**

CAMPINAS

2019

LEANDRO CARNEIRO FONSECA

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITOS DE ÓXIDO DE GRAFENO
DECORADO COM NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA MESOPOROSA COMO
NANOCARREADORES DE FÁRMACOS: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E
INTERAÇÕES COM SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de
Química da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Doutor em Ciências**

Orientador: Prof. Dr. Oswaldo Luiz Alves

**O arquivo digital corresponde à versão final da Tese defendida pelo aluno
Leandro Carneiro Fonseca e orientada pelo Prof. Dr. Oswaldo Luiz Alves.**

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

F733d Fonseca, Leandro Carneiro, 1989-
Desenvolvimento de nanocompósitos de óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica mesoporosa como nanocarreadores de fármacos : síntese, caracterização e interações com sistemas biológicos / Leandro Carneiro Fonseca. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Oswaldo Luiz Alves.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Sílica. 2. Grafeno. 3. Camptotecina. 4. Hemólise. 5. Proteínas. I. Alves, Oswaldo Luiz, 1947-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Development of nanocomposites of graphene oxide decorated with mesoporous silica nanoparticles as drug nanocarriers : synthesis, characterization and interactions with biological systems

Palavras-chave em inglês:

Silica
Graphene
Camptothecin
Hemolysis
Proteins

Área de concentração: Química Inorgânica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Oswaldo Luiz Alves [Orientador]
Juliano Alves Bonacin
Pedro Paulo Corbi
Ruben Dario Sinisterra Millán
Tereza da Silva Martins

Data de defesa: 08-08-2019

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)
- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3600-847X>
- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1432758345993489>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Oswaldo Luiz Alves (Orientador)

Prof. Dr. Juliano Alves Bonacin (UNICAMP)

Prof. Dr. Pedro Paulo Corbi (UNICAMP)

Profa. Dra. Tereza da Silva Martins (UNIFESP)

Prof. Dr. Ruben Dario Sinisterra Millán (UFMG)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pelo aluno Leandro Carneiro Fonseca, aprovada pela Comissão Julgadora em 08 de agosto de 2019.

*Dedico essa tese aos meus pais Gisele e Marco Aurélio
pelo amor incondicional, ensinamentos e educação.
Esse foi o sólido alicerce que proporcionou essa
grande conquista. Essa vitória é nossa!*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Gisele e Marco Aurélio, pelos ensinamentos, educação, exemplos de vida e por ter contribuído para que conseguisse alcançar essa vitória. Tudo começou com eles e sou eternamente grato a isso!

Esse trabalho foi também realizado em memória à minha tia Denise do Santos Carneiro. A razão pela qual ela foi embora desse planeta é uma das motivações desse projeto: o tratamento do câncer. Felizmente hoje ela está ao lado de sua mãe, minha amada vó Jina, para quem também dedico esse trabalho!

À minha vó Natália, aos irmãos Adler, Thainá, Juninho, tios Miguel, Márcia e Thersio, meus primos Dhuan, Tales e William, pelas boas energias e pelo apoio e amor de família, fonte de inspiração para os desafios que encontramos na vida.

À Juliana Yamada, pelo companheirismo, amor e apoio. Seu caráter e personalidade são motivos de inspiração de vida.

Aos grandes amigos de Praia Grande Flavio Uliana, Daniel Nunes, Fabio Gusmão, Rafael Bratifiche, Marcus Casasco, Renan Joly e Rodrigo Guimarães pela amizade pura e verdadeira, nossa agradável convivência e pelo fato de considerá-los como segunda família.

Aos amigos e mentores de vida Wagner Gonzaga, Jéssica Ispada e Andreza Ishikawa, pela emblemática amizade, pelos conselhos, orientações. As grandes tomadas de decisão de vida tiveram influência deles, incluindo aqui ser um aluno de doutorado.

Ao orientador Professor Doutor Oswaldo Luiz Alves, pela orientação, ensinamentos, aprendizado e por sempre nos direcionar a caminho de fazer ciência em sua essência: observar os fenômenos, criar uma hipótese, testá-la, compreendê-la e gerar conhecimento novo. Com esse perfil somos formados e sou grato por isso.

Aos professores Ítalo Odone Mazali, Claudio Tormena, Nelson Dúran e Wagner Fávoro, que contribuíram direta e indiretamente na concretização desse trabalho com conhecimento, ideias e experimentos.

Aos professores Juliano Alves Bonacin, Pedro Paulo Corbi, Tereza da Silva Martins e Ruben Dario Sinisterra Millán pela excelente contribuição no processo de avaliação da presente tese de doutorado como membros da banca.

Aos funcionários do Instituto de Química Claudia (DLS/Zeta), Milene (raman), Sonia (infravermelho), Gustavo (RMN), Anderson (RMN), Renata (DRX) e Douglas (TEM/AFM), pela excelente contribuição na aquisição de espectros, imagens de microscopia e treinamentos em técnicas de caracterização.

À equipe de pesquisa do LNNano-CNPEM Diego Stéfani, Lidiane Franqui e Ariane Garcia, pela importante parceria na realização dos experimentos biológicos in vitro e pelo apoio científico e tecnológico que impactaram positivamente esse trabalho.

À Agência de Inovação Inova Unicamp, que participou ativamente na transformação desse trabalho em um importante pedido de patente.

Aos grandes amigos que tive a oportunidade de conhecer durante a jornada de 7 anos no LQES: Luis Visani, Maciel Menezes, Carlos Henrique, Marcelo de Sousa, Djalma Lucas, Ana Carolina Mazarin, Ana Paula Monteiro, Ricardo Milian, Renier Arabolla, Yodalgis Mosqueda, Paulo Sérgio Amaral, Amauri de Paula, Camila Pedroso, Mateus Batista Simões e Rafaella do Nascimento, pela agradável convivência que torna leve e divertido o ambiente de trabalho. Juntos tivemos grandes realizações e momentos memoráveis em Campinas.

Aos grandes companheiros de república Charles, Diego Chavez, Cléber Barros, Cassio Lazari, João, Gabriel, Otávio, Maiki, Elielton, Felipe Scarpz, Felipe Silva, André, Danilo e Ewerton, pela agradável convivência e pelos momentos de lazer em Campinas.

Em memória ao grande treinador de natação Daniel Magalhães, pelos ensinamentos desse esporte que se tornou paixão pessoal e filosofia para lidar da melhor maneira com os desafios da vida, superação de metas e limites pessoais e profissionais. Esporte é fonte de energia e bem-estar.

À CAPES pelo financiamento da bolsa de doutorado.

À Secretaria de Pós-Graduação do IQ pela cessão de recursos financeiros que proporcionaram a apresentação desse trabalho em um importante congresso internacional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

A camptotecina (CPT) é um potente fármaco antitumoral, motivando o desenvolvimento de nanomateriais carreadores como nanopartículas de sílica mesoporosa (NSMs), óxido de grafeno (GO) e uma nova família de GO decorado com NSMs (nanocompósitos GO-NSMs) para a resolução de grandes desafios que essa molécula apresenta: baixa solubilidade no sangue, condições farmacocinéticas desfavoráveis e problemas de biodistribuição nos organismos. Sabe-se também que as nanopartículas de sílica e muitos materiais à base de óxido de grafeno são, isoladamente, conhecidos pelo elevado teor de hemólise e significativa interação com proteínas (efeito corona). Os efeitos hemolíticos e a adsorção proteica relacionada aos mecanismos biológicos para remoção de corpos estranhos inserem o GO e NSMs (isentas de funcionalização externa) como nanocarreadores de elevado risco toxicológico. Dessa maneira, foi investigada a possibilidade de interação GO-NSM visando diminuição desses efeitos, melhorar a biocompatibilidade através de um efeito sinérgico proveniente da mistura de ambos os tipos de nanomateriais. Essa interação visa obter os novos nanocompósitos e solucionar os desafios mencionados que a camptotecina apresenta do ponto de vista de aplicação antitumoral. O conjunto de técnicas de caracterização compreendendo as espectroscopias ultravioleta visível (UV-Vis) e ressonância magnética nuclear (RMN), a difratometria de raios X (DRX), termogravimetria (TG) e primeira derivada das curvas termogravimétricas (DTG), potencial zeta (PZ), análise de área superficial e porosidade (AASP), a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia de força atômica (MFA) comprovam a obtenção desses sistemas e confirmam o encapsulamento/adsorção de camptotecina nos nanomateriais envolvidos. Os ensaios de liberação mostram a rápida e prolongada liberação, respectivamente, pela sílica e pelos GO/GO-NSMs, sendo mais rápida em pH 7,4 e mais vagarosa em pH 5,0 em todas as situações. O GO-NSM mostrou as melhores propriedades de entrega dentre os três nanocarreadores. Os resultados sugerem, ainda, interações químicas fármaco-nanocarreador como dependentes do pH e da natureza do nanomaterial, mostrando o GO-NSM como potencial candidato às aplicações antitumorais com menores riscos de toxicidade.

ABSTRACT

Camptothecin (CPT) is a potent antitumor drug, motivating the development of carrier nanomaterials such as mesoporous silica nanoparticles (MSNs), graphene oxide (GO) and a new family of GO decorated with MSNs (GO-MSN nanocomposites) for solving important challenges of this molecule: low blood solubility, unfavorable pharmacokinetic conditions and problems of biodistribution in living organisms. It is also known that silica nanoparticles and many graphene oxide based materials are, in isolation, known for the high hemolysis rate and significant interaction with proteins (corona effect). The hemolytic effects and protein adsorption related to the biological mechanisms for removal of foreign bodies insert the GO and MSNs (free from external functionalization) as nanocarriers of high toxicological risk. In this way, it was investigated the possibility of GO-MSN interaction aiming to decrease these effects and to improve the biocompatibility through a synergistic effect from the mixture of both types of nanomaterials. This interaction aims to obtain new nanocomposites and focus to solve the mentioned application challenges of camptothecin. The set of characterization techniques comprising the ultraviolet visible (UV-Vis) and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopies, X ray diffractometry (XRD), thermogravimetric analysis (TGA) and first derivative of TGA curves (DTG), zeta potential (ZP), analysis of surface area and porosity (ASAP), transmission electron microscopy (TEM) and atomic force microscopy (AFM) confirm the obtainment of these systems, and corroborate to the encapsulation/adsorption of camptothecin in the involved nanomaterials. The release assays show the rapid and prolonged release, respectively, by silica and GO/GO-MSNs, being faster at pH 7.4 and slower at pH 5.0 in all situations. GO-MSN showed the best delivery properties among the three nanocarriers. The results also suggest drug-nanocarrier chemical interactions as dependent on pH and the nature of the nanomaterial, showing GO-MSN as a potential candidate for antitumor applications with lower toxicity risks.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura molecular da camptotecina (CPT) em suas duas formas lactona (CPT-lac) e carboxilato (CPT-carb ⁻) em equilíbrio químico dependente do pH.	20
Figura 2 Esquema de obtenção das nanopartículas de sílica contendo grupos fenil internos e funções amino externas (NSMs) e respectivas estruturas moleculares dos materiais intermediário e final (A); esquema de obtenção dos nanocompósitos de óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica mesoporosa (GO-NSMs) e respectivas estruturas moleculares dos materiais intermediário e final (B). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).	33
Figura 3 Curvas termogravimétricas (TG) das nanopartículas de sílica contendo grupos fenil internos na presença de CTAB (HO-NSM-CTAB); nanopartículas de sílica contendo grupos fenil internos na ausência de CTAB (HO-NSM); e das nanopartículas de sílica contendo grupos fenil internos e funções amino externas na ausência de CTAB (NSM). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).	39
Figura 4 Curvas de primeira derivada das curvas termogravimétricas (DTG) das nanopartículas de sílica contendo grupos fenil internos na presença de CTAB (HO-NSM-CTAB); nanopartículas de sílica contendo grupos fenil internos na ausência de CTAB (HO-NSM); e das nanopartículas de sílica contendo grupos fenil internos e funções amino externas na ausência de CTAB (NSM). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).	40
Figura 5 Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio das nanopartículas de sílica detendo grupos fenil internos na presença de CTAB (HO-NSM-CTAB); e das nanopartículas de sílica detendo grupos fenil internos e funções amino externas na ausência de CTAB (NSM). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).	41
Figura 6 Gráfico de distribuição de diâmetro de poros das nanopartículas de sílica detendo grupos fenil internos na presença de CTAB (HO-NSM-CTAB); e das nanopartículas de sílica detendo grupos fenil internos e funções amino externas na ausência de CTAB (NSM). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).	42
Figura 7 Espectros de RMN ¹³ C (A) e ²⁹ Si (B) das nanopartículas de sílica detendo grupos fenil internos (HO-NSM); e das nanopartículas de sílica detendo grupos fenil internos e funções amino externas (NSM). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).	44

Figura 8 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas de sílica detendo grupos fenil internos e funções amino externas (NSM). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).....	45
Figura 9 Gráfico de distribuição dos tamanhos (diâmetro) das nanopartículas de sílica detendo grupos fenil internos e funções amino externas (NSM). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).	46
Figura 10 Difratoograma de raios X das nanopartículas de sílica (NSMs). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).	47
Figura 11 Espectro vibracional de deslocamento Raman do grafite e óxido de grafeno (GO). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).....	48
Figura 12 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do óxido de grafeno (GO). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).....	49
Figura 13 Difratoograma de raios X do óxido de grafeno (GO). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).....	50
Figura 14 Imagem de microscopia de força atômica (MFA) do óxido de grafeno (GO). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).....	51
Figura 15 Histograma de altura das folhas do óxido de grafeno (GO). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).....	52
Figura 16 Difratoogramas de raios X do óxido de grafeno (GO) e dos nanocompósitos de óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica (GO-NSMs). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).	54
Figura 17 Curvas termogravimétricas (TG) do óxido de grafeno (GO) e dos nanocompósitos de óxido de grafeno decorados com nanopartículas de sílica (GO-NSMs). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).	55
Figura 18 Curvas de primeira derivada das curvas termogravimétricas (DTG) do óxido de grafeno (GO) e dos nanocompósitos de óxido de grafeno decorados com nanopartículas de sílica (GO-NSMs). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).	56
Figura 19 Espectro de RMN ¹³ C do óxido de grafeno (GO). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).....	57
Figura 20 Espectro de RMN ¹³ C do nanocompósito GO-NSM ₁₀ . (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).....	58

Figura 21 Espectro de RMN ¹³ C do nanocompósito GO-NSM ₃₀ . (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).....	59
Figura 22 Espectro de RMN ¹³ C do nanocompósito GO-NSM ₅₀ . (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).....	60
Figura 23 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do nanocompósito GO-NSM ₁₀ . (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).....	62
Figura 24 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do nanocompósito GO-NSM ₃₀ . (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).....	63
Figura 25 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do nanocompósito GO-NSM ₅₀ . (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).....	64
Figura 26 Mecanismo proposto para a redução do óxido de grafeno pelos grupos aminopropil das nanopartículas de sílica mesoporosa. (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).....	65
Figura 27 Gráfico de hemólise pelo óxido de grafeno (GO) e nanocompósitos de óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica (GO-NSMs). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).....	68
Figura 28 Imagens da hemoglobina liberada após hemólise pelo óxido de grafeno (GO) e nanocompósitos de óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica (GO-NSMs). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).....	69
Figura 29 Análise de eletroforese em SDS-PAGE de proteínas corona fortemente adsorvidas e extraídas da superfície do óxido de grafeno (GO) e dos nanocompósitos de óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica (GO-NSMs). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al. ⁷⁵).....	72
Figura 30 Espectro UV-Vis da Camptotecina (CPT) adquirido em metanol.	74
Figura 31 Espectro UV-Vis das nanopartículas de sílica contendo camptotecina encapsulada (NSM+CPT) adquirido em água.....	75
Figura 32 Espectros UV-Vis do óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno contendo camptotecina adsorvida (GO+CPT) adquiridos em água.....	76
Figura 33 Espectros UV-Vis do óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica e contendo camptotecina adsorvida (GO-NSM ₁₀ +CPT), adquiridos em água.....	78
Figura 34 Difractogramas de raios X das nanopartículas de sílica isenta (NSM) e contendo a camptotecina (NSM+CPT).....	79

Figura 35 Difrátogramas de raios X do óxido de grafeno isento (GO) e contendo a camptotecina (GO+CPT).....	80
Figura 36 Difrátogramas de raios X do óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica isento (GO-NSM ₁₀) e contendo a camptotecina (GO-NSM ₁₀ +CPT).	81
Figura 37 Efeitos estruturais resultantes da adição de camptotecina (CPT) e funcionalização de NSMs no GO e GO-NSM ₁₀	82
Figura 38 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas de sílica encapsuladas com camptotecina (NSM+CPT).	83
Figura 39 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do óxido de grafeno contendo camptotecina adsorvida (GO+CPT).....	84
Figura 40 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica mesoporosa contendo camptotecina adsorvida (GO-NSM ₁₀ +CPT).....	85
Figura 41 Gráfico de liberação de camptotecina em função do tempo pelas nanopartículas de sílica (NSMs), óxido de grafeno (GO) e nanocompósito (GO-NSM ₁₀) em pH 7,4 e 5,0.	88
Figura 42 Influência do pH na perturbação do equilíbrio químico entre as espécies camptotecina lactona (CPT-lac) e camptotecina carboxilato (CPT-carb ⁻) em dinâmicas interações intermoleculares com as nanopartículas de sílica (NSMs) (A), óxido de grafeno (GO) (B) e nanocompósito de óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica (GO-NSM ₁₀) (C).	91
Figura 43 Influência do pH 7,4 na estrutura química da camptotecina liberada pelo óxido de grafeno (GO).....	92
Figura 44 Influência do pH 7,4 na estrutura química da camptotecina liberada pelo óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica (GO-NSM ₁₀).....	93
Figura 45 Influência do pH 7,4 na estrutura química da camptotecina liberada pelas nanopartículas de sílica (NSM).	94
Figura 46 Influência do pH 5,0 na estrutura química da camptotecina liberada pelo óxido de grafeno (GO).....	95
Figura 47 Influência do pH 5,0 na estrutura química da camptotecina liberada pelo óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica (GO-NSM ₁₀).....	96

Figura 48 Influência do pH 5,0 na estrutura química da camptotecina liberada pelas nanopartículas de sílica (NSM).97

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	18
1.1. O Câncer, os fármacos antitumorais e a camptotecina (CPT)	18
1.2. Interação de nanoestruturas com biosistemas: a interface entre a química e a biologia.....	21
1.3. O óxido de grafeno (GO): interação com sistemas biológicos e fármaco camptotecina (CPT)	22
1.4. Nanopartículas de sílica mesoporosa (NSMs): interação com sistemas biológicos e fármaco camptotecina (CPT).....	23
1.5. Nanocompósitos de óxido de grafeno decorados com nanopartículas de sílica mesoporosa (GO-NSMs): um nanomaterial emergente	25
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1. Síntese das nanopartículas de sílica mesoporosa com grupos fenil internos e funções amino externas (NSMs)	29
3.1.1. Extração do molde orgânico.....	30
3.2. Síntese do óxido de grafeno (GO).....	30
3.3. Síntese dos nanocompósitos de óxido de grafeno decorados com nanopartículas de sílica mesoporosa (GO-NSMs).	31
3.4. Ensaio hemolítico	33
3.5. Ensaio de interação com proteínas (efeito corona)	34
3.6. Interação de camptotecina nos nanomateriais NSMs, GO e GO-NSM _x	35
3.7. Estudos de liberação prolongada de camptotecina dos materiais NSM+CPT, GO+CPT e GO-NSM _x +CPT	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1. Nanopartícula de sílica mesoporosa com grupos fenil internos e funções amino externas (NSMs)	38
4.2. Óxido de grafeno (GO) e nanocompósitos de óxido de grafeno decorados com nanopartículas de sílica mesoporosa (GO-NSMs)	47
4.3. Ensaio hemolítico	66
4.4. Ensaio de interação com proteínas (efeito corona)	69
4.5. Interação de camptotecina nos nanomateriais NSMs, GO e GO-NSM ₁₀	72

4.6. Estudos de liberação de camptotecina nos nanomateriais NSM+CPT, GO+CPT e GO-NSM ₁₀ +CPT.....	86
5. CONCLUSÃO.....	98
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
ANEXO.....	106

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Câncer, os fármacos antitumorais e a camptotecina (CPT)

O câncer é uma das maiores causas mundiais de morte abrangendo público de diversas idades, sexo, etnias e países¹. O conjunto de técnicas atuais de tratamento dessa doença incluem a radioterapia, cirurgia para remoção de tumores, imunoterapia e quimioterapia². Esta última, sendo o tipo de tratamento antitumoral mais comum, consiste na aplicação de fármacos no combate às células cancerígenas. Nesse contexto, alguns dos desafios vigentes na utilização desses ativos biológicos incluem:

- sua baixa solubilidade no sangue, um fluido hidrofílico, resultando em insuficiente captação pelas células tumorais³⁻⁵ e demandando aumento na concentração da dose aplicada;

- a perda de atividade biológica logo após a administração intravenosa, a exemplos de fármacos que são inativos nas condições fisiológicas do sangue⁶, também demandando o aumento de concentração nas doses aplicadas;

- a biodegradabilidade do fármaco livre durante sua aplicação, levando-o, também, à perda de atividade biológica⁶;

- a deficiente biodistribuição no organismo de modo que o fármaco livre aplicado atinge não somente tecidos afetados por tumor, mas também tecidos saudáveis, levando a sérios efeitos colaterais⁶;

- condições farmacocinéticas desfavoráveis, isto é, o fármaco aplicado é rapidamente eliminado do organismo através de diversas rotas de excreção, demandando aumento na concentração da dose ou sua aplicação contínua⁶.

Alguns fármacos antitumorais hidrofóbicos como a curcumina (Cur)⁷, camptotecina (CPT)⁸, entre outras, apresentam desafios como esses citados acima, o que motivou nosso grupo a escolher um deles, a camptotecina, para solucionar alguns desses problemas.

A CPT é uma substância descoberta em 1966 extraída naturalmente da erva *Camptotheca acuminata*⁹ e foi reportada como um potente fármaco antitumoral detendo importante ação na inibição da enzima DNA topoisomerase I (TOPO I)¹⁰. Mais especificamente, a TOPO I age enzimaticamente na relaxação do DNA anteriormente à sua replicação, transcrição e tradução, clivando uma de suas fitas, restaurando a ligação e repetindo-se o ciclo¹¹. Nesse contexto a camptotecina

interage com a TOPO I impedindo a restauração da ligação no DNA, induzindo consequentemente a apoptose celular. A CPT é, ainda, molécula análoga a fármacos aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) incluindo o topotecan e irinotecan⁹ e a substâncias incluídas em fases pré-clínicas como por exemplo o lurtotecan e silatecan¹². Nesse contexto, a camptotecina e seus análogos são descritos como fármacos aplicados para um amplo espectro de tipos de tumores¹³ que incluem câncer cervical, de ovário, gástrico, mama, pele, pulmão, dentre outros¹⁴. Assim, quando aplicado em pacientes, esse fármaco apresenta um pico de aumento de concentração no plasma que rapidamente decai em função de sua absorção pelo corpo, sendo amplamente absorvido pelos tecidos, sistema entero-hepático (intestino e fígado) e/ou pelos eritrócitos¹⁵. Do ponto de vista metabólico, esse fármaco antitumoral é metabolizado por uma diversidade de enzimas animais ou humanas, dentre elas as esterases¹⁵, sendo posteriormente excretado pela bile, fezes e urina de animais e humanos¹⁵. Dessa maneira, uma vez aplicada, a camptotecina é rapidamente metabolizada e excretada do organismo, reduzindo-se a eficiência em sua atividade biológica e demandando esforços no sentido de prolongar sua liberação para aumento do tempo de ação, distribuição e seletividade na aplicação antitumoral.

Do ponto de vista químico e estrutural, a CPT é uma molécula compreendendo funções orgânicas como a lactama, anéis aromáticos conjugados, hidroxilas e lactona (lac) e sua estrutura molecular é mostrada na Figura 1. A função orgânica lac mantém a atividade biológica desse fármaco em pH 5,0 típico dos endossomas das células cancerígenas. Em pH 7,4 atrelado às condições fisiológicas do organismo, a função lactona é hidrolisada para formação do carboxilato (carb⁻), resultando em inatividade antitumoral^{13,16-18}. O pH, portanto, regula significativamente a atividade biológica desse fármaco existente na forma lactona ativa (CPT-lac) em equilíbrio químico com a forma carboxilato inativa (CPT-lac⁻).

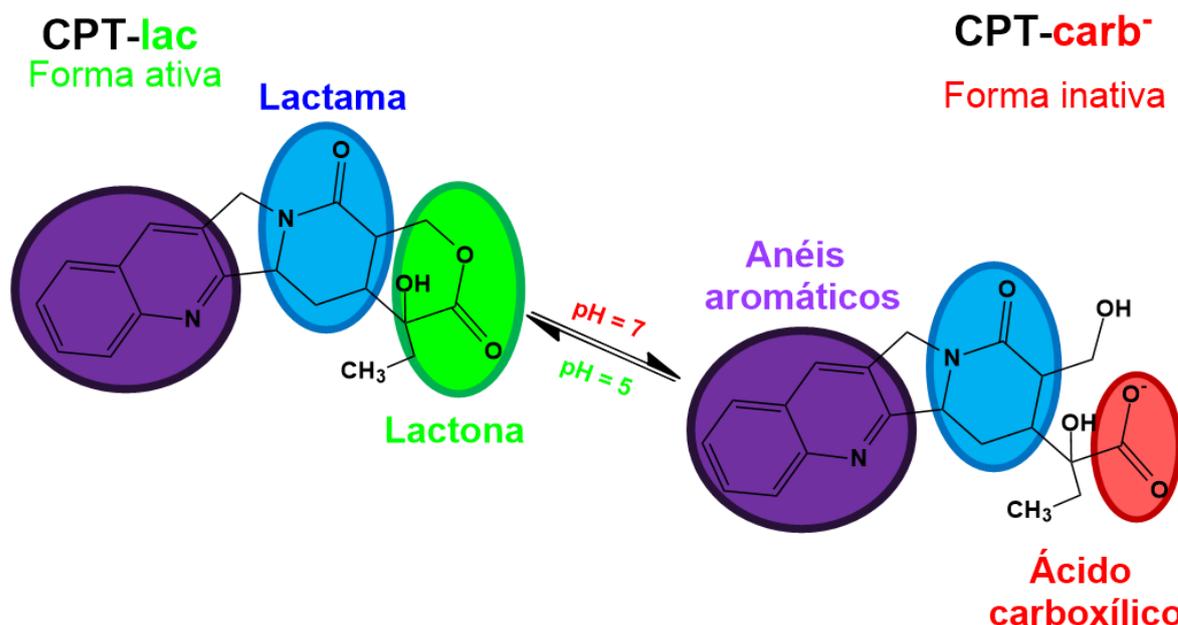


Figura 1 Estrutura molecular da camptotecina (CPT) em suas duas formas lactona (CPT-lac) e carboxilato (CPT-carb⁻) em equilíbrio químico dependente do pH.

Dessa maneira, significativos esforços são atualmente direcionados no desenvolvimento de nanocarreadores para solução dos problemas como a baixa solubilidade de fármaco no sangue, a rápida liberação que caracteriza uma condição farmacocinética desfavorável e as condições deficientes de biodistribuição, desafios apresentados pela camptotecina no sentido de sua aplicação antitumoral, conforme comentado acima. Nesse contexto, os nanomateriais podem transportar efetivamente essas moléculas até as células cancerígenas, facilitando sua entrega e captação intracelular¹⁹, prolongando seu tempo de liberação e otimizando sua distribuição no corpo. Além disso, os referidos nanomateriais podem ser desenvolvidos como plataforma de elevada capacidade de encapsulamento/adsorção de fármacos antitumorais²⁰⁻²², importante propriedade para otimização da quantidade dessa substância no interior das células. Tratando-se da aplicação dessas plataformas nanoestruturadas em sistemas biológicos, a interação de nanoestruturas com sistemas biológicos passa a ser relevante do ponto de vista de toxicidade ao organismo vivo principalmente quando aplicados como carreadores moleculares em processos de *drug delivery* na qual o meio intravenoso é uma das principais rotas de aplicação. Dessa maneira, a compreensão da interação nanoestrutura-biosistemas é assunto crucial quando estudamos nanomateriais carreadores de fármacos e será discutido no próximo tópico.

1.2. Interação de nanoestruturas com biosistemas: a interface entre a química e a biologia

Apesar de importantes na resolução dos desafios de aplicação de fármacos antitumorais citados no tópico anterior, os nanomateriais em si também apresentam problemas quando aplicados intravenosamente. Mais especificamente, considerando-se o fluido sanguíneo humano como meios de circulação do nanomaterial, faz-se necessário analisar a maneira pela qual este interage com os corpos celulares presentes, compreendendo principalmente os glóbulos vermelhos (também chamados de eritrócitos ou hemácias), os glóbulos brancos (ou leucócitos) e as plaquetas (ou trombócitos)²³⁻²⁵. Adicionalmente, é importante compreender as interações nanomaterial-proteína (efeito corona) no intuito de prever fenômenos bioquímicos e físico-químicos atrelados à toxicidade do material. Nesse contexto, a interação de nanoestruturas com proteínas do sangue corresponde outra área de estudo da nanomedicina que investiga, dentre as inúmeras possibilidades de estudos, a relação do efeito de adsorção proteica na superfície de nanomateriais na reação do sistema imunológico, uma vez que corpos estranhos do sangue (em alusão ao nanocarreador) podem ser eliminados da corrente sanguínea através de sua interação com proteínas do sistema imunológico denominadas opsoninas, formando-se um complexo nanocarreador-opsonina. Este último é reconhecido por macrófagos (um tipo de leucócito) e posteriormente fagocitado pela referida célula branca em um mecanismo denominado opsonização, diminuindo-se o tempo de circulação sanguínea do nanocarreador e, conseqüentemente, diminuindo-se a probabilidade de alcance à célula alvo^{26,27}. Dessa maneira, estudos relacionados à interação entre nanomateriais e proteínas fornecem informações importantes para prévias compreensões das possíveis reações bioquímicas e respostas biológicas geradas após sua aplicação no sangue e podem servir como mimetização dos mecanismos de opsonização²⁶⁻²⁹. No grupo dos principais nanocarreadores atualmente empregados como carreadores de fármacos são incluídos o óxido de grafeno (GO)³⁰⁻³², as nanopartículas de sílica mesoporosa (NSMs)³³⁻³⁵ e uma nova família de nanocompósitos à base de óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica (GO-NSMs)^{36,37} resultantes da mistura daqueles últimos. Discussões mais detalhadas sobre as propriedades físico-químicas e estruturais desses três nanomateriais serão discutidos nos tópicos a seguir.

1.3. O óxido de grafeno (GO): interação com sistemas biológicos e fármaco camptotecina (CPT)

Dentre os materiais estudados na interface da química e biologia, tem-se o óxido de grafeno (GO) como motivação de estudos científicos relacionados. O GO é um material bidimensional de carbono compreendendo uma região na qual são encontrados átomos de carbono em hibridização sp^2 (semelhante à estrutura intrínseca do grafeno)³⁸ e outra onde são encontrados carbonos sp^3 associados a funções oxigenadas, conforme seu modelo estrutural mais aceito, descrito por Lerf Klinowski^{38,39}. Além disso, o GO detém grupos funcionais epóxi e hidroxila localizados em seu plano basal e grupos carbonila e carboxilas associados preferencialmente às bordas das folhas bidimensionais, conferindo-lhe possibilidade de diversas funcionalizações no processo de aquisição de novas propriedades físico-químicas³⁹. O referido material detém, intrinsecamente, propriedades interessantes, como capacidade de formar dispersões em diversos solventes, alta resistência mecânica, significativa área superficial teórica ($2630 \text{ m}^2/\text{g}$) e transparência óptica^{40,41}. No entanto, sua aplicação e/ou interação com sistemas biológicos é ainda uma nova tendência e, nesse panorama, o óxido de grafeno é um potencial candidato devido à sua alta biocompatibilidade e baixa toxicidade quando funcionalizado com moléculas-chave ou nanopartículas, somados ao fato de que materiais de carbono são geralmente relacionados como seguros, uma vez que o carbono é referenciado como compatível com sistemas vivos⁴².

Nesse sentido, existem trabalhos relacionadas a nanocompósitos de GO funcionalizado utilizados como plataforma para carreamento de fármacos (*drug delivery*), imageamento de células e interações com sistemas biológicos^{42,43}. Tratando-se da compatibilidade do óxido de grafeno com células vermelhas no sangue, os resultados apresentados na literatura são ainda controversos. Mais especificamente, Sasidharan et al.⁴⁴ publicaram um trabalho sobre GO que não apresentou efeitos hemolíticos em faixas de concentração entre 0 e $75 \mu\text{g}/\text{mL}$. Similarmente, Wu et al.⁴⁵ sintetizaram óxido de grafeno cujo teor hemolítico na faixa de concentração entre 0 e $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ foi menor do que 1,5%. No entanto, Liao et al.⁴⁶ produziram nanoestruturas de óxido de grafeno variando-se o tamanho das folhas mediante aplicação de ultrassom de alta potência. Os resultados reportados mostram hemólise entre 50 e 90% na faixa de concentração compreendida entre 0 e

200 µg/mL. Outro estudo de Singh et al.⁴⁷ exhibe a síntese de óxido de grafeno que, imediatamente na concentração de 10 µg/mL apresenta aproximadamente 60 % de hemólise. Sabe-se que os parâmetros sintéticos detêm relação com as propriedades físico-químicas obtidas do óxido de grafeno (distribuição de cargas, tamanho, morfologia, funções orgânicas, etc.) e, estas por sua vez, parecem ter relação com as possibilidades de interação com as hemácias, explicando a divergência dos resultados nesse tipo de estudo. Nos trabalhos mencionados, a maioria dos autores concorda que um dos possíveis aspectos do óxido de grafeno relacionados à lise das células vermelhas é atração eletrostática dos grupos hidroxila (na forma de ânions O^- derivados da desprotonação dos grupos OH) e ácidos carboxílicos (na forma do ânion COO^- derivado da desprotonação dos grupos COOH) carregados negativamente na superfície do GO com as funções fosfatidilcolina carregadas positivamente na membrana das hemácias.

Do ponto de vista de interação do óxido de grafeno com proteínas, estudos da literatura sugerem significativa atração desse nanomaterial com os polipeptídeos⁴⁸⁻⁵⁰, demandando esforços no desenvolvimento de novos nanomateriais à base de GO detendo interações reduzidas com as referidas macromoléculas.

A utilização do óxido de grafeno como carreador de fármacos como a camptotecina é, também, uma nova tendência científica ainda pouco explorada. Trabalhos relacionados a materiais de GO compreendendo o fármaco camptotecina são ainda recentes e mostram resultados promissores do ponto de vista de elevada capacidade de adsorção em pelo menos 50%^{51,52}. Devido ao início das pesquisas nessa direção, a interação do óxido de grafeno com fármacos antitumorais incluindo a camptotecina são também pouco conhecidas e demandam esforços na compreensão química dos fenômenos envolvidos, caracterizando um dos objetivos do presente trabalho.

1.4. Nanopartículas de sílica mesoporosa (NSMs): interação com sistemas biológicos e fármaco camptotecina (CPT)

As nanopartículas de sílica, por sua vez, possuem propriedades interessantes no que se refere à sua aplicação como sistemas de *drug delivery*, visto que sua estrutura esférica serve como compartimento para encapsulamento de fármacos, detêm grupos silanóis Si-OH superficiais que possibilitam a aquisição de novas e

importantes propriedades físico-químicas e compreendem elevada área superficial ($> 900 \text{ m}^2/\text{g}$) e elevado volume de poros ($> 0,9 \text{ cm}^3/\text{g}$) que permitem a incorporação de moléculas em seus mesoporos⁵³⁻⁵⁶. O interior das nanopartículas pode, ainda, ser funcionalizado com funções orgânicas hidrofóbicas que interagem substancialmente com fármacos antitumorais (a maioria, também de natureza hidrofóbica), garantindo sua retenção e integridade físico-química até serem liberados. Externamente à superfície das nanopartículas, podem também serem enxertadas funções orgânicas de origem hidrofílica, importantes para a estabilidade coloidal em fluidos biológicos como o sangue (também hidrofílico)⁷, podendo ser destacadas nesse grupo as espécies que proporcionam possibilidades de formação de ligações covalentes e/ou interações eletrostáticas que proporcionam funcionalização das nanopartículas em superfície de nanomateriais suporte como o óxido de grafeno^{42,43,57}. Embora referenciadas como “seguras” pela agência americana *Food and Drugs Administration* (FDA), as nanopartículas de sílica merecem atenção no contexto de toxicidade em relação a biosistemas. Mais especificamente, sabe-se da significativa afinidade química dos grupos silanóis pelos grupos fosfatidilcolina presentes na membrana celular de hemácias, relacionada a elevados efeitos hemolíticos e, portanto, atrelada a baixa biocompatibilidade. Não obstante, a nanopartícula de sílica isenta de funcionalização na superfície externa necessita ser submetida a um processo de pós-modificação ou ser adicionada em nanomateriais biocompatíveis de modo a possibilitar sua aplicação intravenosa e, conforme é relatada, a funcionalização das referidas nanopartículas permite “blindar” ou reduzir a quantidade de grupos silanóis (carregados negativamente como grupos SiO^-) para minimização dos efeitos hemolíticos⁵⁸. Mais especificamente, de Paula et al.⁵⁹ relatam estudo mostrando taxas de hemólise reduzidas pelas nanopartículas de sílica funcionalizadas com grupos amino carregados em virtude da repulsão eletrostática entre os grupos NH_3^+ e funções fosfatidilcolina (carregadas positivamente) presentes na membrana da hemácia. Do ponto de vista de interação das nanopartículas de sílica com proteínas do sangue, são relatados na literatura trabalhos mostrando significativa interação desses coloides com polipeptídios devido, dentre os inúmeros fatores, à presença de cargas eletrostáticas superficiais (negativas ou positivas). Além disso, efeitos hidrofóbicos, estéricos e ligações de hidrogênio são também outras possibilidades dessas interações atrativas, uma vez que as proteínas detêm estrutura abrangendo espécies carregadas (negativamente

ou positivamente), grupos capazes de realizar ligações de hidrogênio e regiões hidrofóbicas^{59,60}. Essa gama de possibilidades de interação ocorre também no processo de adsorção proteico na superfície do óxido de grafeno que, também contém grupos carregados e regiões hidrofóbicas.

Trabalhos relacionados à utilização de nanopartículas de sílica no processo de encapsulamento de camptotecina são extensivamente conhecidos e revelam estudos importantes mostrando distintas estratégias de incorporação, purificação do produto final em diferentes metodologias, ensaios de liberação prolongada de fármaco em função do tempo bem como aplicações *in vitro* e *in vivo*^{18,33,35}. Os trabalhos mencionados utilizam a estratégia de encapsulamento de fármaco através da interação química não covalente com o interior dos poros das nanopartículas de sílica. Nesses casos a força das interações fármaco-poro é dependente da presença de funções orgânicas funcionalizadas na superfície interna da sílica no sentido de minimizar a taxa de lixiviação prematura durante a circulação sistêmica e otimizar a retenção da molécula hospedeira. Trabalhos recentes mostram novas estratégias de incorporação da camptotecina em nanopartículas de sílica através de ligações covalentes⁶¹⁻⁶³, otimizando sua interação com a nanoestrutura. Apesar dos esforços no desenvolvimento de nanopartículas de sílica mesoporosa encapsulada com CPT, esses nanomateriais detêm capacidade de encapsulamento limitada em até 20%, sendo que desse valor a maior parte dos resultados estão na faixa entre 1 e 9%^{33,35}. Nesse contexto, a compreensão das interações químicas fármaco-nanocarreador no sentido de suportar trabalhos embasados na otimização da taxa de encapsulamento é outro foco do presente trabalho.

1.5. Nanocompósitos de óxido de grafeno decorados com nanopartículas de sílica mesoporosa (GO-NSMs): um nanomaterial emergente

Uma nova família de nanocompósitos de óxido de grafeno decorado com nanopartículas esféricas de sílica mesoporosa (GO-NSMs) é reportada em trabalhos recentes^{64,65} mostrando resultados interessantes do ponto de vista de sua aplicação como nanocarreadores. Huang et al.⁶⁴ obteve um nanocompósito de óxido de grafeno funcionalizado com nanopartículas de sílica detendo em seu interior nanopartículas menores de óxido de ferro e quantum dots de ZnO, comprovando sua aplicação como nanocarreadores magnéticos de fármacos, também aplicados

para bioimageamento. O trabalho publicado em 2017⁶⁵ reporta o desenvolvimento de um nanocompósito de óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica detendo núcleo magnético de Fe_3O_4 e funcionalizado com polietileno imina (PEI) utilizado para encapsulamento de ácido gambógico (GA), uma molécula antitumoral. O trabalho relata um produto com importantes propriedades antitumorais. Tratando-se de uma nova tendência para aplicação como nanocarreadores, os nanocompósitos de óxido de grafeno funcionalizados com nanopartículas de sílica esféricas ainda são pouco conhecidos do ponto de vista de interação com sistemas biológicos como a avaliação hemolítica e interações com proteínas (efeito corona), bem como sua utilização como nanocarreador de fármacos antitumorais como a CPT, caracterizando também uma das motivações do presente trabalho.

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Considerando-se as propriedades físico-químicas do óxido de grafeno e as nanopartículas de sílica bem como suas interações com sistemas biológicos, observa-se que esses materiais apresentam vantagens e desvantagens. O GO, por exemplo, pode apresentar elevada capacidade hemolítica e forte interações com proteínas, enquanto que as nanopartículas de sílica, quando funcionalizadas externamente com grupos amino externos (-NH₂), apresentam reduzida hemólise e fraca interação proteica. Por outro lado, as NSMs apresentam baixa capacidade de encapsulamento de fármacos antitumorais (menor do que 9%) enquanto que o GO apresenta potencial para adsorver em sua superfície quantidades maiores do que 50%. Percebendo-se, nesse contexto, que o óxido de grafeno apresenta desvantagens que podem ser compensadas pelas vantagens da sílica, e vice-versa, a motivação inicial do presente trabalho foi o desenvolvimento de nanocompósitos de óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica que possam apresentar: hemólise reduzida, interação proteica minimizada e elevada capacidade de encapsulamento/adsorção de camptotecina para as aplicações de interesse.

Nesse contexto, uma vez obtidos, os nanocompósitos foram submetidos aos experimentos de hemólise e corona no intuito de avaliar essas propriedades finais que motivaram seu desenvolvimento. Subsequentemente, foi avaliada a capacidade de encapsulamento e liberação (*drug delivery*) de fármacos do nanocompósito que apresentou a melhor propriedade do ponto de vista de interação com sistemas biológicos (hemácias e proteínas) - é importante mencionar que os resultados foram avaliados de maneira comparativa com o óxido de grafeno e as nanopartículas de sílica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB, $\geq 98,0\%$), 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES, $99,0\%$), N-hidroxisuccinimida (NHS, $98,0\%$), persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$, $99,0\%$) e o pentóxido de fósforo (P_2O_5 , $98,0\%$) foram obtidos da Sigma-Aldrich. O cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC, $\geq 99,0\%$) foi obtido da Fluka. O hidróxido de amônio (NH_4OH , $27,0\%$), pó de grafite natural ($98,0\%$), ácido clorídrico (HCl, $36,5-38,0\%$), permanganato de potássio ($KMnO_4$, $99,0\%$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , $30,0\%$), ácido sulfúrico (H_2SO_4 , $95,0-98,0\%$) e álcool etílico absoluto (EtOH, $>99,5\%$, P.A.) foram obtidos da Synth (Brasil). O álcool metílico (MetOH, $99,9\%$) foi consumido da LC Chemicals. O tetraetilortossilicato (TEOS, $98,0\%$) e o feniltriétoxissilano (PTES, $98,0\%$) foram consumidos da Acros Organics. A camptotecina (CPT, $>90,0\%$) foi obtida da Oakwood Chemical (EUA). A membrana de diálise MWCO: 3,5 kDa foi obtida da Spectra/Por (EUA). Os tabletes de tampão fosfato foram obtidos da Sigma Aldrich (EUA). O surfactante polisorbato 80 (Tween 80-T80) foi obtido da Makeni Chemicals (Brasil). A água deionizada foi obtida de um sistema de purificação Synergy®UV Merck Milipore.

A espectroscopia Raman foi realizada em um espectrômetro Horiba T64.000 utilizando-se laser de He:Ne (comprimento de onda de 633 nm). O equipamento detém filtro de densidade 1 e microscópio confocal de abertura de 200 μm . Os espectros foram obtidos em tempos de integração de 60 s e 3 acumulações. A espectroscopia eletrônica de absorção no ultravioleta visível (espectroscopia UV-Vis) foi realizada no espectrômetro Shimadzu UV 1650 PC. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{29}Si foram feitos em um equipamento Bruker Avance 300 MHz, com método HPDEC (“high-power decoupling”, $^{29}Si \rightarrow ^1H$). Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos com o método CPMAS (“cross polarization and magic angle spinning”, dos núcleos 1H vizinhos). A velocidade de rotação do porta-amostra foi de 10 kHz para ambas as análises (silício e carbono), feitas sob ângulo mágico ($54,74^\circ$). A difratometria de raios X (DRX) foi realizada em um difratômetro Shimadzu XRD-7000, conduzida mediante aplicação de radiação raios X $CuK\alpha$ em comprimento de onda de 1,54056 Å com gerador de voltagem de 40 kV. O intervalo de ângulos de difração, reportados no difratograma como 2θ , compreende os valores entre 5 e 50° e foram obtidos em taxa de scan de $2^\circ/min$. As análises termogravimétricas (TG) foram feitas em um analisador térmico TA Instruments 500,

módulo TGA 2050. A taxa de aquecimento foi mantida em 10,0 °C/min e o fluxo de ar sintético em 100 mL/min. O potencial zeta (PZ) foi medido em instrumento Malvern ZetaSizer-Nano. Os resultados de PZ foram obtidos usando água deionizada como dispersante. As medidas de adsorção de nitrogênio foram feitas na temperatura do nitrogênio líquido em um analisador ASAP 2020 Micromeritics, também utilizado para análise de área superficial e porosidade (AASP). As amostras foram tratadas a 120 °C por 12 horas antes da análise. A área de superfície foi calculada a partir do ramo de adsorção da isoterma usando o método Brunauer-Emmett-Teller (BET)⁷. O diâmetro e volume dos poros foram calculados a partir do ramo de adsorção da isoterma usando o método Barrett- Joyner-Halenda (BJH)⁷ e a partir da quantidade de adsorção em um ponto único ($P/P_0 = \sim 0,94$), respectivamente. A morfologia das nanoestruturas foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão em modo de campo claro (MET, Zeiss Libra 120, operando a 80 kV). As imagens de microscopia de força atômica (MFA) foram adquiridas em um equipamento Nanoscope Multimode III (Veeco).

3.1. Síntese das nanopartículas de sílica mesoporosa com grupos fenil internos e funções amino externas (NSMs)

A síntese das nanopartículas de partida com grupos fenil internos na presença de CTAB (denominadas HO-NSM-CTAB) foi realizada em uma reação do tipo sol-gel através do método de Stober Modificado^{57,66}. Inicialmente, dissolve-se 0,75 g de CTAB em 20 mL de solução de amônia 0,05 mol/L, seguido de adição de 3,2 mL de etanol e agitação a 60 °C. Paralelamente, foi preparada uma mistura de 1,49 mL de TEOS e 816 µL de PTES que, foi logo em seguida, vertida no sistema contendo o molde orgânico, o co-solvente etanol e o catalisador (NH₃). Agitou-se a solução durante 120 minutos, (a contar do tempo $t = 0$) com duas adições de 124 µL de TEOS em $t = 60$ min e $t = 90$ min. Após essa etapa, as nanopartículas obtidas foram centrifugadas e redispersas em etanol para remoção de excesso de reagentes.

Foi realizada a remoção do molde orgânico da HO-NSM-CTAB seguindo-se o protocolo sintético descrito adiante, obtendo-se apenas as nanopartículas com funções fenil no seu interior (HO-NSM).

As nanopartículas de sílica com grupos fenil e funções amino (NSMs) foram sintetizadas através de métodos de funcionalização descritos por Fonseca et al.⁷. Nesse processo, 300 mg das nanopartículas HO-NSM-CTAB são dispersas em 40 mL de etanol absoluto por 60 minutos e em seguida homogeneizadas por mais 15 minutos a 60 °C. Posteriormente, o reagente APTES é transferido para o balão de reação de modo que sua quantidade seja equivalente a 25% mol-Si em relação ao número de mol de silício total presente na massa de HO-NSM-CTAB adicionada. Prosseguiu-se a reação mediante agitação constante a 60 °C durante uma hora, e mais 12 horas de funcionalização à temperatura ambiente. Os produtos foram submetidos à centrifugação e dispersão em etanol, obtendo-se as nanopartículas de sílica com grupos amino (NH₂) na presença de CTAB, denominadas H₂N-NSM-CTAB. A remoção do molde orgânico foi realizada segundo procedimento experimental descrito adiante, para obtenção das nanopartículas de sílica NSMs.

3.1.1. Extração do molde orgânico

Conforme descrito nos tópicos anteriores a HO-NSM-CTAB e H₂N-NSM-CTAB contém em seu interior o molde orgânico para extração. Para a remoção do CTAB, cada uma das nanopartículas são transferidas para um frasco contendo uma solução etanólica de HCl na proporção volumétrica de HCl:Etanol = 1:9 e submetidos ao banho de ultrassom durante 15 minutos para remoção do molde. A proporção estequiométrica padrão foi de 5 mg de nanopartícula para 1 mL de solução HCl/Etanol.

O resumo da síntese da nanopartícula de sílica contendo grupos fenil internos e funções amina externas é mostrado no esquema da Figura 2 (A).

3.2. Síntese do óxido de grafeno (GO)

A síntese do óxido de grafeno é realizada através do método de Hummers modificado^{67,68} e abrange duas etapas:

Etapa (a): Pré-oxidação do grafite.

Em um frasco de reação, 4,4 mL de ácido sulfúrico é pré-aquecido a 80 °C e 0,8 g de K₂S₂O₈ e 0,8 g de P₂O₅ são posteriormente adicionados. Sequencialmente é adicionado 1 g de pó de grafite natural e o sistema é mantido sob agitação

constante por 4,5 horas. Mantendo-se a mistura na temperatura ambiente sob agitação, 170 mL de água deionizada são transferidos para o frasco, e a mistura é deixada em repouso durante 12 horas. Após essa etapa o sistema é submetido à filtração em membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) 0,22 μm , lavado com água deionizada até neutralização do pH e o sólido filtrado (grafite pré-tratado) é seco à temperatura ambiente durante 12 horas.

Etapa (b): Oxidação do grafite pré-tratado.

A etapa (b) é iniciada pelo resfriamento de 40 mL de ácido sulfúrico até a temperatura de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, adição de grafite pré-tratado e transferência gradual de 5 g de KMnO_4 em intervalo de tempo entre 15 e 20 minutos. A temperatura foi elevada para $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ após total adição do permanganato de potássio e a reação foi mantida sob agitação constante durante 2 horas. Adiciona-se 77 mL de água deionizada controlando-se a temperatura para que permaneça abaixo de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e prossegue-se a reação por mais duas horas à temperatura ambiente. A seguir, 230 mL de água deionizada e 4 mL de H_2O_2 são sequencialmente adicionados ao frasco e o sistema é mantido em repouso por quatro dias. O sobrenadante é removido e descartado e o sólido é centrifugado a 956 rcf durante 30 minutos à temperatura ambiente e lavado com 500 mL de HCl 10% (v/v) - ressalta-se que durante a lavagem são executadas centrifugações adicionais até utilização total do volume da solução de ácido clorídrico. Posteriormente é realizada lavagem com água deionizada mediante novas centrifugações a 23.890 rcf a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos por rodada. O material resultante é submetido à diálise durante 10 dias em tubo de diálise Fisherband 12-14 kDa, liofilizado e estocado. Finalmente, as suspensões de óxido de grafeno são obtidas através da dispersão do sólido em água deionizada colocada em banho de ultrassom em equipamento Cole Parmer 8891.

3.3. Síntese dos nanocompósitos de óxido de grafeno decorados com nanopartículas de sílica mesoporosa (GO-NSMs).

A síntese dos GO-NSMs é realizada através da combinação de diversos protocolos sintéticos descritos na literatura⁶⁹⁻⁷⁴. Nesse processo a suspensão de GO (1 mg/mL) é diluída com água na proporção de 8 mL de água para cada 1 mg de óxido de grafeno, posteriormente colocada em banho ultrassom por 2 horas e

adicionada em um frasco de reação de material plástico. Sequencialmente uma solução de EDC (1 mg/mL) é adicionada gota a gota em quantidades de 1 mg de EDC para cada 1 mg de GO mantendo-se a reação por 1 hora, seguido de transferência de NHS (1 mg/mL), também gota a gota, ao frasco e prosseguindo-se a síntese sob agitação constante por 24 horas. A razão molar de EDC/NHS utilizada é de 1:1. Após essa etapa, colocou-se as nanopartículas NSMs (1 mg/mL) em banho ultrassom durante 30 minutos seguido de sua diluição em concentração de até 0,1 mg/mL e transferência ao frasco contendo o GO ativado com EDC/NHS – as nanopartículas foram adicionadas gota a gota na reação e em quantidade até 50% em massa em relação ao óxido de grafeno ativado. A mistura de GO e NSMs é realizada durante 24 horas à temperatura ambiente sob agitação constante. O nanocompósito obtido é filtrado em membrana de PVDF 0,22 μm e lavado com metanol e água deionizada de modo a eliminar os nanocarreadores de sílica não acoplados no óxido de grafeno. O sólido obtido é suspenso em água e a dispersão formada é adicionada em funil de separação para eliminação de impurezas sólidas presentes superiormente ao frasco após 30 minutos de repouso. A suspensão purificada é novamente filtrada em membrana de PVDF 0,22 μm e o sólido é novamente suspenso em água para a formação de uma dispersão aquosa de nanocompósito a 1 mg/mL. Foram preparados três nanocompósitos denominados GO-NSM₁₀, GO-NSM₃₀ e GO-NSM₅₀, nas quais a massa de nanopartículas de sílica em relação ao óxido de grafeno é de 10, 30 e 50%, respectivamente.

O resumo da síntese pode ser encontrado no esquema da Figura 2 (B).

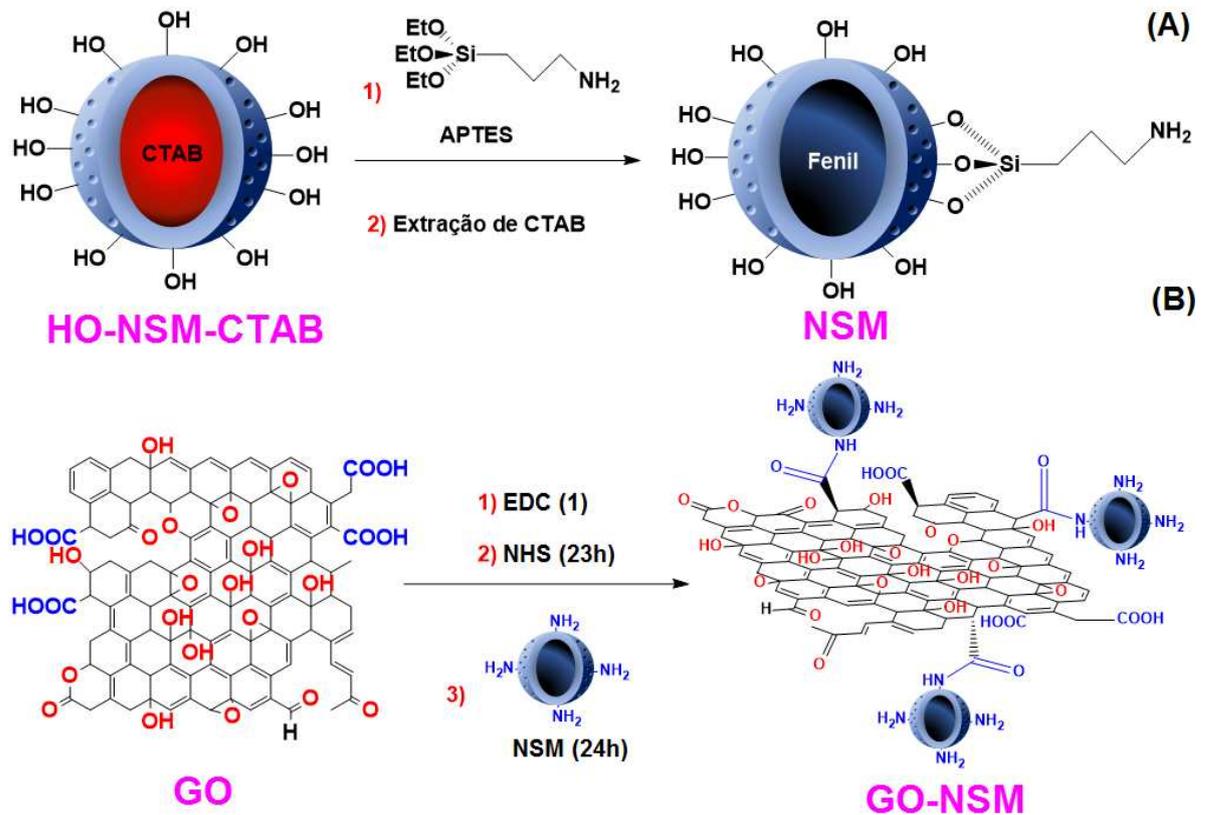


Figura 2 Esquema de obtenção das nanopartículas de sílica contendo grupos fenil internos e funções amino externas (NSMs) e respectivas estruturas moleculares dos materiais intermediário e final (A); esquema de obtenção dos nanocompósitos de óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica mesoporosa (GO-NSMs) e respectivas estruturas moleculares dos materiais intermediário e final (B). (**Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.**⁷⁵).

3.4. Ensaio hemolíticos

Na realização dos experimentos de hemólise utilizou-se uma bolsa de concentrado de hemácias do Tipo O+ concedido pelo Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas. Concomitantemente, duas soluções de NaCl foram preparadas de acordo com o procedimento descrito a seguir:

a) NaCl (2x): foi preparado 500 mL de uma solução de NaCl 0,3 M em água deionizada estéril;

b) NaCl (1x): 250 mL da solução acima foram diluídos em 250 mL de água deionizada estéril, gerando uma solução de NaCl 0,15 M.

O volume de 10 mL da bolsa de concentrado de hemácias Tipo O+ foi submetido à centrifugação a 10.618 rcf a 4 °C por 10 minutos. Descartou-se o

sobrenadante e adicionou-se 20 mL de NaCl (1x) ao “pellet” (hemácias) que, foi subsequentemente resuspendido. Após esse processo, realizou-se duas novas lavagens seguindo-se o procedimento vigente, obtendo-se 20 mL de uma solução de hemácias em NaCl (1x). Desse total, 2,5 mL foram diluídos em 12,5 mL de NaCl (1x) obtendo-se a solução estoque de hemácias.

O pré-tratamento das nanopartículas (inicialmente em etanol) para os ensaios hemolíticos compreendem um procedimento no qual todas são centrifugadas a 23.890 rcf a 4 °C durante 30 minutos e dispersas em água deionizada. Esse processo é repetido mais duas vezes obtendo-se dispersões coloidais finais em água deionizada nas concentrações de 1 mg/mL.

A influência do óxido de grafeno e dos nanocompósitos e suas concentrações foram investigadas no processo de interação com hemácias⁵⁹. Nesse contexto, foram preparadas soluções de nanomateriais nas seguintes concentrações: 10 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL, 200 µg/mL e 250 µg/mL. Cada nanomaterial é adicionado a uma mistura de NaCl (2x) (cujo volume é sempre igual ao volume de nanomaterial adicionado) e NaCl (1x). Em seguida, é adicionado 100 µL de uma solução estoque de hemácias, iniciando-se o processo de incubação por uma hora – note que para cada micro tubo tem-se um volume total de 1000 µL, o volume de solução de nanomaterial varia de acordo com a concentração final desejada, o volume de solução estoque de hemácias é sempre 100 µL e a quantidade de NaCl (1x) complementa o volume final citado.

Após o período de incubação, as soluções biológicas contendo as nanopartículas são centrifugadas a 10.618 rcf a 4 °C por 10 minutos e 100 µL do sobrenadante é analisado por UV-Vis no comprimento de onda de 540 nm (absorção da hemoglobina liberada após a lise da célula vermelha). Os valores de absorbância são referência para os cálculos percentuais da taxa de hemólise. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5. Ensaios de interação com proteínas (efeito corona)

Os nanomateriais foram submetidos aos experimentos de adsorção de proteínas^{35,76} oriundas de plasma humano no intuito de investigar suas interações, uma vez que a aplicação intravenosa é uma das mais comuns vias de aplicação em processos de tratamentos antitumorais. Dessa maneira, compreender os fenômenos

bioquímicos provenientes desse tipo de interação é crucial. O plasma humano preservado Tipo O+ (250 mL) foi obtido do Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas. Para o estudo da interação com proteínas adsorvidas nos nanomateriais (efeito corona), o plasma foi primeiramente centrifugado a 28.817 rcf por 5 minutos, utilizando-se o sobrenadante para os experimentos. Os nanomateriais (1 mg/mL em água deionizada) foram incubados nos micro tubos contendo plasma durante 1 hora à 37 °C em termoblocos (SmartBlock, Eppendorf) sem agitação. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 28.817 rcf por 30 minutos, descartados os sobrenadantes e os “pellets” obtidos (compreendendo os complexos nanomaterial-proteínas) e foram lavados 3 vezes com solução de NaCl (1x) para remoção de excesso de proteínas fracamente adsorvidas (soft corona) na superfície, obtendo-se o complexo nanomaterial/proteína fortemente adsorvida (hard corona). Este último foi resuspenso em um tampão (contendo 150 µL a 62,5 mM de Tris-HCl, 2% (m/v) de SDS, 10% de glicerol, e 0,01 % (m/v) de azul de bromofenol; pH 6,8) e aquecido por 3 minutos a 100 °C. Dessa suspensão resultante, 15 µL foram aplicados para um gel de SDS-poliacrilamida. Após a corrida em eletroforese, o gel foi corado com Azul de Coomassie, utilizado para identificação e visualização de proteínas fortemente adsorvidas nos nanocompósitos (hard corona).

3.6. Interação de camptotecina nos nanomateriais NSMs, GO e GO-NSM_x

A interação de camptotecina foi realizada nas nanopartículas de sílica (NSMs), no óxido de grafeno (GO) e no nanocompósito GO-NSM_x que apresentou o menor risco de toxicidade (menor taxa de hemólise e reduzida interação proteica).

O encapsulamento de camptotecina nas NSMs foi realizado segundo o protocolo descrito no trabalho publicado por de Paula et al.³⁵, com algumas modificações. Nesse contexto, 10 mg de nanopartículas suspensas em 20 mL de água deionizada (0,5 mg/mL) foram submetidas a ultrassom durante 10 minutos seguido de adição de 10 mg de camptotecina na dispersão mencionada (a proporção de massa NSM:CPT foi de 1:1). O sistema foi novamente levado a banho de ultrassom durante 10 minutos e submetido à agitação constante por 12 horas na ausência de luz e à temperatura ambiente. A purificação das nanopartículas de sílica contendo camptotecina encapsulada foi realizada através de dois ciclos de centrifugação a 27 rcf durante 2 minutos à temperatura ambiente. Nesse processo o

sólido de fundo é a camptotecina livre em excesso e o sobrenadante é constituído do produto de interesse. Esse último é submetido a um processo de decantação durante 48 horas de modo a otimizar o processo de purificação. Nessa última etapa, portanto, o sobrenadante constituído do nanomaterial alvo é separado da CPT livre decantada e armazenado em dispersão na concentração de 0,5 mg/mL a 4 °C. A capacidade de encapsulamento de camptotecina nessa amostra foi determinada segundo o procedimento de quantificação descrito adiante. A amostra obtida foi denominada NSM+CPT.

A adsorção de camptotecina no GO foi realizada segundo protocolo descrito no trabalho publicado por de Sousa et al.⁵¹. Nesse processo é preparada uma solução de 10 mg de CPT em 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, esse sistema é adicionado gota a gota em uma dispersão de 10 mg de óxido de grafeno em 18 mL de água deionizada sob agitação constante. A mistura formada é dispersa por 10 minutos e subsequentemente mantida à agitação constante por 12 horas na ausência de luz e à temperatura ambiente. A purificação do óxido de grafeno contendo camptotecina encapsulada é realizada através de sua filtração em membrana de PVDF 0,22 µm, lavado três vezes com 20 mL de uma mistura água metanol 1:1 (V:V) e duas vezes com 20 mL de água eliminando-se a camptotecina livre em excesso. Nesse processo, após uma determinada filtração o sólido resultante sobre a membrana é suspenso no fluido da lavagem posterior através de ultrassom durante 5 minutos, reiniciando a filtração e a lavagem subsequente. Finalizando-se a última lavagem, o produto final é suspenso em 20 mL de água deionizada (0,5 mg/mL de GO) e estocado a 4 °C. A amostra foi denominada GO+CPT. A adsorção de CPT no GO-NSM_x foi realizada utilizando-se o método acima variando-se apenas o volume de DMSO (4 mL) na preparação da solução do fármaco e o volume de água (36 mL) na dispersão inicial de GO-NSM_x, mantendo-se semelhantes as demais variáveis de processo e executando-se as etapas de produção de maneira idêntica ao método supracitado. A dispersão resultante foi estocada a 4 °C e na concentração de 0,5 mg/mL de GO-NSM_x. A amostra foi designada como GO-NSM_x+CPT. Os valores da capacidade de adsorção de camptotecina nas dispersões de GO+CPT e GO-NSM_x+CPT foram determinados de acordo com o procedimento de quantificação descrito adiante.

Para a quantificação de CPT nas amostras NSM+CPT, GO+CPT e GO-NSM_x+CPT foram coletados 100 µL de cada dispersão posteriormente adicionado

em 4,9 mL de metanol. O sistema formado é submetido a 30 minutos de ultrassom e centrifugado a 23.890 rcf a 4 °C durante 30 minutos. Nesse contexto a CPT (solúvel em metanol) é extraída do nanomaterial e este último encontra-se como sólido decantado no tubo de centrifugação. O volume de 1 mL do sobrenadante (constituído de camptotecina livre extraída) é submetido à análise UV-Vis para leitura da absorbância da CPT a 360 nm cujo valor é comparado à curva de calibração que suporta os cálculos de fármaco encapsulado ou adsorvido. O procedimento de quantificação foi realizado em triplicata.

3.7. Estudos de liberação prolongada de camptotecina dos materiais NSM+CPT, GO+CPT e GO-NSM_x+CPT

Os ensaios de liberação prolongada de fármaco dos nanomateriais NSM+CPT, GO+CPT e GO-NSM_x+CPT foram realizados através da adição de 3 mL de cada uma das dispersões obtidas em membranas de diálise MWCO: 3,5 kDa. A membrana contendo o nanomaterial foi imersa em dois tipos de meios de liberação: 100 mL de tampão fosfato (pH 7,4) mimetizando o pH das condições fisiológicas do organismo vivo; e 100 mL de tampão acetato (pH 5,0) mimetizando o pH de endossomas, organelas ácidas encontradas nas células cancerígenas. Ambos os meios contêm 1 % (v/v) de Tween 80, um surfactante neutro utilizado para facilitar a liberação da camptotecina dos nanomateriais, visto que a natureza hidrofóbica desse fármaco também contribui para maior interação com as nanoestruturas presentes nos fluidos hidrofílicos descritos. Os estudos liberação foram realizados a 37 °C (temperatura do corpo humano) durante 192 horas. Nesse período 1 mL do meio liberação (contendo apenas camptotecina liberada e livre de interferência do nanomaterial) é coletado em intervalos de tempo pré-determinados e submetido à leitura de absorbância em 360 nm no espectro UV-Vis. Dessa maneira, a porcentagem liberada de CPT foi estimada em relação à quantidade total desse fármaco presente no nanomaterial presente na membrana de diálise. À cada volume de amostra coletada no meio de liberação, volume semelhante do respectivo fluido foi resposto mantendo-se constante o valor de 100 mL.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Nanopartícula de sílica mesoporosa com grupos fenil internos e funções amino externas (NSMs)

As Figuras 3 e 4 mostram, respectivamente, as curvas TG e DTG das nanopartículas HO-NSM-CTAB, HO-NSM e NSM. Analisando-se a curva TG da HO-NSM-CTAB e sua respectiva curva DTG, observa-se um evento típico de decomposição do molde orgânico entre 143 e 407 °C. Nota-se que nas curvas TG da HO-NSM e NSM, a referida perda de massa não é significativamente observada, uma vez que o molde orgânico foi extraído de ambas. Nesse caso, é notório um ligeiro evento de decomposição térmica na curva de HO-NSM, que sugere a presença de CTAB residual. Prosseguindo-se o raciocínio analisando-se a curva TG/DTG da HO-NSM na qual a entidade orgânica majoritariamente presente são os grupos fenil, observa-se seu evento de decomposição entre 463 °C e 800 °C. A quantidade de espécies C₆H₅- calculada no referido intervalo de temperatura foi de 21,2% mol-Si, refletindo o elevado teor das referidas espécies no interior dos poros. O referido cálculo leva em consideração a variação de massa entre 463 °C e 800 °C como sendo oriunda dos grupos C₆H₅-. Dessa maneira, calcula-se o número de mol dos grupos fenil a partir de sua massa molar (77 g/mol) e compara-se com o número total de mol de SiO₂, determinado a partir da massa residual final da amostra em 800 °C, quando apenas sílica está presente, e através da massa molar do SiO₂ (60 g/mol). A razão do número de mol de grupos aromáticos e o número de mol de SiO₂, multiplicada por 100, resulta no valor de 21,2% mol-Si. O evento de decomposição dos grupos fenil ocorre também nas outras nanopartículas. Nesse contexto, as curvas TG sugerem a presença de ambos os grupos orgânicos (fenil e CTAB) na HO-NSM-CTAB. Considerando-se a NSM na qual os grupos orgânicos presentes compreendem as funções fenil e aminopropil, observa-se um evento de perda de massa iniciando-se em 283 °C (observar curva DTG) supostamente devido à eliminação da espécie -CH₂CH₂CH₂-NH₂, coincidindo com a perda de massa dos grupos aromáticos a partir de 463 °C.

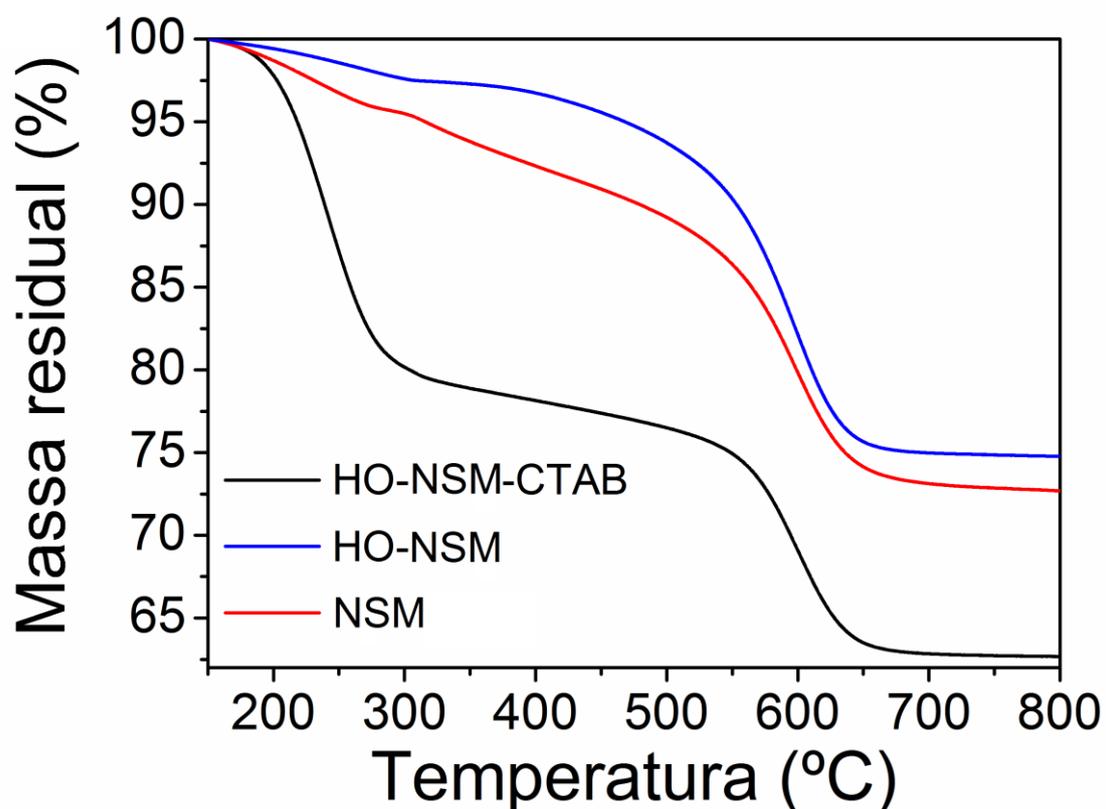


Figura 3 Curvas termogravimétricas (TG) das nanopartículas de sílica contendo grupos fenil internos na presença de CTAB (HO-NSM-CTAB); nanopartículas de sílica contendo grupos fenil internos na ausência de CTAB (HO-NSM); e das nanopartículas de sílica contendo grupos fenil internos e funções amino externas na ausência de CTAB (NSM). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

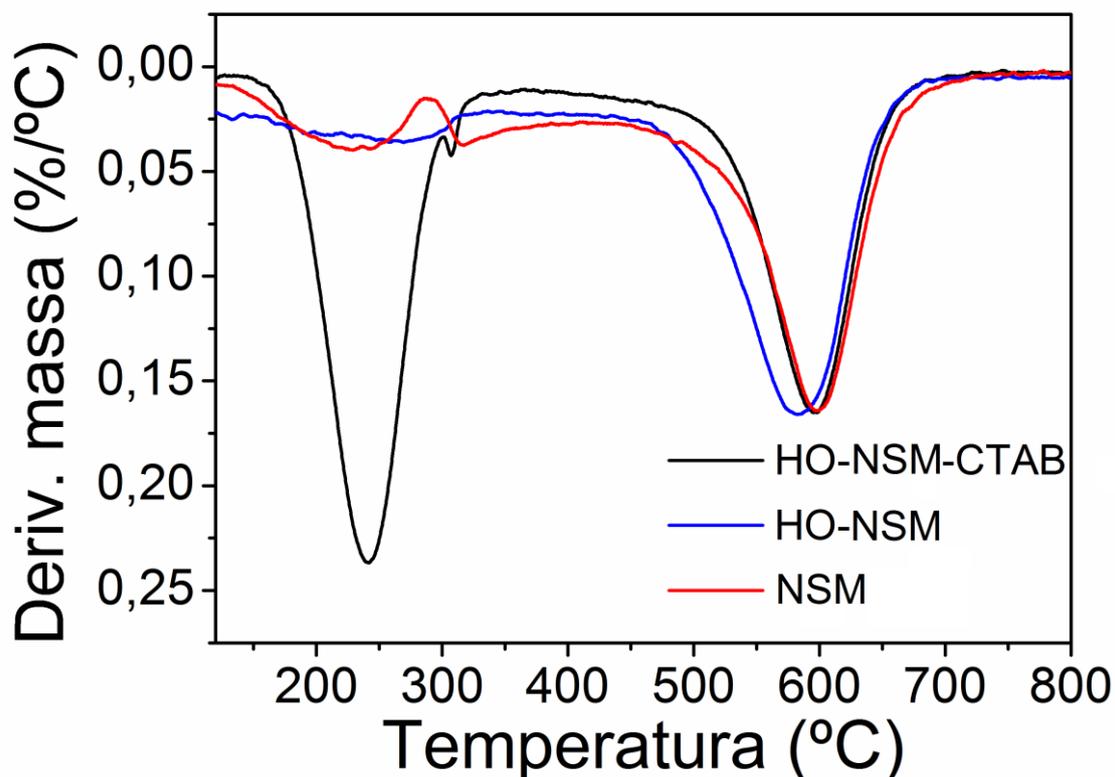


Figura 4 Curvas de primeira derivada das curvas termogravimétricas (DTG) das nanopartículas de sílica contendo grupos fenil internos na presença de CTAB (HO-NSM-CTAB); nanopartículas de sílica contendo grupos fenil internos na ausência de CTAB (HO-NSM); e das nanopartículas de sílica contendo grupos fenil internos e funções amino externas na ausência de CTAB (NSM). **(Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).**

A Figura 5 apresenta as isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio das nanopartículas H₂N-NSM-CTAB e NSM. As isotermas observadas apresentam perfil tipo IV que, segundo a IUPAC^{77,78}, é típica de materiais mesoporosos (presença de poros entre 2 e 50 nm). As isotermas de ambos os nanocarreadores compreendem histereses do tipo H3, isto é, apresentam estrutura porosa complexa e não definida. Tais resultados são reflexo da significativa quantidade de grupos fenil presentes no processo de co-condensação entre o TEOS e PTES, no qual os referidos grupos aromáticos localizados entre as cadeias carbônicas do CTAB aumentam seu espaçamento, pois encontram-se em grande quantidade (21,2% mol-Si de silano PTES). Dessa maneira, a condensação do TEOS ao redor do molde orgânico resulta

em uma nanopartícula compreendendo poros aleatórios e de alta complexidade topográfica, conforme esperado para o tipo de nanopartícula planejada.

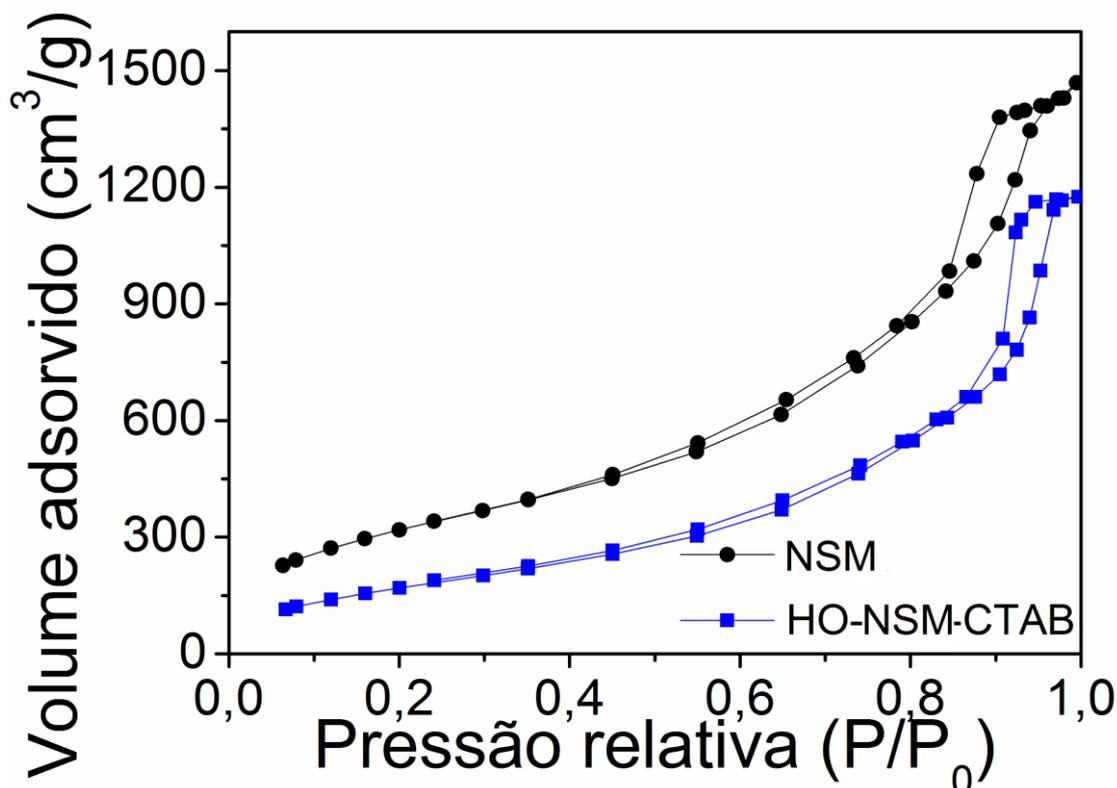


Figura 5 Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio das nanopartículas de sílica detendo grupos fenil internos na presença de CTAB (HO-NSM-CTAB); e das nanopartículas de sílica detendo grupos fenil internos e funções amino externas na ausência de CTAB (NSM). **(Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).**

O gráfico de distribuição de diâmetro de poros das nanopartículas mostrado na Figura 6 apresenta poros detendo, predominantemente, tamanhos entre 3 e 20 nm para ambos os carreadores, corroborando com a informação contida nas isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio e, portanto, são classificados como mesoporosos. Foram estimados, ainda, a área superficial e volume total de poros das nanopartículas de sílica anterior e posteriormente à remoção do CTAB. Na presença do molde orgânico, os valores medidos foram de 658,3 m²/g (área) e 1,82 cm³/g (volume). Na ausência do CTAB, os valores mencionados aumentaram para 1.178,7 m²/g de área superficial e 2,27 cm³/g de volume total de poros, confirmando a extração do *soft template*. Conforme comentado para os resultados das curvas termogravimétricas, a NSM apresenta CTAB residual. Nesse contexto, mesmo na

presença de quantidades ínfimas desse molde orgânico, o aumento de área superficial e volume de poros após aplicação do método de extração foi expressivo e significativo, o que possibilitará o posterior encapsulamento de camptotecina que será discutido posteriormente.

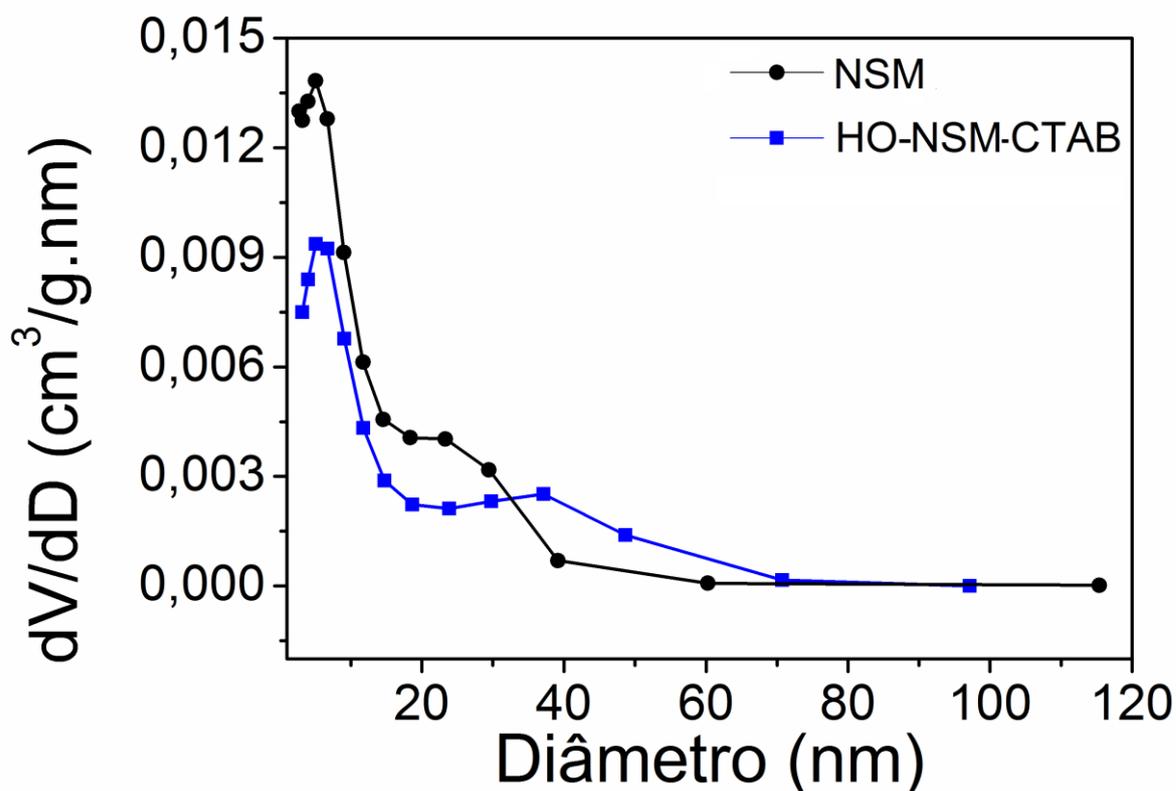


Figura 6 Gráfico de distribuição de diâmetro de poros das nanopartículas de sílica detendo grupos fenil internos na presença de CTAB (HO-NSM-CTAB); e das nanopartículas de sílica detendo grupos fenil internos e funções amino externas na ausência de CTAB (NSM). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

A Figura 7 exibe os espectros de RMN de carbono ^{13}C (A) e ^{29}Si (B) das nanopartículas HO-NSM (funcionalizada com grupos fenil internos) e NSM (funcionalizada com grupos fenil internos e funções amino externas). Analisando-se os resultados de RMN ^{13}C na Figura 7 (A) são observados picos oriundos dos núcleos dos anéis aromáticos (núcleos de 1 a 4) das funções fenil em ambas as situações no intervalo de deslocamentos químicos entre 134 e 126 ppm, confirmando sua presença e complementando os resultados de análise termogravimétrica. A presença da função aminopropil na NSM é confirmada em seu respectivo espectro analisando-se os núcleos dos carbonos 5, 6 e 7 em 9, 21 e 42

ppm, respectivamente⁷⁹. Tal resultado indica que a referida espécie química está presente na referida nanopartícula de sílica. É importante notar que os três picos mencionados estão ausentes no espectro da HO-NSM. A presença do CTAB residual comentada na discussão dos resultados das curvas TG/DTG e análise de área superficial, por sua vez, também é evidente através nos espectros de RMN ¹³C da HO-NSM e NSM. Nesse contexto são observados picos em 60 ppm e 17 ppm referentes aos carbonos alifáticos e saturados da cauda hidrofóbica do molde orgânico residual.

Para a confirmação da condensação do silano PTES e silano APTES nas superfícies interna e externa da sílica, respectivamente, faz-se necessário analisar os espectros de RMN ²⁹Si. De acordo com a Figura 7 (B), os resultados de RMN ²⁹Si exibem picos típicos do núcleo de silício observados em -109,3 (Q⁴), -100,9 (Q³), -91,9 (Q²), -77,8 (T³) e -69,5 ppm (T²) para ambos os nanocarreadores. Os sítios Q⁴, Q³, Q², T³ e T² referem-se às espécies de silício (SiO-)₄Si, (SiO-)₃Si-OH, (SiO-)₂Si(OH)₂, (SiO-)₃Si-R e (SiO-)₂Si-R(-OH), respectivamente⁸⁰. É notório que as estruturas (SiO-)₃Si-OH e (SiO-)₂Si(OH)₂ relacionam-se aos grupos silanóis disponíveis para funcionalização nas superfícies interna ou externa da nanopartícula enquanto que as espécies (SiO-)₃Si-R e (SiO-)₂Si-R(-OH) são provenientes de núcleos de silício ligados a grupos R (representando funções orgânicas diversas e presença de algum organosilano condensado). Adicionalmente, os sítios Q⁴ representam a rede de SiO₂ com cada núcleo de silício circundado por 4 ligações -OSi. Nesse contexto, a análise do espectro da HO-NSM apresenta os picos Q⁴, Q³ e Q² intrinsecamente em alusão à sílica e os picos T³ e T² referentes ao silano PTES condensado no interior poroso na forma (SiO-)₃Si-(fenil) ou (SiO-)₂Si(OH)-(fenil). Comparado com o espectro da NSM, observa-se diminuição dos picos Q³ e Q² em relação ao pico Q⁴. Tal informação indica menor quantidade de grupos silanóis e aumento de espécies SiO₂ no sistema, confirmando a condensação do APTES. Soma-se a isso a observação do aumento dos picos T³ e T² no espectro da NSM em relação ao da HO-NSM, isto é, tem-se na nanopartícula funcionalizada núcleos de silício na forma (SiO-)₃Si-(fenil) e (SiO-)₃Si-(aminopropil) - atrelados ao sítio T³ - e (SiO-)₂Si(OH)-(fenil) e (SiO-)₂Si(OH)(aminopropil) - atrelados ao sítio T². Portanto, o conjunto de espectros de RMN na Figura 7 confirmam a condensação dos silanos PTES e APTES na NSM.

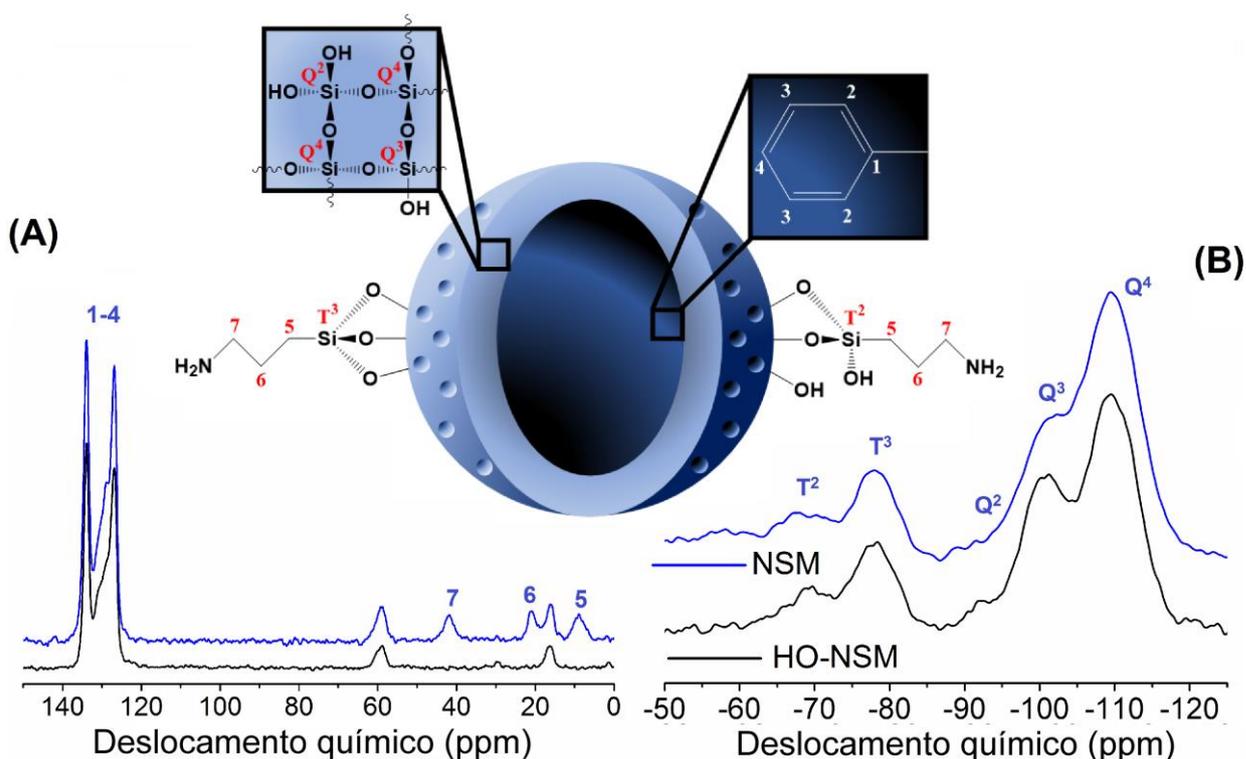


Figura 7 Espectros de RMN ^{13}C (A) e ^{29}Si (B) das nanopartículas de sílica detendo grupos fenil internos (HO-NSM); e das nanopartículas de sílica detendo grupos fenil internos e funções amino externas (NSM). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

A morfologia das NSMs foi observada por MET, conforme mostrado na Figura 8. As nanopartículas exibiram formato esférico, com uma estrutura porosa caracterizada por uma topografia irregular e um diâmetro médio de 51 ± 8 nm (Figura 9). A presença de fractais também é notada nas nanopartículas, sendo resultante da elevada quantidade de grupos fenil, que aumenta o espaçamento entre as caudas hidrofóbicas das micelas de CTAB durante o processo de co-condensação do PTES/TEOS. Ao redor desse espaçamento a casca de sílica é formada, gerando os fractais comentados.

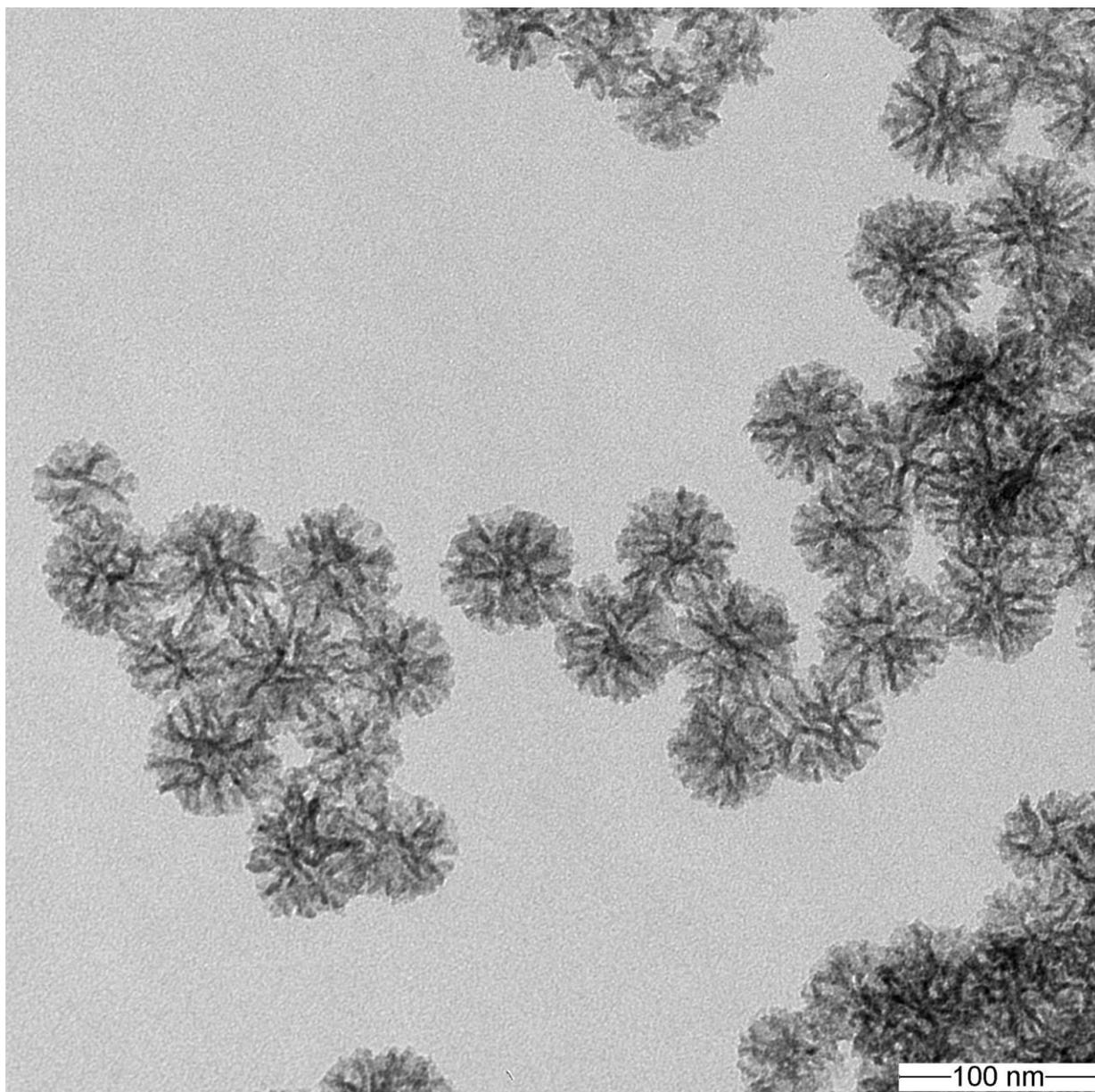


Figura 8 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas de sílica detendo grupos fenil internos e funções amino externas (NSM). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

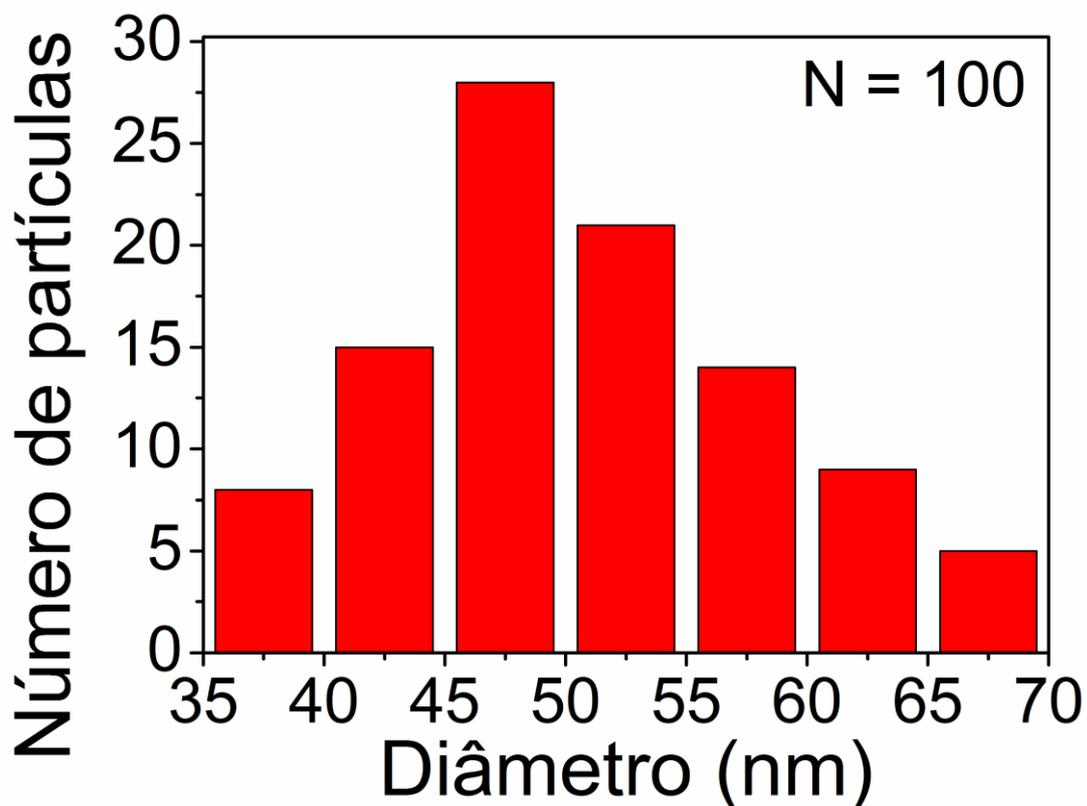


Figura 9 Gráfico de distribuição dos tamanhos (diâmetro) das nanopartículas de sílica detendo grupos fenil internos e funções amino externas (NSM). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

O difratograma das NSMs (Figura 10) indica um pico alargado no valor de 2θ compreendido no intervalo entre 13 e 40° , sugerindo que essa nanoestrutura não é cristalina⁸¹. Mais especificamente, esse resultado sugere que a sílica não apresenta ordenamento em médias e longas distancias, resultando no alargado pico observado.

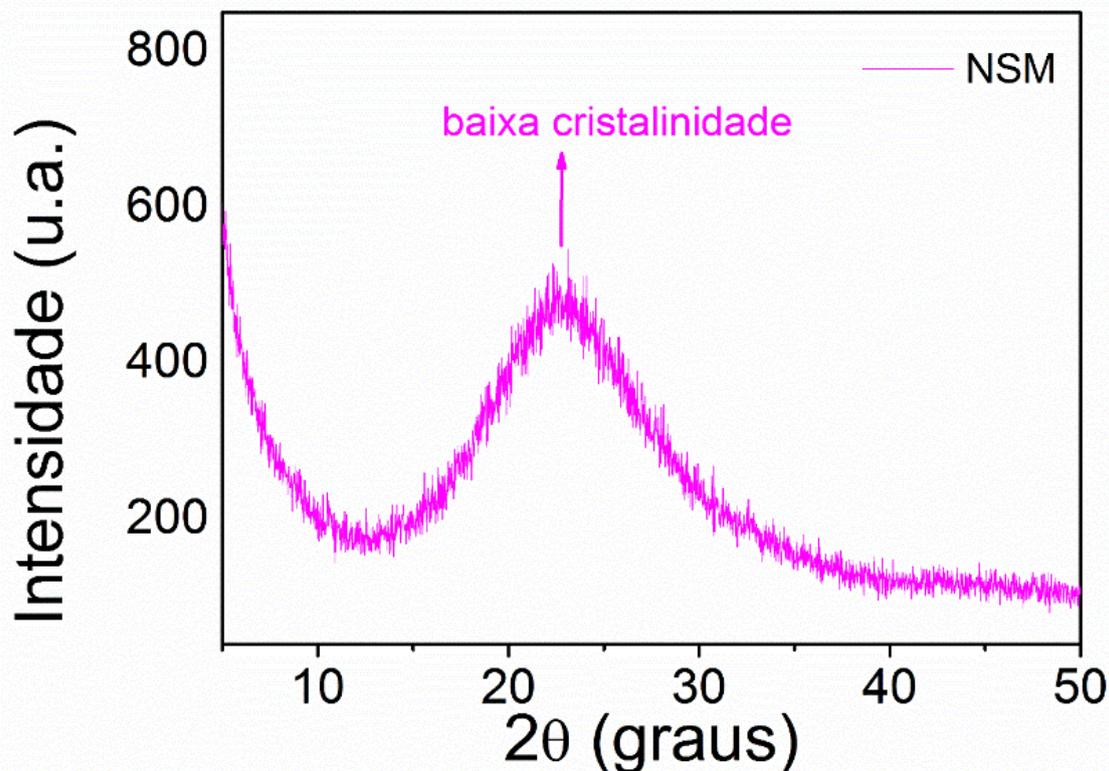


Figura 10 Difratograma de raios X das nanopartículas de sílica (NSMs). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

O conjunto de técnicas aplicadas para caracterização das NSMs confirmam sua obtenção e presença de suas principais entidades químicas, permitindo sua posterior funcionalização na superfície das folhas de óxido de grafeno, cuja principal estratégia é o acoplamento via ligação amida, formada entre a reação química dos grupos -NH_2 da sílica e os grupos -COOH do GO.

4.2. Óxido de grafeno (GO) e nanocompósitos de óxido de grafeno decorados com nanopartículas de sílica mesoporosa (GO-NSMs)

A Figura 11 refere-se ao espectro de espalhamento Raman do óxido de grafeno (azul) e grafite (preto), apresentando duas bandas típicas denominadas banda D e banda G em ambos os materiais. A primeira, localizada em 1327 cm^{-1} no grafite (banda D) está relacionada com os defeitos estruturais do material, enquanto que a banda G, em 1580 cm^{-1} no espectro do referido material, é proveniente da vibração dos átomos de carbono detendo hibridização sp^2 ^{82,83}. Após a oxidação

química do grafite a óxido de grafeno através do método de Hummers, a banda G inicialmente em 1580 cm^{-1} no espectro do grafite desloca-se para 1591 cm^{-1} e sofre alargamento no espectro do óxido de grafeno. O referido resultado indica a redução de tamanho do plano referente aos domínios de carbonos sp^2 devido à introdução dos grupos oxigenados. O deslocamento de banda observado é comumente discutido na literatura como sendo proveniente da mudança da frequência de ressonância pelos grupos C=C isolados devido à presença das funções orgânicas⁸⁴. Observa-se, ainda, aumento de intensidade da banda D no espectro do GO em comparação com a banda correspondente no grafite, devido à presença de defeitos estruturais pouco frequentes nesse último material e abundantes no material bidimensional formado⁶⁷. A razão de intensidade da banda D (I_D) em relação à banda G (I_G) foi estimada em $I_D/I_G = 0,25$ e $1,329$ no grafite e no GO, respectivamente. Tal resultado sugere a oxidação do grafite a óxido de grafeno.

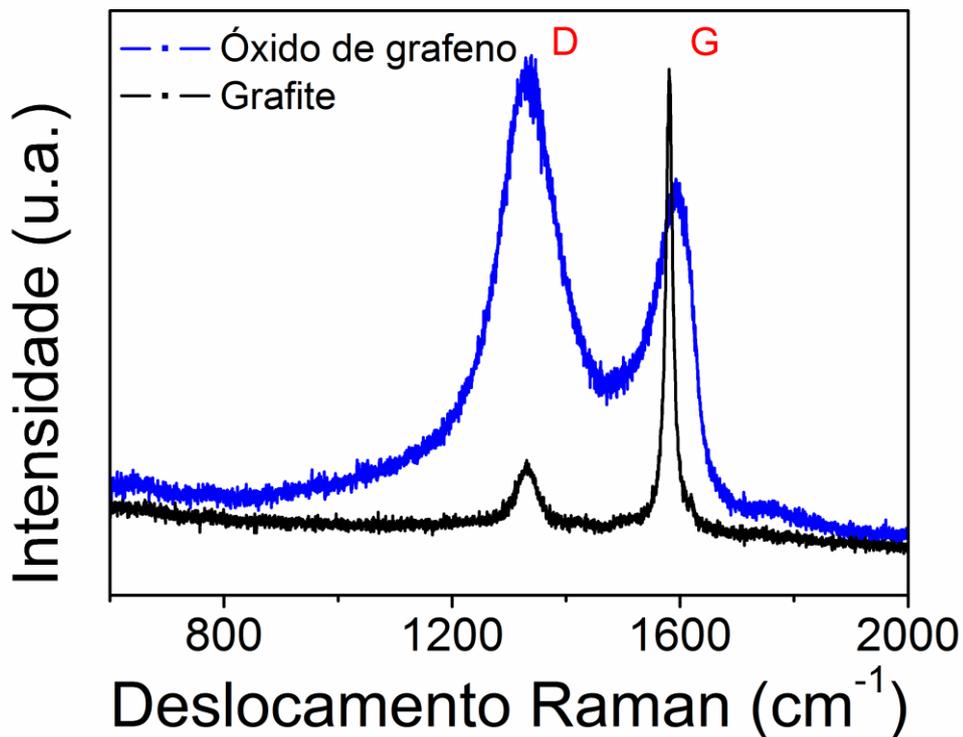


Figura 11 Espectro vibracional de deslocamento Raman do grafite e óxido de grafeno (GO). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

A Figura 12 exibe a imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do óxido de grafeno. A análise permite confirmar a obtenção de folhas transparentes

e lisas. O difratograma do GO apresentado na Figura 13, por sua vez, mostra um pico de difração (002) em $2\theta = 10,4^\circ$, indicando um espaçamento de 0,84 nm entre as camadas, resultante da introdução de grupos oxigenados na superfície GO após a oxidação do grafite. A presença deste pico de difração sugere alguns empilhamentos entre as folhas. Assim, foi realizada a microscopia de força atômica (MFA) de modo a melhor analisar o perfil de empilhamento da amostra e estimar a variação da quantidade de folhas empilhadas.

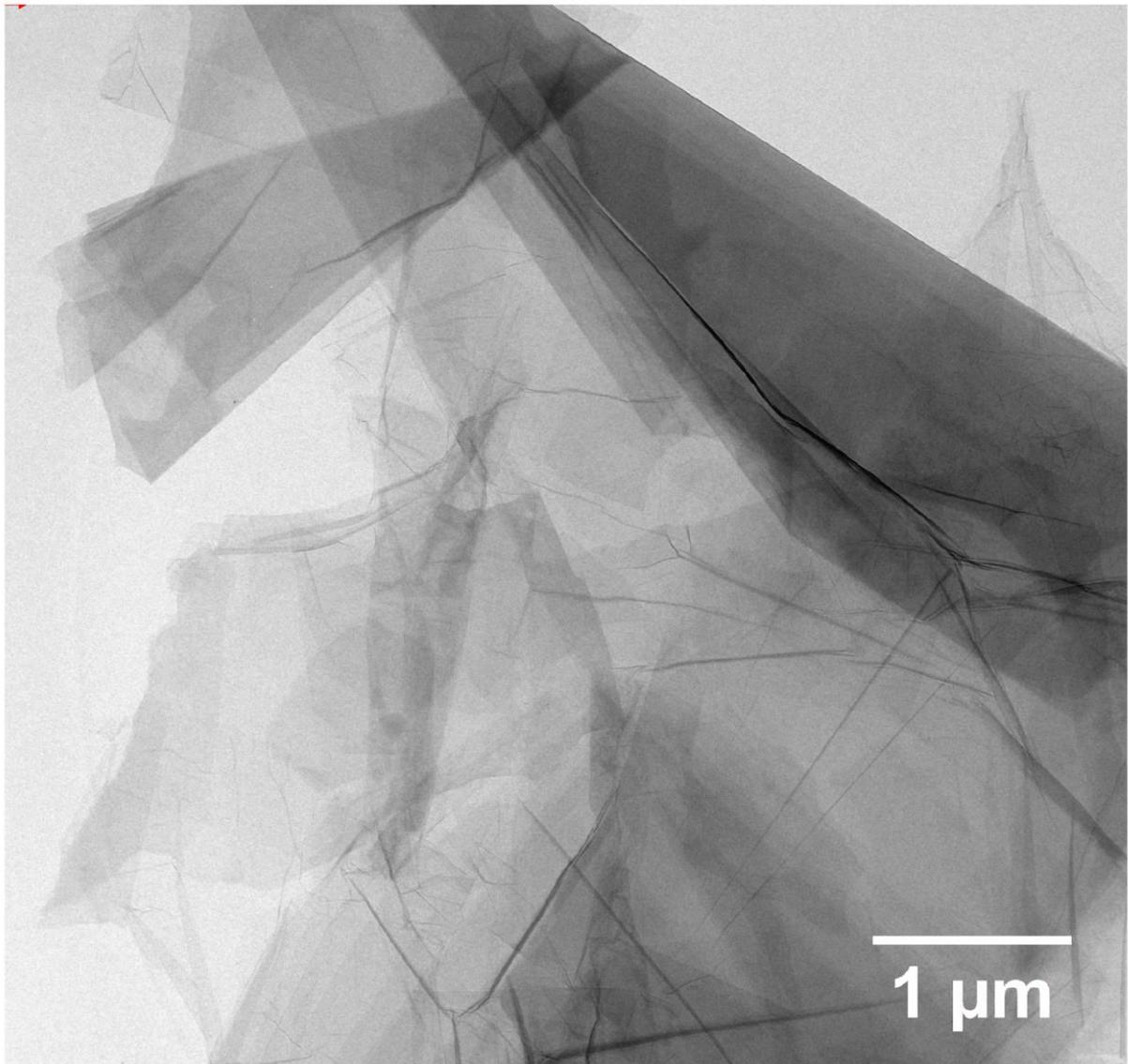


Figura 12 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do óxido de grafeno (GO). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

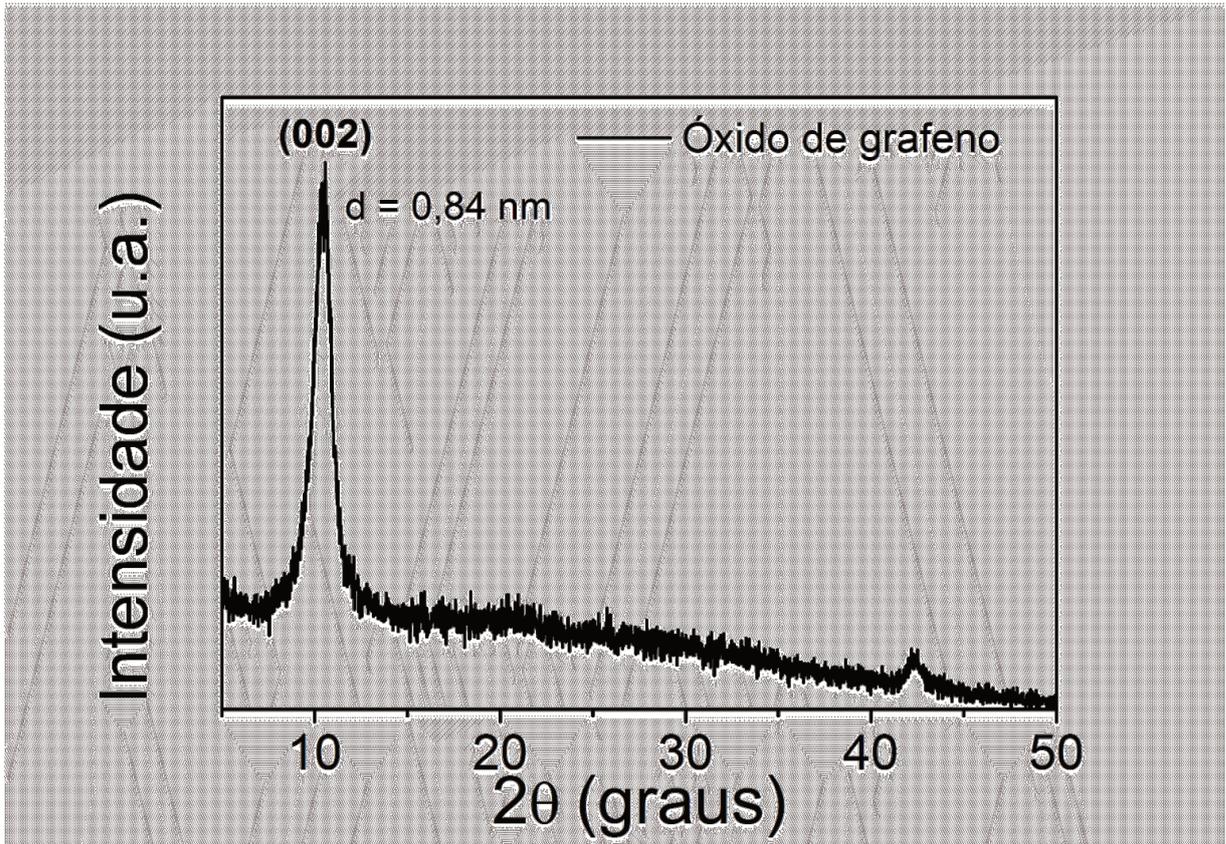


Figura 13 Difratoograma de raios X do óxido de grafeno (GO). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

A imagem de microscopia de força atômica (Figura 14) do GO e seu respectivo histograma de altura das folhas de GO (Figura 15) permitem confirmar sua esfoliação em materiais do tipo monocamada ou poucas camadas, propriedade estrutural típica desse nanomaterial. Corroborando com essas informações, os resultados mostram folhas de óxido de grafeno abrangendo espessuras entre 0,6 e 1,9 nm (espessura média de 1,07 nm), e estão de acordo com a literatura⁶⁷. Essa variação de espessuras corrobora com as informações constantes no difratograma de raios X da Figura 13 no que se refere à presença de empilhamentos na amostra. Sabe-se que uma folha de GO detém espessura de aproximadamente 0,44 nm⁸⁵. Consequentemente, para uma população de óxido de grafeno detendo espessura entre 0,6 e 1,9 nm, o sistema apresenta minoritariamente monocamadas (espessura de 0,6 nm) e blocos de 4 folhas empilhadas (espessura de 1,9 nm). Considerando a população majoritária detendo 1,07 nm de espessura, a amostra apresenta majoritariamente blocos de 2 e de 3 folhas empilhadas.

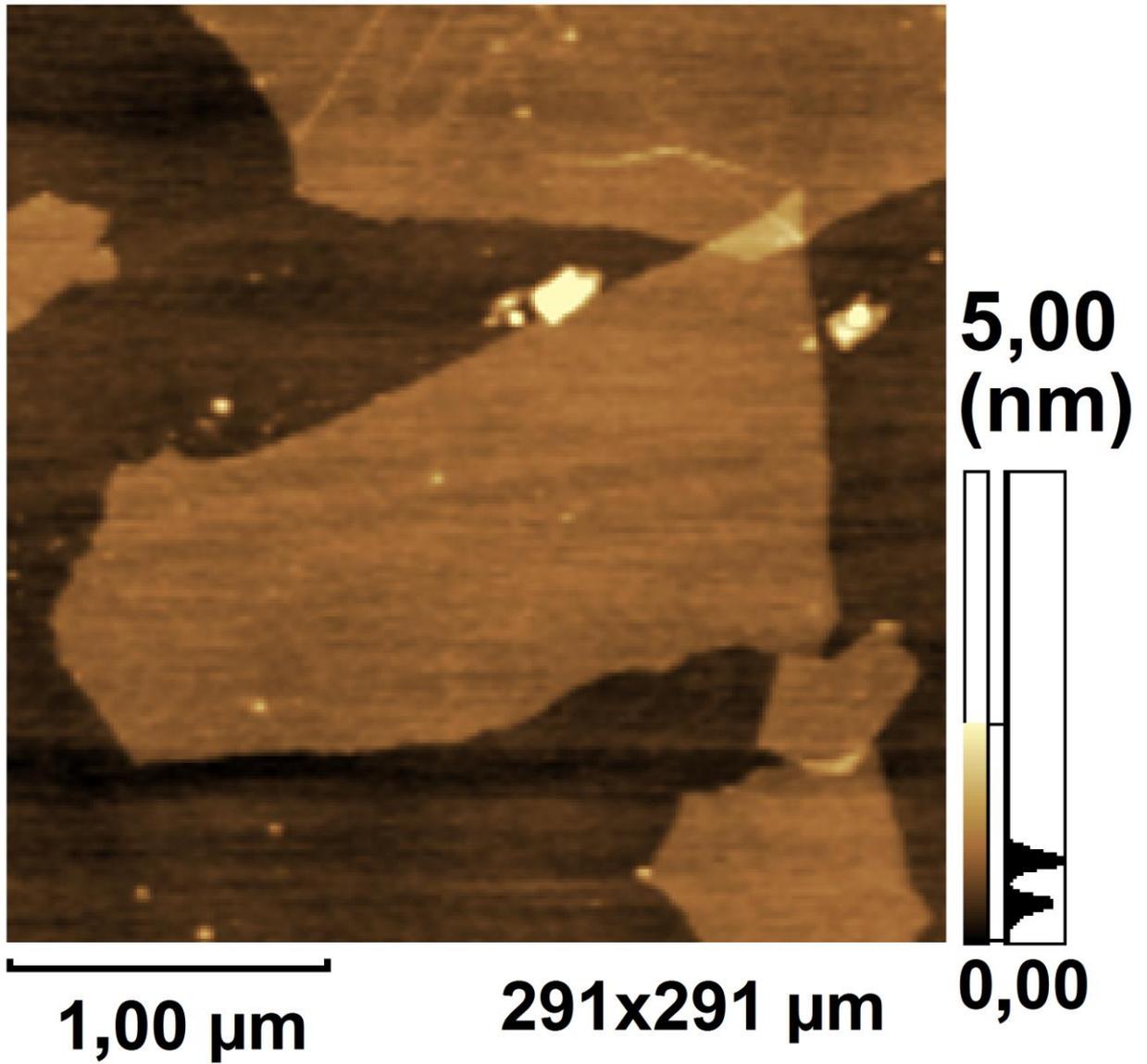


Figura 14 Imagem de microscopia de força atômica (MFA) do óxido de grafeno (GO). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

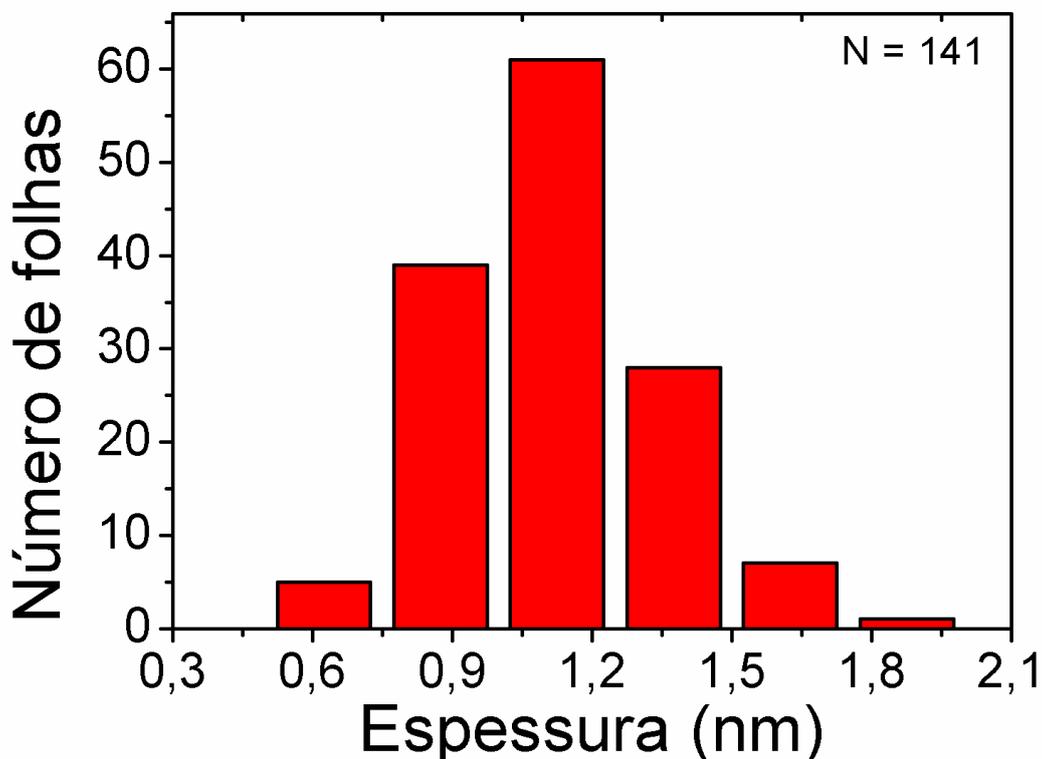


Figura 15 Histograma de altura das folhas do óxido de grafeno (GO). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

A síntese e obtenção dos nanocompósitos de óxido de grafeno e nanopartículas de sílica constitui parte importante e crucial no presente trabalho por se tratar do produto final para as aplicações de interesse. Nesse contexto, a complexidade desse sistema demanda um conjunto de técnicas que possibilitem a extração de informações importantes para a robusta compreensão de suas propriedades físico-químicas. Logo, a complementaridade de cada uma das técnicas de caracterização é estratégica para aquisição de todas as informações.

Primeiramente foram analisadas as variações de carga superficiais (potencial zeta) dos nanomateriais de partida e dos nanocompósitos obtidos, para a prévia constatação de mudanças nas propriedades topográficas. De acordo com a Tabela 1, os resultados mostraram cargas superficiais óxido de grafeno e nanopartículas de sílica como $-45,4 \pm 1,1$ mV e $+24,0 \pm 0,7$ mV, respectivamente. Este resultado sugere a presença de espécies carregadas em ambas as nanoestruturas. As folhas de GO exibiram valores negativos de potencial zeta devido à presença de grupos hidróxi (O^-

) e ácido carboxílico (COO^-) na superfície. As NSMs são positivamente carregadas devido à presença de espécies $-\text{NH}_3^+$ derivadas dos grupos amina na superfície. No que diz respeito aos nanocompósitos GO-NSMs, após a funcionalização de folhas GO com 10% em massa de NSMs (GO-NSM_{10}), a carga superficial apresentou valor de $-26,0 \pm 0,6$ mV em comparação com o óxido de grafeno. Este resultado sugere a presença dos grupos $-\text{NH}_3^+$ das NSMs, resultando em valores menos negativos de potencial zeta em relação ao GO. Ao aumentar a quantidade de nanopartículas no nanocompósito (30 e 50% de massa), os valores de potencial zeta foram para $-27,3 \pm 0,7$ mV e $-23,2 \pm 0,7$ mV em relação aos nanocompósitos GO-NSM_{30} e GO-NSM_{50} , respectivamente, mostrando uma tendência não linear. A presença de cargas negativas e positivas no GO e NSMs, respectivamente, sugerem atração eletrostática entre ambos os materiais. Do ponto de vista eletrostático, a presença das cargas observadas na tabela 1 para esses materiais contribui para sua estabilidade coloidal, prevenindo aglomerações devido às repulsões eletrostáticas.

Tabela 1: potencial zeta aparente dos nanomateriais de partida GO e NSMs e nanocompósitos de óxido de grafeno decorados com nanopartículas sílica mesoporosa (GO-NSMs)

Amostra	Potencial Zeta (ξ)	
	Valor (mV)	Desv. Pad. (mV)
GO	-45,4	1,1
NSMs	+24,0	0,7
GO-NSM_{10}	-26,0	0,6
GO-NSM_{30}	-27,3	0,7
GO-NSM_{50}	-23,2	0,2

As estruturas cristalográficas dos nanocompósitos (Figura 16) foram analisadas através da técnica DRX utilizando-se o DRX do GO como referência. Os

difratogramas dos GO-NSMs exibiram perfis similares ao do óxido de grafeno. A diminuição da intensidade do pico de difração (002) em $2\theta = 10,34^\circ$ observado em todos os casos sugere a diminuição da ordem de longo alcance nas folhas dos GO-NSMs devido à incorporação de sílica na superfície do óxido de grafeno⁸⁶. Este resultado também evidencia a redução do empilhamento das folhas GO após a introdução da sílica⁸¹.

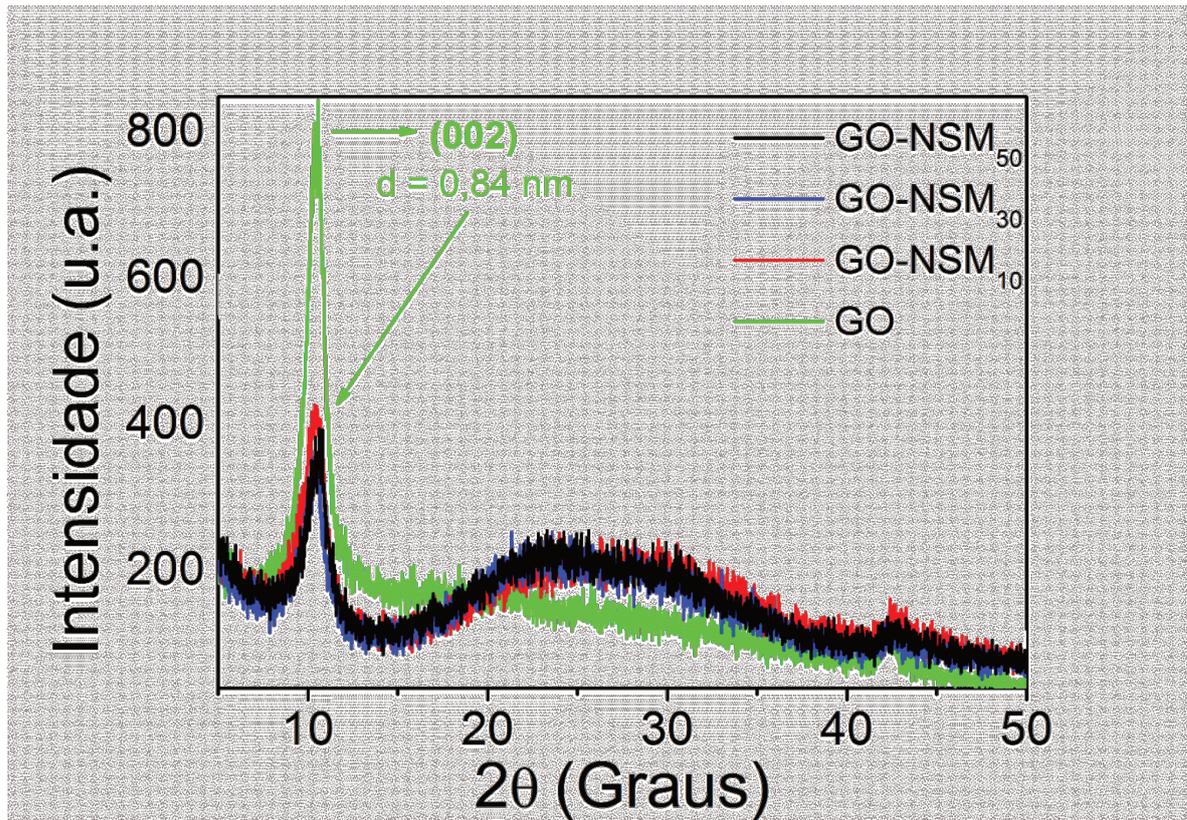


Figura 16 Difratogramas de raios X do óxido de grafeno (GO) e dos nanocompósitos de óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica (GO-NSMs). (**Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.**⁷⁵).

As Figuras 17 e 18 exibem, respectivamente, as curvas termogravimétricas e DTG do óxido de grafeno e dos nanocompósitos. Analisando os resultados do GO, observa-se um evento típico de perda de massa entre 120 e 285°C, referente à decomposição de grupos oxigenados deste material⁶⁷, que representam 35,3% da massa total. O evento de perda de massa observado em 285°C está relacionado à decomposição das regiões gráficas do GO. As massas de sílica nas curvas TG/DTG do GO-NSM₁₀, GO-NSM₃₀ e GO-NSM₅₀ foram 4, 13 e 18%, respectivamente. Os resultados indicam, portanto, quantidades crescentes das

nanopartículas sobre as folhas de óxido de grafeno, proporcionando avaliar sua influência nos efeitos biológicos apresentados posteriormente. Do ponto de vista de estabilidade térmica, a comparação da curva termogravimétrica do óxido de grafeno com aquelas provenientes dos nanocompósitos mostra que a adição de sílica resulta em diminuição dessa estabilidade, visto que os eventos de decomposição térmica dos grupos gráfiticos comentados ocorrem em temperaturas menores. Esse comportamento térmico é resultante da redução do empilhamento do óxido de grafeno nos nanocompósitos, conforme discussão dos resultados da difratometria de raios X da Figura 16. Consequentemente, materiais com menor empilhamento (maior grau de esfoliação) apresentam maior facilidade para decomposição térmica oriunda das regiões gráficas devido às reduzidas interações por empilhamento π .

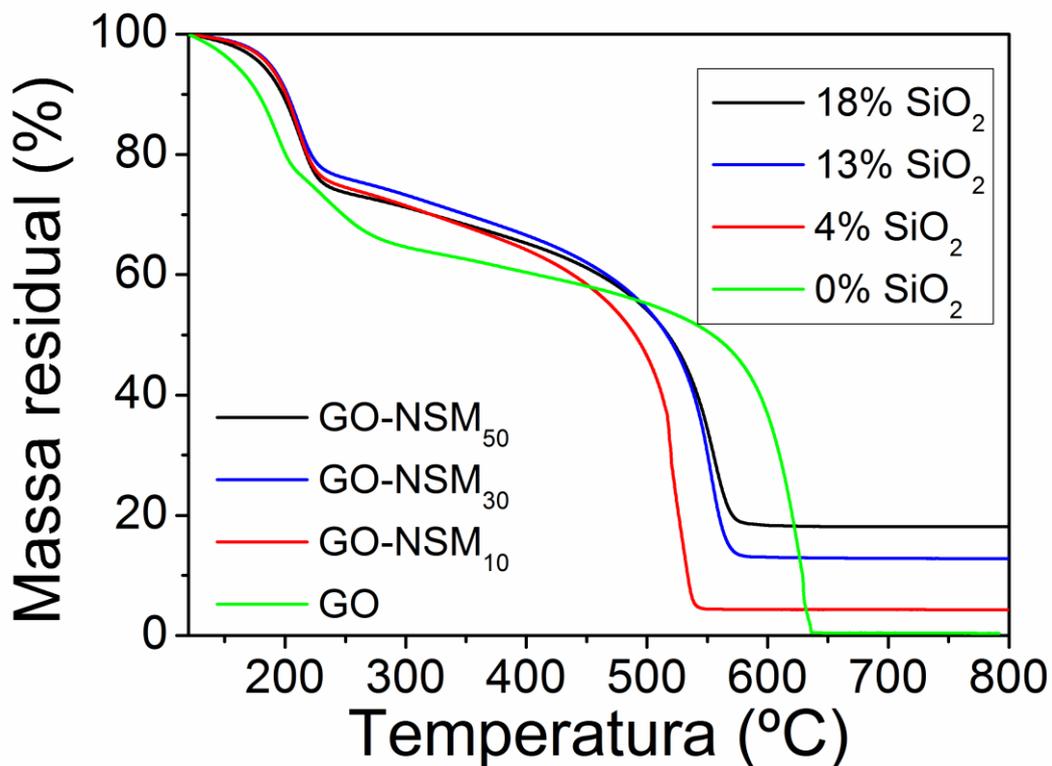


Figura 17 Curvas termogravimétricas (TG) do óxido de grafeno (GO) e dos nanocompósitos de óxido de grafeno decorados com nanopartículas de sílica (GO-NSMs). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

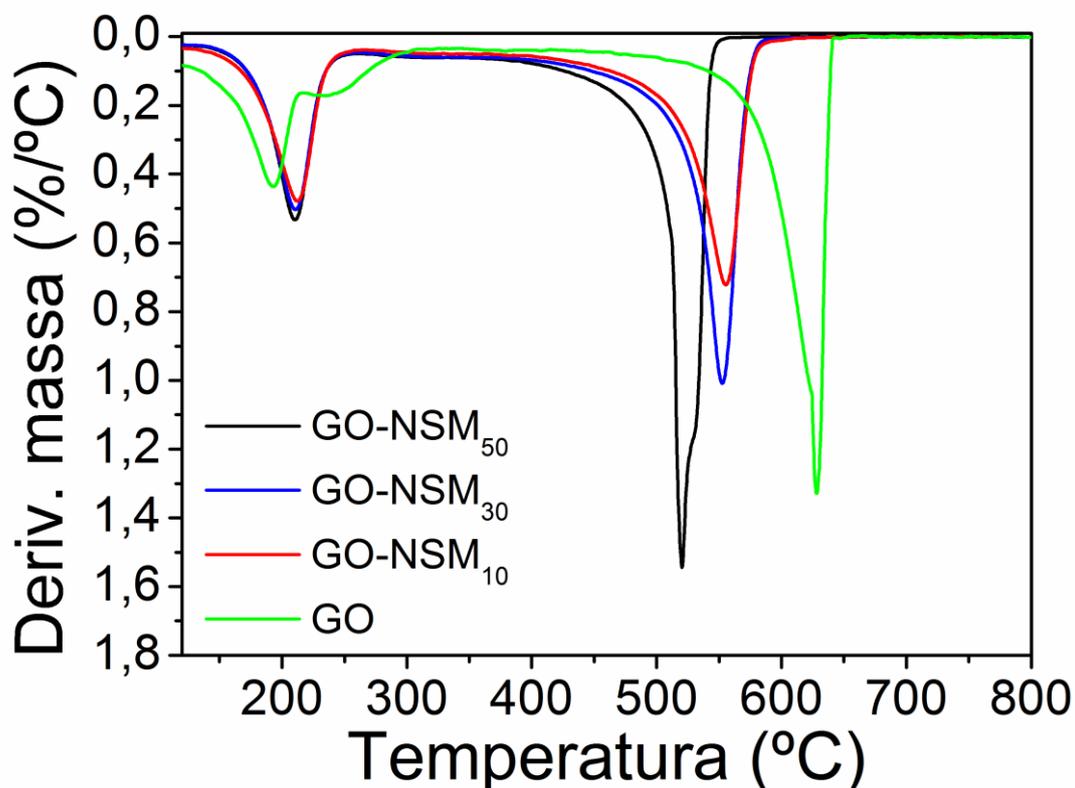


Figura 18 Curvas de primeira derivada das curvas termogravimétricas (DTG) do óxido de grafeno (GO) e dos nanocompósitos de óxido de grafeno decorados com nanopartículas de sílica (GO-NSMs). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

As Figuras 19-24 mostram os espectros de RMN ¹³C do GO e dos nanocompósitos através do método HPDEC. O espectro do GO apresentado na Figura 19 confirma a presença de cetona (192 ppm), ácidos carboxílicos (168), átomos de carbono grafíticos C=C (132 ppm), lactol (102 ppm), C-OH (70 ppm) e grupos epóxi C-O-C (59 ppm), corroborando com os resultados apresentados na literatura⁸⁷.

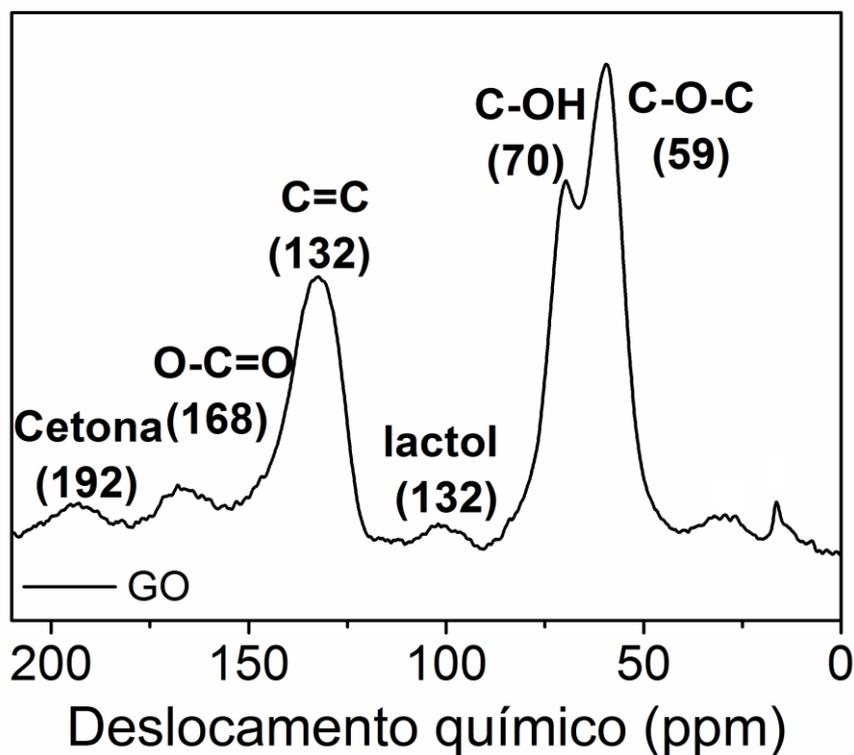


Figura 19 Espectro de RMN ^{13}C do óxido de grafeno (GO). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

As funções orgânicas presentes no GO são também observadas nos espectros dos nanocompósitos (Figuras 20-22) e exibem deslocamentos químicos ligeiramente similares. A quantidade gradual de nanopartículas de sílica nos nanocompósitos é confirmada observando-se a intensidade crescente dos picos sobrepostos na região de deslocamento químico entre 134 e 127 ppm. O espectro do GO-NSM₁₀ (Figura 20) mostra intensidades aumentada e diminuída dos picos C-OH e C-O-C, respectivamente, evidenciando uma diminuição na quantidade de funções epóxi e aumento nos grupos hidroxilas. Este resultado sugere a interessante abertura de anéis epóxi na folha de óxido de grafeno em uma reação que envolve a espécie NH_2 dos grupos aminopropil (APTES) das nanopartículas de sílica para formação de amina secundária (ligação covalente entre o GO e NSM). A interação entre o APTES da sílica e grupos epóxi do GO foi relatada recentemente e corrobora com as típicas reações amina-epóxi^{87,88}.

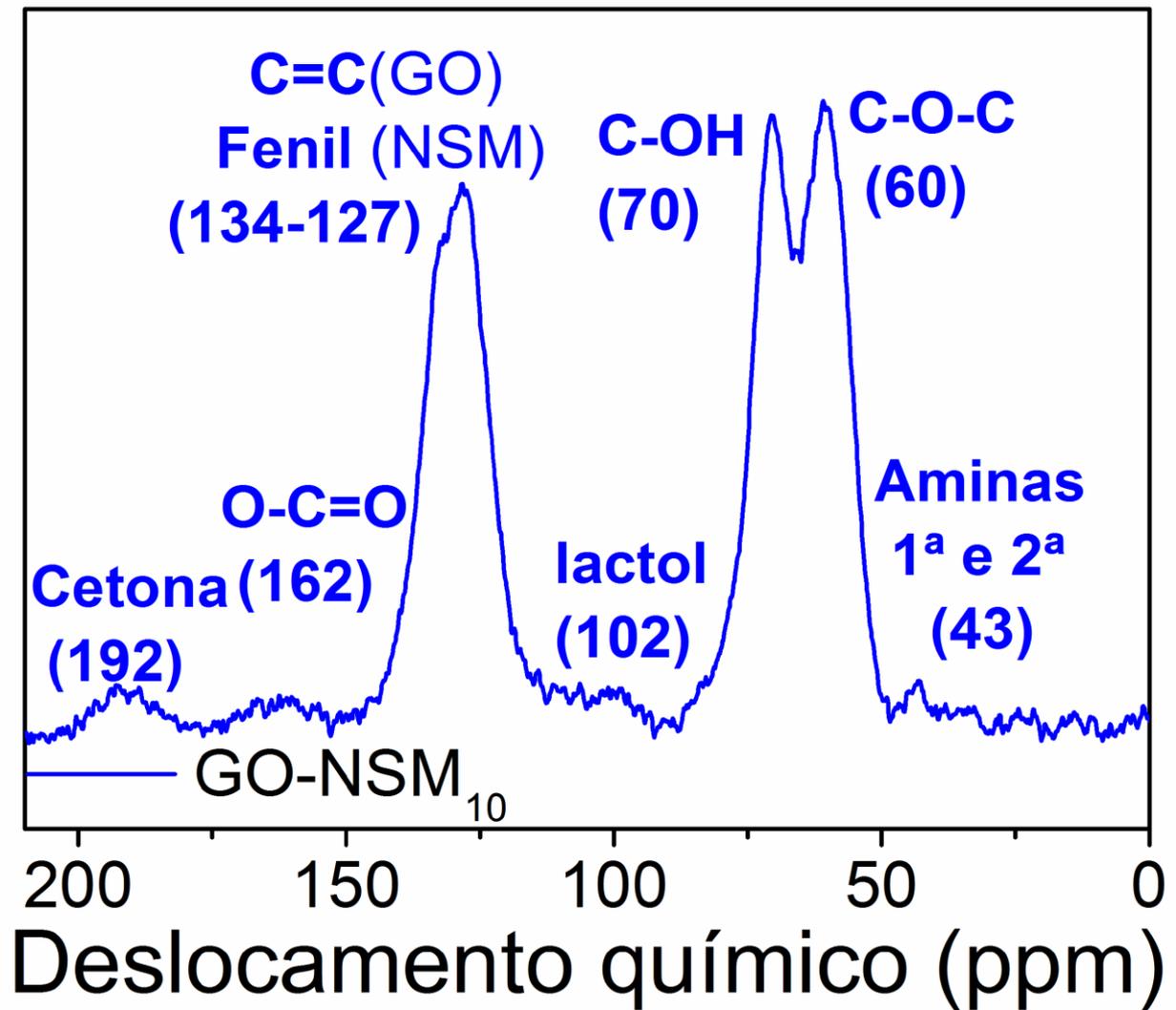


Figura 20 Espectro de RMN ^{13}C do nanocompósito GO-NSM₁₀. (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

Embora em menor magnitude, a intensidade do pico de C-OH aumenta ligeiramente com uma diminuição do pico de C-O-C após adição de 30% em massa de NSM, conforme observado na Figura 21 e corroborando com o resultado observado na Figura 20. Além disso, o pico de aminas secundárias e primárias torna-se gradualmente mais evidente comparando-se os espectros apresentados.

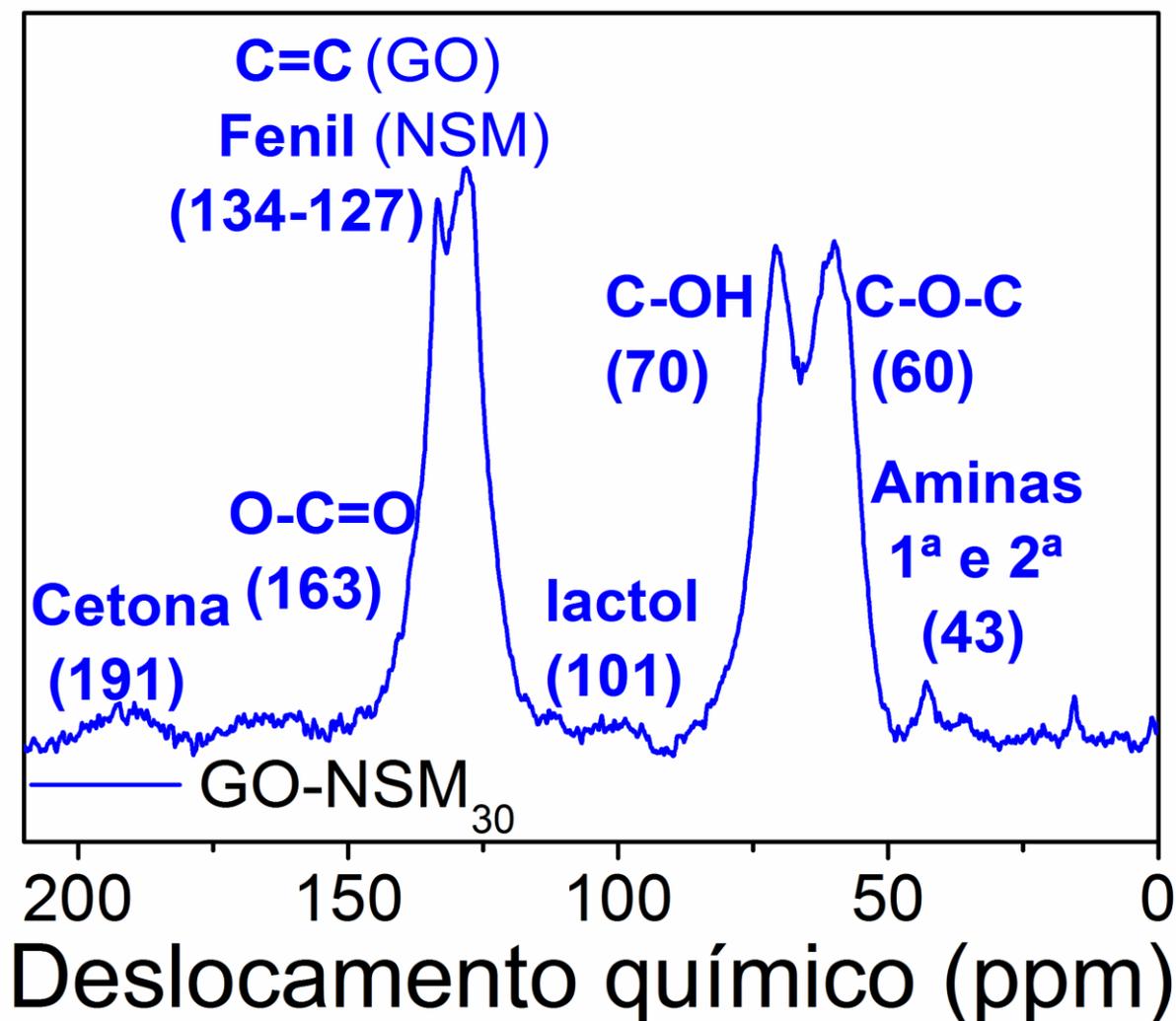


Figura 21 Espectro de RMN ^{13}C do nanocompósito GO-NSM₃₀. (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

A espécie amina do grupo aminopropil tem um par de elétrons que favorece seu ataque nucleofílico nos átomos de carbono da função epóxi, ambos com polaridade positiva devido à densidade de carga concentrada no átomo de oxigênio altamente eletronegativo. Outro fator que contribui para esta reação é a tensão do anel nos grupos epóxi, explicando sua alta reatividade química em comparação com as outras funções oxigenadas presentes no óxido de grafeno (cetona, ácidos carboxílicos e hidroxilas). Conhecendo a estereoespecificidade das reações amina-epóxi, os grupos amina secundária e hidroxila formados ocorrem em superfícies opostas da mesma folha de GO. Surpreendentemente, o espectro de RMN do GO-NSM₅₀ na Figura 22 mostra um distinto e inesperado pico em 111 ppm atribuído aos núcleos de carbono sp^2 (deslocado 21 ppm em relação ao GO), possivelmente

devido a mudanças nas conjugações π - π . O perfil do espectro observado é semelhante aos espectros de RMN ^{13}C observados em materiais à base de óxido de grafeno reduzido (RGO)⁸⁹, mostrando um pico deslocado que possui a maior intensidade em relação a todos os picos decorrentes das funções oxigenadas.

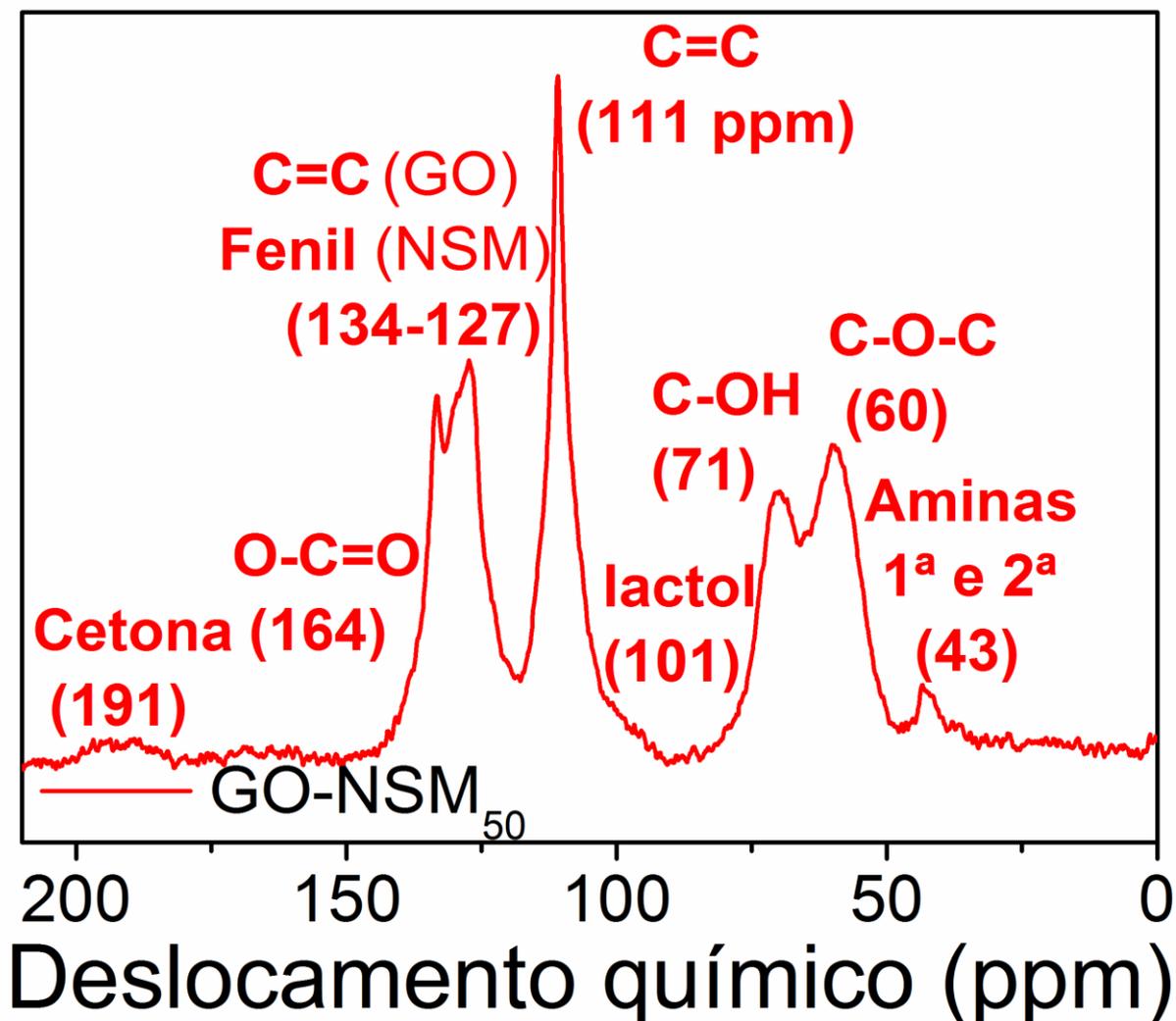


Figura 22 Espectro de RMN ^{13}C do nanocompósito GO-NSM₅₀. (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

O resultado observado na Figura 22 sugere um fenômeno de redução, semelhantemente ao que ocorre no processo de redução usando hidrazina ($\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$) em GO^{39,87}. De forma semelhante a este fenômeno relatado, a reação entre os grupos aminopropil e C-O-C é seguida de desidratação (eliminação de grupos hidroxila) e formação de funções C=C. Esta reação de redução é observada através de uma atenta observação do espectro de RMN de GO-NSM₅₀. Na figura, a

eliminação de água devido ao processo de redução é evidente observando-se a diminuição da intensidade do pico C-OH em relação ao pico C-O-C. Concomitantemente, a observação do pico C=C em 111 ppm sugerindo um novo ambiente químico confirma este processo existente. Curiosamente, os resultados observados mostram que o fenômeno de redução é favorecido pelo aumento da quantidade de sílica, sugerindo uma quantidade mínima de nanopartículas para desencadear a reação. Os efeitos estéricos no GO-NSM₅₀ são possivelmente predominantes em comparação com os outros nanocompósitos obtidos. Neste contexto, as ligações covalentes podem restringir ainda mais as ocupações espaciais de NSMs no sistema. A condição para um material que possa acomodar a maior quantidade possível de nanopartículas de sílica é, portanto, a quebra das ligações covalentes restritivas após o mecanismo de redução, cujos produtos finais são NSMs e GO interagindo através da atração eletrostática, uma força de longo alcance contribuindo para melhor acomodar os coloides na superfície do GO.

A distribuição espacial da sílica na folha de óxido de grafeno foi analisada por microscopia MET (Figuras 23-25) dos nanocompósitos. Os resultados revelaram folhas de GO decoradas com nanopartículas esféricas de sílica. Todos os nanocompósitos apresentaram distribuições espaciais similares de NSMs nas folhas de GO e mantiveram sua integridade morfológica durante as sínteses.

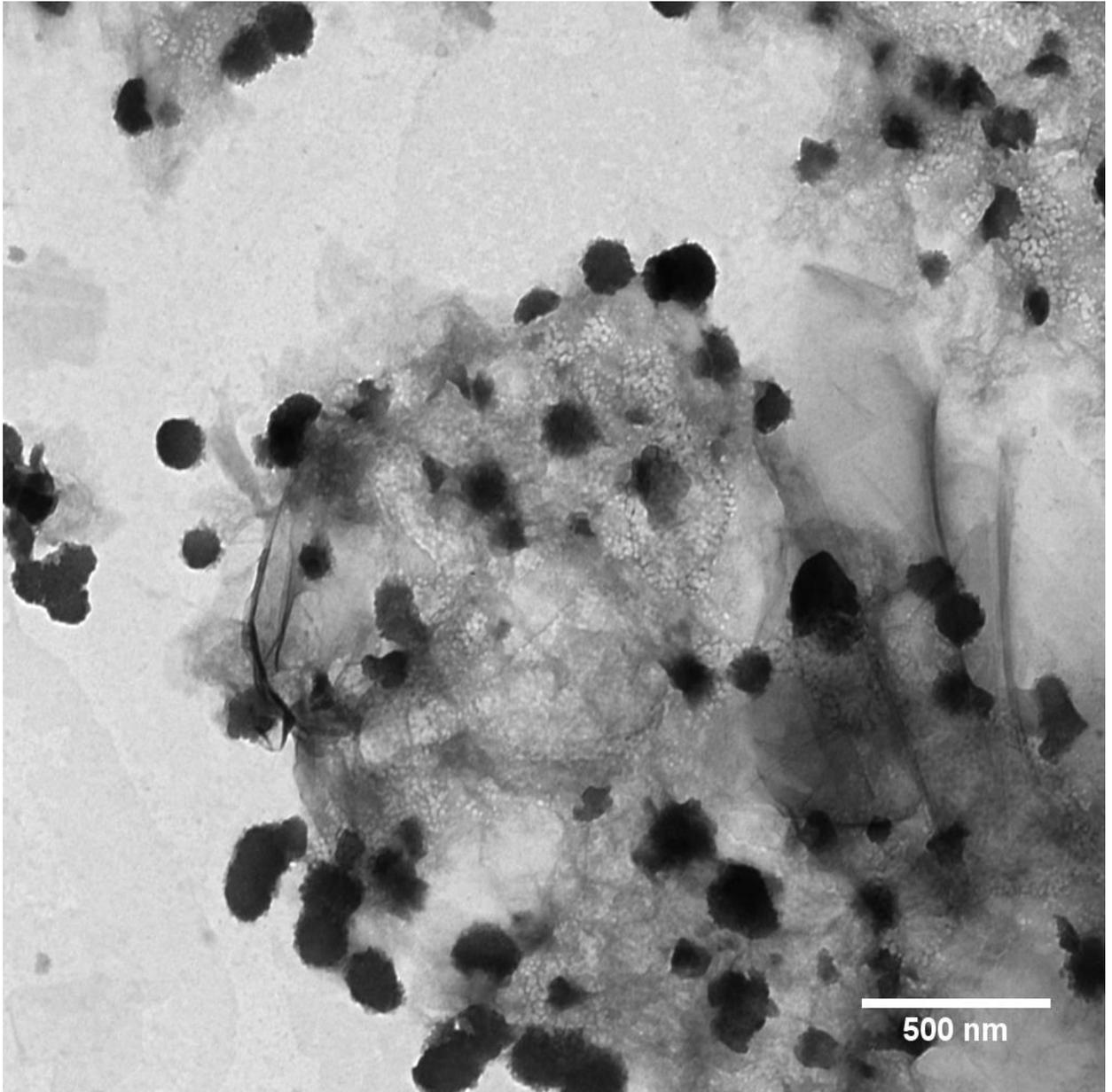


Figura 23 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do nanocompósito GO-NSM₁₀. (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

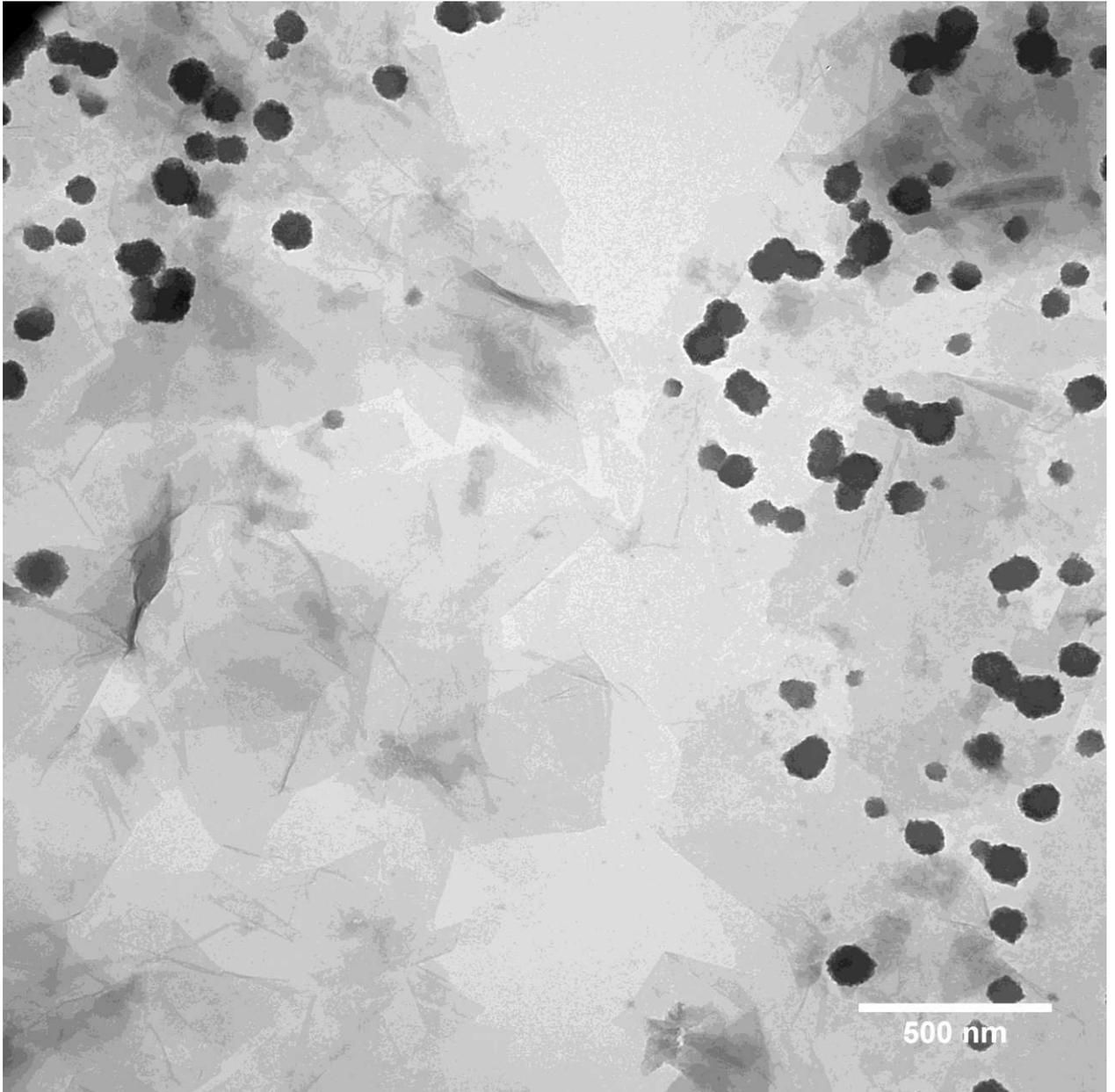


Figura 24 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do nanocompósito GO-NSM₃₀. (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

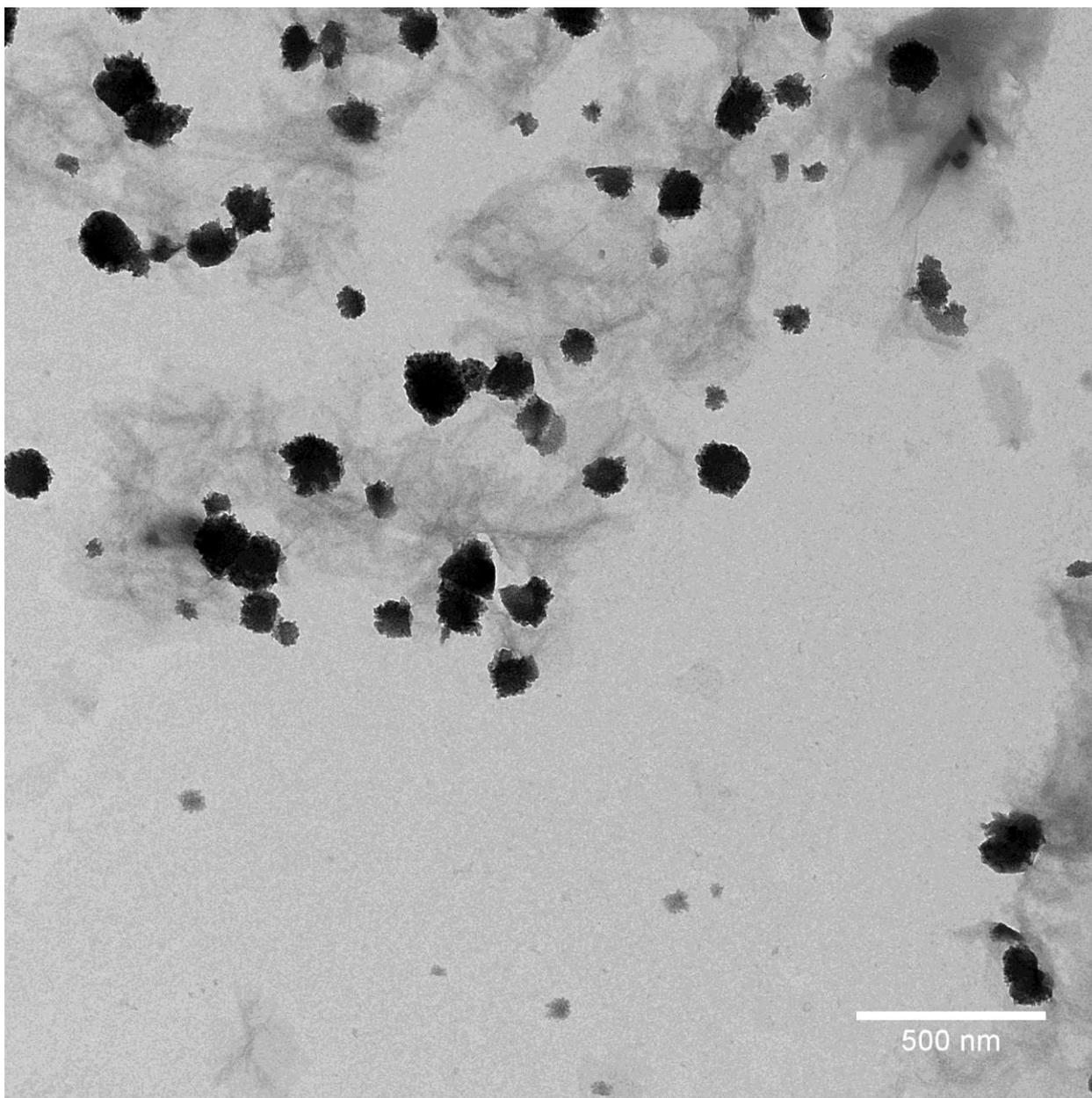


Figura 25 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do nanocompósito GO-NSM₅₀. (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

Portanto, o conjunto das técnicas de RMN, potencial zeta, MET e TG/DTG foi importante para entender as reações amina epóxi majoritárias nos três nanocompósitos e para descobrir o efeito de redução mais pronunciado observado para o GO-NSM₅₀. Baseando-se no mecanismo de redução de GO por hidrazina⁸⁷, um mecanismo de redução deste material por nanopartículas de sílica através de grupos aminopropil é proposto no esquema da Figura 26. Esta proposta abre a possibilidade de futuros estudos teóricos, termodinâmicos e experimentais para uma

abordagem mais robusta do fenômeno confirmado pela ressonância magnética nuclear.

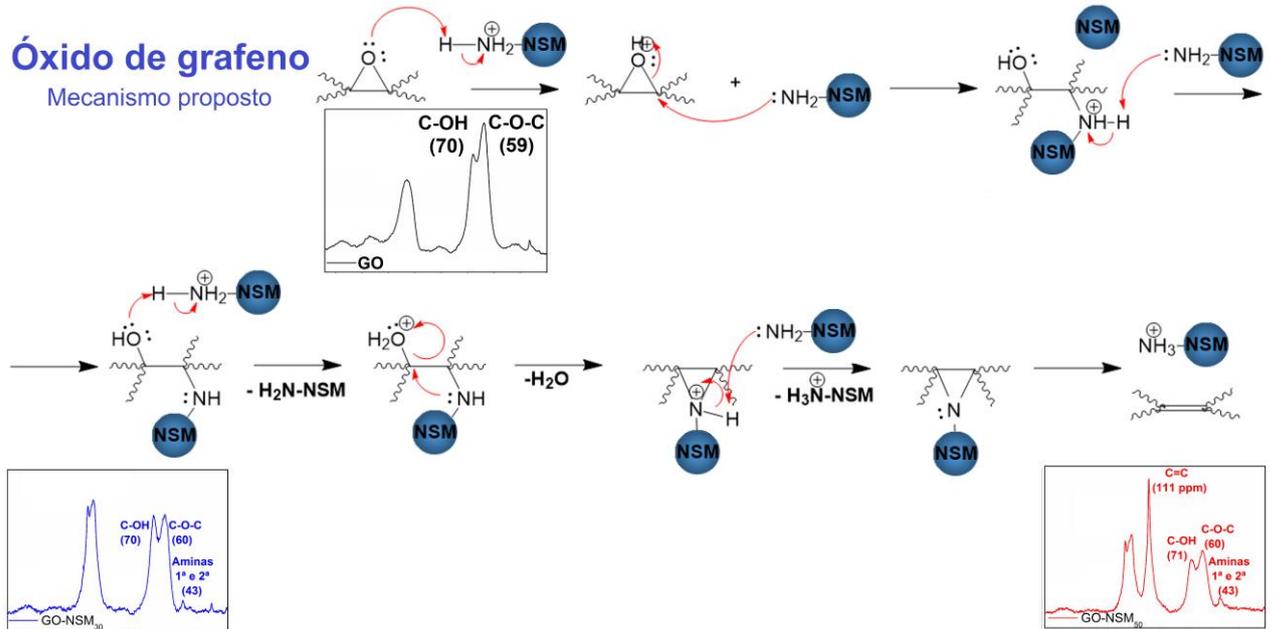


Figura 26 Mecanismo proposto para a redução do óxido de grafeno pelos grupos aminopropil das nanopartículas de sílica mesoporosa. (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

O conjunto de técnicas de caracterização apresentados foram importantes para a confirmação da obtenção de nanocompósitos de óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica. A ligação covalente via amina secundária é uma das principais interações químicas pelas quais mantém ambas as nanoestruturas acopladas. Além disso, considerando-se a presença de cargas superficiais, negativa no GO e positiva na sílica, atrações eletrostáticas entre ambas as entidades nanoestruturas são também presentes nos sistemas formados. Tais interações foram importantes para a efetiva obtenção dos nanomateriais de interesse. O próximo passo do presente trabalho reside na compreensão das interações das nanoestruturas com sistemas biológicos compreendendo as hemácias e as proteínas contidos no plasma humano.

4.3. Ensaio hemolíticos

A Figura 27 exibe os resultados biológicos dos experimentos de hemólise pelo óxido de grafeno e os nanocompósitos obtidos no presente trabalho. Em primeira instância observou-se, em todas as situações, efeitos hemolíticos dose dependentes, isto é, aumento de lise das células vermelhas do sangue proporcional ao aumento de concentração de cada uma das nanoestruturas aplicadas, cuja faixa de valores de concentração é compreendida entre 0 e 250 $\mu\text{g/mL}$. A curva do óxido de grafeno apresenta um resultado interessante do ponto de vista biológico, uma vez que a taxa de hemólise pelo referido material aumenta significativamente a partir da concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. Nessa situação, a taxa hemolítica de $9,5 \pm 1,4$ % passa para valores percentuais de $55,6 \pm 12,1$ % (50 $\mu\text{g/mL}$), $69,6 \pm 16,1$ % (100 $\mu\text{g/mL}$), $82,0 \pm 3,4$ % (150 $\mu\text{g/mL}$), $80,2 \pm 7,3$ % (200 $\mu\text{g/mL}$) e $79,0 \pm 1,6$ % (250 $\mu\text{g/mL}$), indicando baixa hemocompatibilidade do GO. Considerando-se o início das investigações científicas a respeito da interação desse tipo de nanomaterial com sistemas biológicos, há ainda grande discussão sobre o fenômeno mencionado, uma vez que, conforme discutido anteriormente, estudos da literatura reportam óxido de grafeno pristino atrelado a baixos valores de hemólise e estudos compreendendo resultados contrários, isto é, elevados teores de lise das células vermelhas do sangue pelo referido material. De acordo com a análise dos trabalhos, a hemólise pelo óxido de grafeno é atrelada a uma gama de fatores que incluem carga superficial, tamanho das folhas, morfologia, área superficial e teor de oxigênio, sendo esse último relacionado com a formação de espécies de oxigênio reativas, ou ROS, que interferem na lise da membrana das hemácias⁴⁴. Logo, a maneira pela qual o óxido de grafeno é sintetizado, proporcionando características físico-químicas distintas, detém relação com os resultados biológicos mencionados. Nesse contexto, o elevado teor de hemólise observado na Figura 27 pelo óxido de grafeno pode compreender uma série de razões: em um primeiro aspecto, a carga superficial estimada em $-45,4 \pm 1,1$ mV pode deter correlação com o efeito observado. Adicionalmente, sabe-se que as cargas negativas presentes na superfície do GO são provenientes dos grupos hidroxilas (O^-) e carboxilatos (COO^-). Seguindo-se essa linha de raciocínio, uma das hipóteses discutidas na literatura⁴⁶ referente às razões pelas quais a carga superficial negativa é um fator importante na hemólise, referem-se ao fato de que os referidos grupos negativos detém atração eletrostática com a

membrana das células vermelhas do sangue, pois é constituída de lipídios fosfatidilcolina carregados positivamente. Finalmente, a funcionalização do óxido de grafeno com nanopartículas de sílica gerou efeitos hemolíticos não previstos pelo nosso grupo, mostrando significativa redução da porcentagem de lise comparada com a do óxido de grafeno. Uma análise mais detalhada do gráfico contido na Figura 27 mostra, em primeira instância, teores de hemólise quase semelhantes em todos os nanocompósitos obtidos na faixa de concentração entre 0 e 250 $\mu\text{g/mL}$. Nesse contexto, os efeitos hemolíticos das nanoestruturas GO-NSMs na faixa de concentrações entre 50 e 250 $\mu\text{g/mL}$ foram de, no mínimo $4,5 \pm 1,0\%$ (pelo menos 8 vezes menor do que no óxido de grafeno) e no máximo de $37,4 \pm 9,6\%$ (pelo menos duas vezes menor do que no óxido de grafeno). A diminuição das cargas eletrostáticas na superfície dos nanocompósitos observados através da técnica do potencial zeta é possivelmente relacionada ao fenômeno observado, uma vez que a diminuição das espécies de hidróxi (O^-) e ácido carboxílico (COO^-) disponíveis (negativas) pode ser responsável pela minimização da interação com as membranas dos glóbulos vermelhos, diminuindo a hemólise. A morfologia também pode contribuir para os efeitos observados: neste contexto, as folhas de óxido de grafeno podem proteger os grupos silanóis na superfície externa da sílica e esta, por sua vez, protegem as espécies O^- e COO^- na superfície do óxido de grafeno devido à sua interação eletrostática ou covalente, contribuindo para a diminuição da hemólise (há uma simultânea proteção dos grupos silanóis pelo óxido de grafeno e grupos de ácidos carboxílicos/hidróxi protegidos pelas nanopartículas de sílica, funções orgânicas conhecidas pela sua significativa atração eletrostática com as membranas dos glóbulos vermelhos). Portanto, do ponto de vista das aplicações biológicas nos processos de entrega de fármacos, os nanocompósitos são apresentados como potenciais candidatos a serem aplicados por via intravenosa. A Figura 28 mostra a hemoglobina liberada devido à hemólise pelo óxido de grafeno e nanocompósitos.

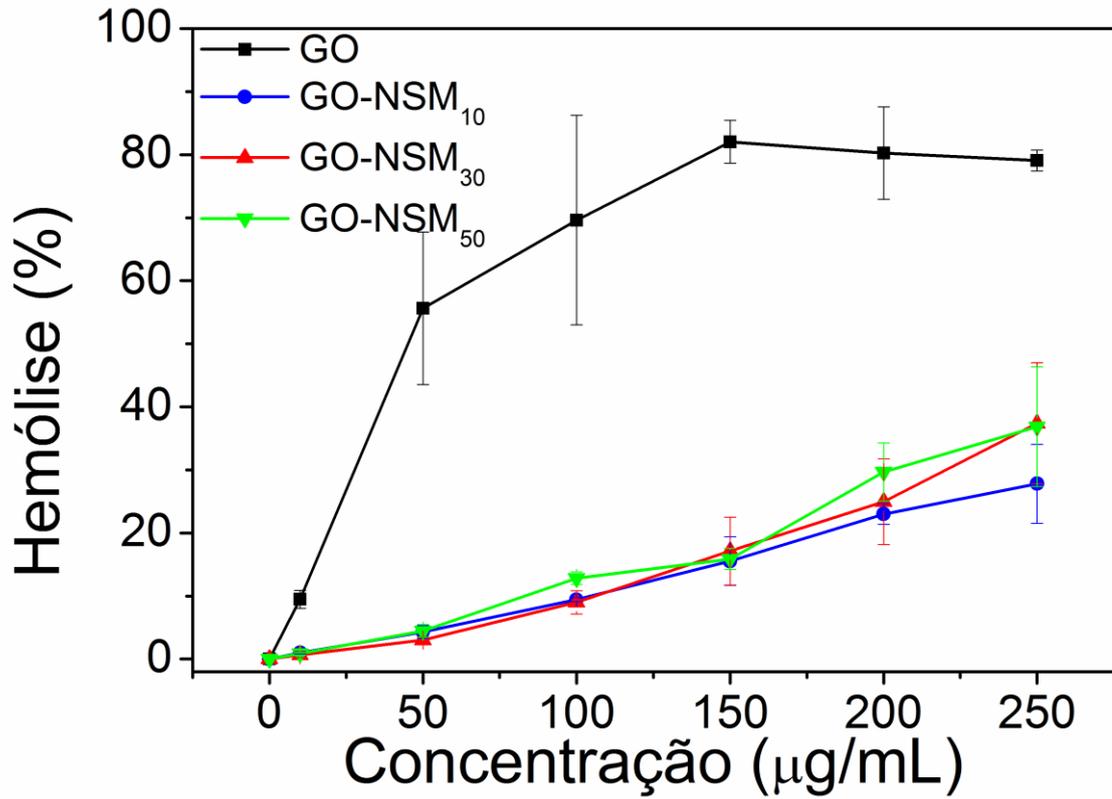


Figura 27 Gráfico de hemólise pelo óxido de grafeno (GO) e nanocompósitos de óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica (GO-NSMs). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

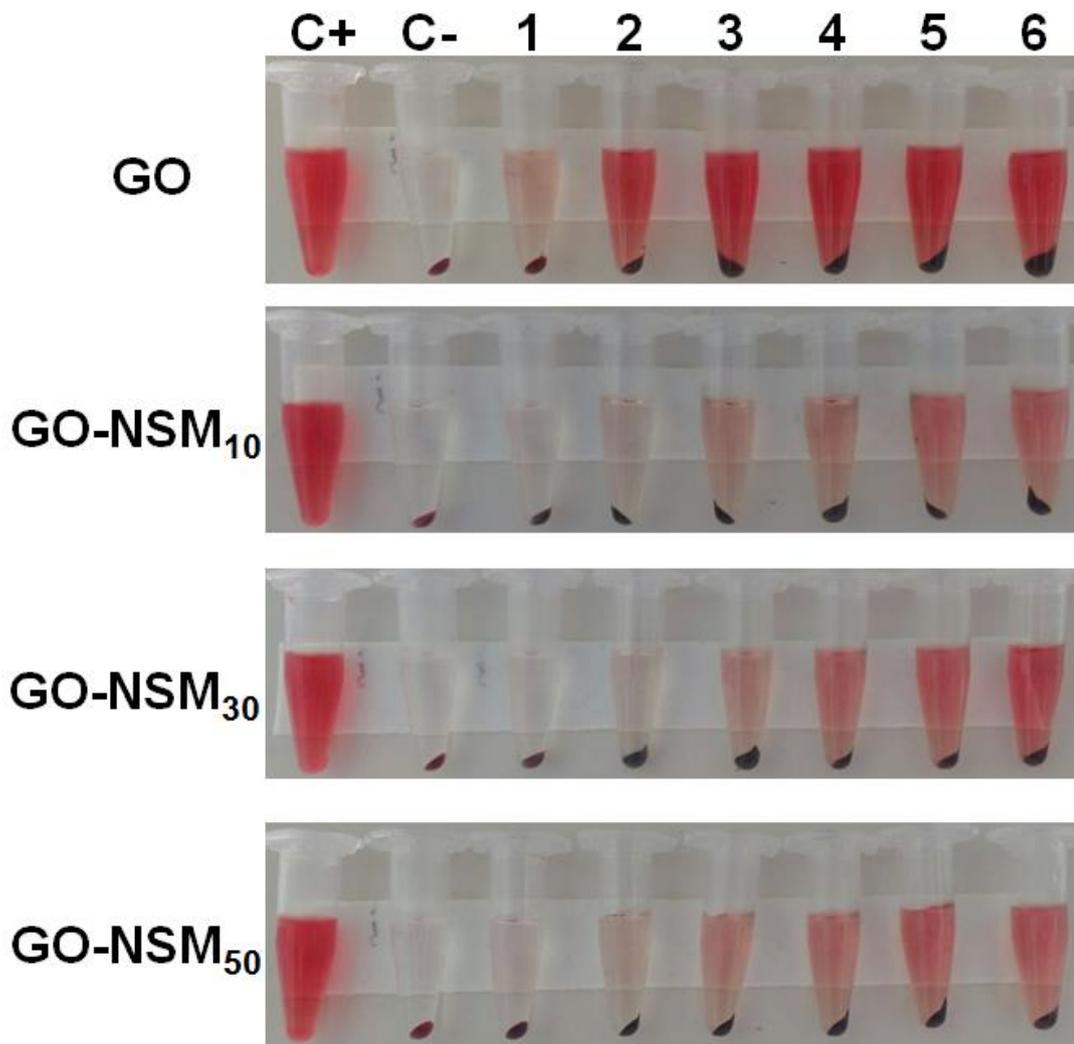


Figura 28 Imagens da hemoglobina liberada após hemólise pelo óxido de grafeno (GO) e nanocompósitos de óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica (GO-NSMs). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

4.4. Ensaio de interação com proteínas (efeito corona)

A Figura 29 apresenta o SDS-PAGE do óxido de grafeno e dos nanocompósitos obtidos no presente trabalho bem como a distribuição de proteínas compreendendo pesos moleculares entre 10 e 250 kDa. No gel de eletroforese do GO são observadas bandas de proteínas abrangendo pesos moleculares de aproximadamente 13 kDa e outra de proteínas entre 32 e 250 kDa, mostrando adsorção de quantidades significativas e de tamanhos variados das referidas macromoléculas. Nesse contexto, há significativa probabilidade de adsorção de proteínas opsoninas, proteínas do sistema imunológico importantes na detecção de

corpos estranhos do sangue. Portanto, o óxido de grafeno obtido ainda não é adequado para aplicação como carreador de fármacos antitumorais, pois seria facilmente removido do organismo vivo, refletindo conseqüentemente em tempos curtos de circulação sanguínea. É importante frisar a relevância do tempo pelo qual um nanocarreador transporta fármacos no sangue, pois trata-se de um parâmetro crucial para aumento de probabilidade de alcance às células alvo. Os nanocompósitos, por sua vez, mostraram resultados interessantes. A análise do gel de eletroforese exibe significativa redução de interação dos materiais GO-NSMs com proteínas, mostrando perfil de bandas semelhantes nos três casos. Mais especificamente, proteínas compreendendo pesos específicos encontram-se adsorvidas em pequenas quantidades, podendo-se observar bandas de polipeptídios de pesos moleculares de 13, 58, 100 e 250 kDa. Conseqüentemente, proteínas compreendidas entre as faixas 13-58 kDa, 58-100 kDa e 100-250 kDa são observadas em quantidades significativamente menores, o que é importante do ponto de vista biológico. Mais especificamente, sabe-se que os anticorpos (também chamados de imunoglobulinas), um dos tipos de opsoninas que atuam na remoção de corpos estranhos no sangue, detém peso molecular de aproximadamente 150 kDa. Este peso molecular refere-se à um tipo de imunoglobulina mais abundante no sangue, a imunoglobulina G (IgG)^{90,91}. Dessa maneira, sabendo-se que proteínas abrangendo o referido valor apresentam pouca ou nenhuma interação com os nanocompósitos (notar que proteínas entre 100 e 250 kDa são pouco observadas no gel), pode-se inferir que a probabilidade de remoção desses materiais pelo sistema imunológico no sangue é baixa, promovendo tempos significativos de circulação sanguínea e, portanto, maiores chances de alcance efetivo às células alvos no processo de carregamento de fármacos antitumorais. De maneira mais abrangente, considerando-se o alto potencial de redução de interação com proteínas pelos nanocompósitos, há significativa probabilidade de pouca adsorção de outros tipos de opsoninas mais específicas do sangue na superfície desses materiais. Do ponto de vista físico-químico, o efeito corona reduzido observado pode estar relacionado, em primeira instância, com a diminuição de cargas eletrostáticas negativas nos nanocompósitos em relação ao óxido de grafeno pristino e com os grupamentos aromáticos, uma vez que as proteínas são atraídas eletrostaticamente e por interações hidrofóbicas, respectivamente⁹². A segunda possibilidade para explicação dos efeitos observados pode ter origem estereoquímica, isto é, a presença de sílica

na superfície do GO pode gerar efeitos estéricos capazes de minimizar sua atração com os polipeptídios. É interessante notar que, a redução de cargas eletrostáticas tendendo à neutralidade e o aumento do caráter hidrofílico é um efeito conhecido e proveniente de processos de funcionalização de nanopartículas de sílica com um polímero denominado polietileno glicol (neutro e hidrofílico) aplicadas para redução do efeito corona, hemocompatibilidade e carregamento de fármacos⁹². No caso dos nanocompósitos, as referidas propriedades físico-químicas refletem um efeito sinérgico proveniente do acoplamento das nanopartículas de sílica com óxido de grafeno que, quando isolados, são caracterizados pela elevada adsorção de proteínas. Os resultados provenientes dos experimentos de efeito corona e hemólise sugerem a possibilidade de potencial aplicação dos nanocompósitos como carreadores de fármacos antitumorais no sangue, uma vez que mostraram uma redução no efeito hemolítico e com alta probabilidade de tempos elevados de circulação sanguínea devido à baixa interação com proteínas (podendo incluir as opsoninas) do plasma sanguíneo.

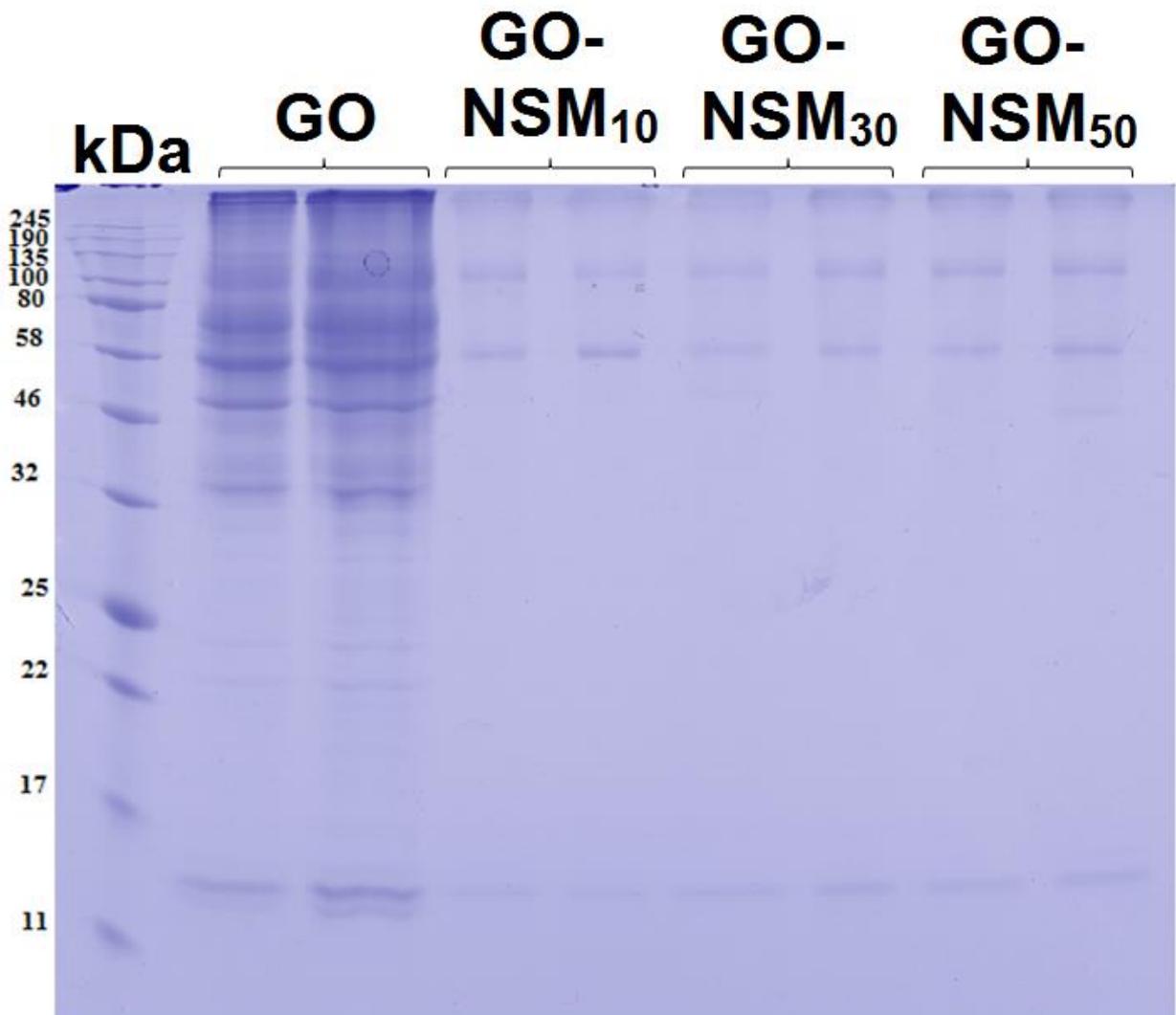


Figura 29 Análise de eletroforese em SDS-PAGE de proteínas corona fortemente adsorvidas e extraídas da superfície do óxido de grafeno (GO) e dos nanocompósitos de óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica (GO-NSMs). (Figura obtida do trabalho de Fonseca et al.⁷⁵).

4.5. Interação de camptotecina nos nanomateriais NSMs, GO e GO-NSM₁₀

A interação de camptotecina foi realizada nas nanopartículas de sílica (NSMs), no óxido de grafeno (GO) e no nanocompósito GO-NSM₁₀ estrategicamente selecionado. A seleção desse último material foi embasada nos resultados obtidos nos experimentos de hemólise e corona descritos. Os três nanocompósitos sintetizados mostraram efeitos semelhantes do ponto de vista de taxa hemolítica e adsorção de proteínas do plasma humano. Dessa maneira, o GO-NSM₁₀ detendo a

menor quantidade de sílica adicionada compreende melhor estabilidade coloidal no que se refere a seu peso total, o que motivou e levou à sua escolha. É importante também mencionar que a estabilidade coloidal desse nanocompósito também é favorecida devido à presença de cargas majoritariamente negativas em sua superfície (-26,0 mV), levando a mútuas repulsões eletrostáticas que previnem a possibilidade de aglomeração.

A capacidade de encapsulamento/adsorção da camptotecina em cada um dos nanocarreadores foram de $8,1 \pm 0,4\%$ (NSM+CPT), $81,1 \pm 3,7\%$ (GO+CPT) e $80,9 \pm 0,9\%$ (GO-NSM₁₀+CPT). Os nanocarreadores GO e GO-NSM₁₀ possuem teor de camptotecina semelhantes e 10 vezes maior comparado com as nanopartículas de sílica. À priori, tal resultado sugere fortes interações fármaco-nanocarreador para os sistemas GO+CPT e GO-NSM₁₀+CPT. Uma abordagem mais robusta para suportar essa hipótese inicial é discutida a seguir.

No espectro da camptotecina adquirido em metanol (devido à baixa solubilidade da camptotecina em água) e apresentado na Figura 30 observa-se uma banda larga em 365 nm referente às transições eletrônicas $n-\pi^{*93}$ presentes nessa molécula sob sua forma carboxilato (CPT-carb⁻)⁹⁴. É importante mencionar que a presença de camptotecina majoritariamente na forma lactona (CPT-lac) pode ser analisada observando-se a mesma banda larga mencionada contendo, no entanto, dois ombros em aproximadamente 355 e 370 nm⁹⁴, também referentes às transições $n-\pi^*$. O referido fármaco antitumoral apresenta, ainda, uma banda larga em 253 nm referentes às transições $\pi-\pi^{*93}$.

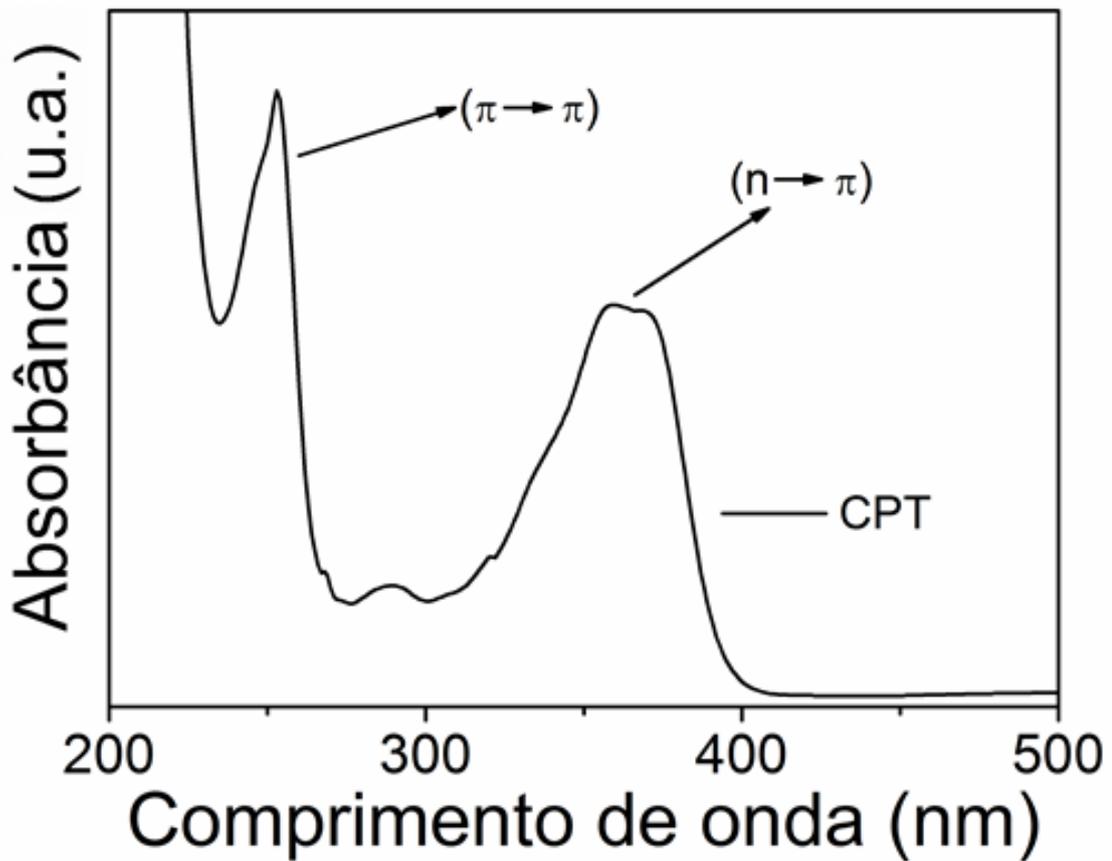


Figura 30 Espectro UV-Vis da Camptotecina (CPT) adquirido em metanol.

O espectro UV-Vis das nanopartículas de sílica contendo camptotecina encapsulada, adquirido em água, é observado na Figura 31. Na imagem são observadas as bandas da camptotecina em 253 nm (transições $\pi - \pi^*$) e dois ombros em 354 e 368 nm referentes às transições eletrônicas $n - \pi^*$ desse fármaco, confirmando sua presença no nanomaterial.

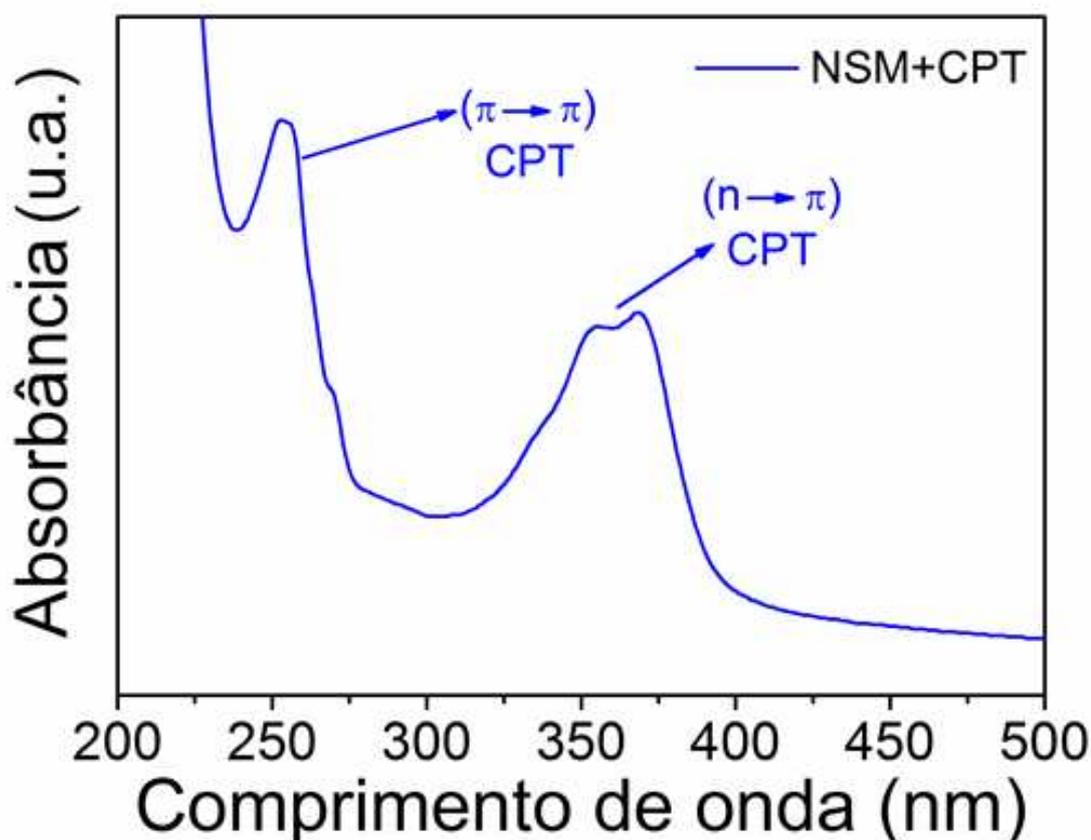


Figura 31 Espectro UV-Vis das nanopartículas de sílica contendo camptotecina encapsulada (NSM+CPT) adquirido em água.

O espectro UV-Vis do óxido de grafeno (GO) apresentado na Figura 32, também adquirido em água, mostra uma banda significativamente larga em 232 nm e um ombro alargado em 294 nm referentes, respectivamente, à transições eletrônicas π - π^* dos anéis conjugados (C=C) e n - π^* nos grupos C=O⁹⁵. A introdução de camptotecina no óxido de grafeno influencia de maneira significativa o perfil eletrônico do sistema conforme observado no espectro do GO+CPT na Figura 32. Nesse contexto, são observadas duas bandas largas em 218 e 251 nm referentes às transições eletrônicas π - π^* do GO e da camptotecina. É notório, ainda, a ausência do pico intenso em 232 nm (como anteriormente observado no espectro do GO), sugerindo mudança na estrutura eletrônica devido às interações GO-CPT. Esse conjunto de resultados sugere a interação química entre o óxido de grafeno e a camptotecina através de empilhamento π - π . A região espectral no intervalo de comprimentos de onda entre 325 e 425 nm é oriunda das absorções eletrônicas da camptotecina, possibilitando confirmar sua adsorção. Inesperadamente o espectro

do sistema GO+CPT apresentou outra banda em 396 nm sugerindo um novo tipo de transição eletrônica não observado no espectro da CPT livre adquirido em metanol e da NSM+CPT adquirido em água discutido anteriormente. Esse resultado é mostrado em alguns trabalhos publicados^{30,96,97} relacionados a materiais à base de óxido de grafeno contendo camptotecina adsorvida. À priori, a presença dessa banda inesperada poderia ter influência da água, visto que o espectro da camptotecina livre foi adquirido em metanol. Como a NSM+CPT não apresentou a banda em 396 nm e foi adquirida em água, a hipótese de influência do solvente foi descartada. Esse resultado, portanto, sugere o possível processo de associação intermolecular entre essas moléculas⁹⁸ (CPT-CPT) favorecido pela presença do óxido de grafeno como um molde detendo morfologia favorável para esse fenômeno (GO-CPT-CPT). Adicionalmente, a elevada concentração de camptotecina no GO+CPT (81,1±3,7%) é outro possível fator relevante que favorece essa associação⁹⁸.

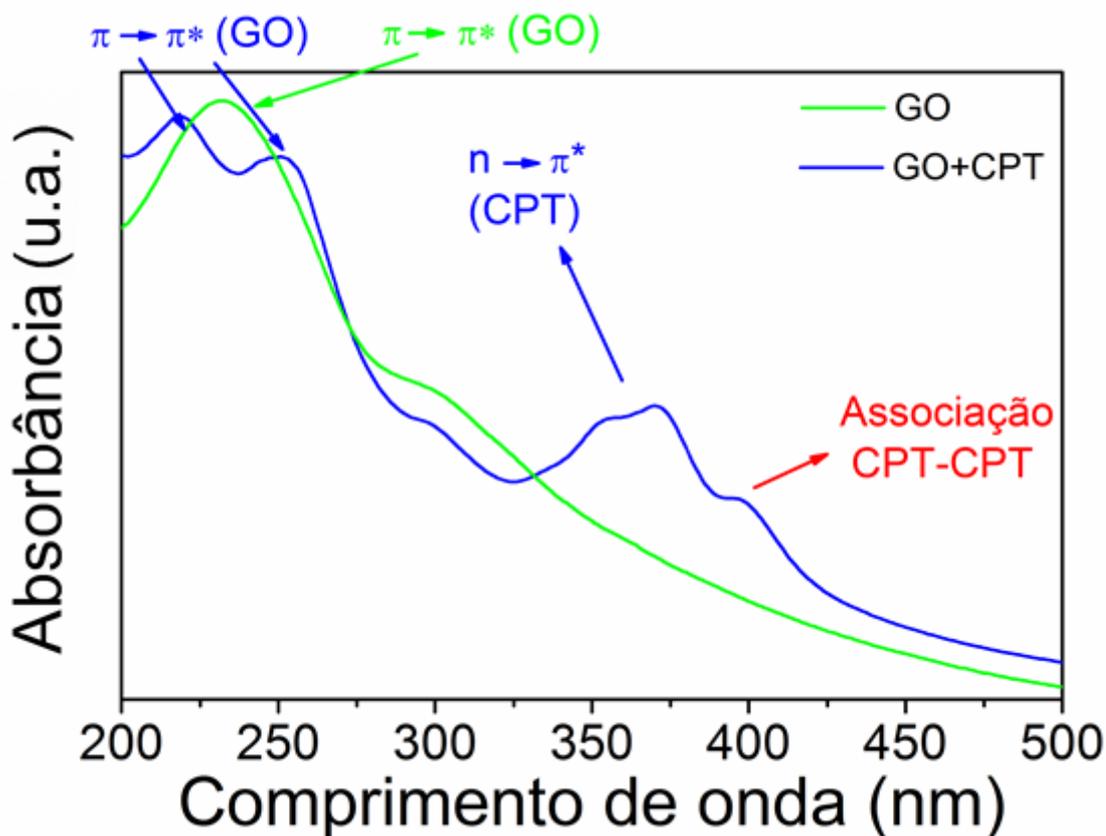


Figura 32 Espectros UV-Vis do óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno contendo camptotecina adsorvida (GO+CPT) adquiridos em água.

De acordo com o espectro UV-Vis do GO-NSM₁₀+CPT apresentado na Figura 33, adquirido em água, os efeitos eletrônicos observados no processo de adsorção de CPT são semelhantes ao sistema GO+CPT (também observado na Figura 33 para comparação), visto que a banda em 237 nm não é mais observada à medida em que duas outras são observadas em 218 e 251 nm, sugerindo mudança de ambiente químico devido às interações químicas entre o nanomaterial e a molécula por empilhamento π e a sobreposição com as bandas π - π^* da CPT. As bandas observadas na região entre 325 e 425 nm, por sua vez, detém perfil idêntico àquelas mostradas no espectro do GO+CPT, sugerindo e complementando a hipótese das interações fármaco-nanocarreador comentadas e sugerindo as interações intermoleculares entre as moléculas de camptotecina (CPT-CPT) também sobre a superfície do GO-NSM₁₀. Sabendo-se da baixa capacidade de encapsulamento de camptotecina na sílica em relação ao óxido de grafeno, as moléculas de CPT possivelmente interagem majoritariamente na região do óxido de grafeno e minoritariamente no interior da sílica na amostra GO-NSM₁₀.

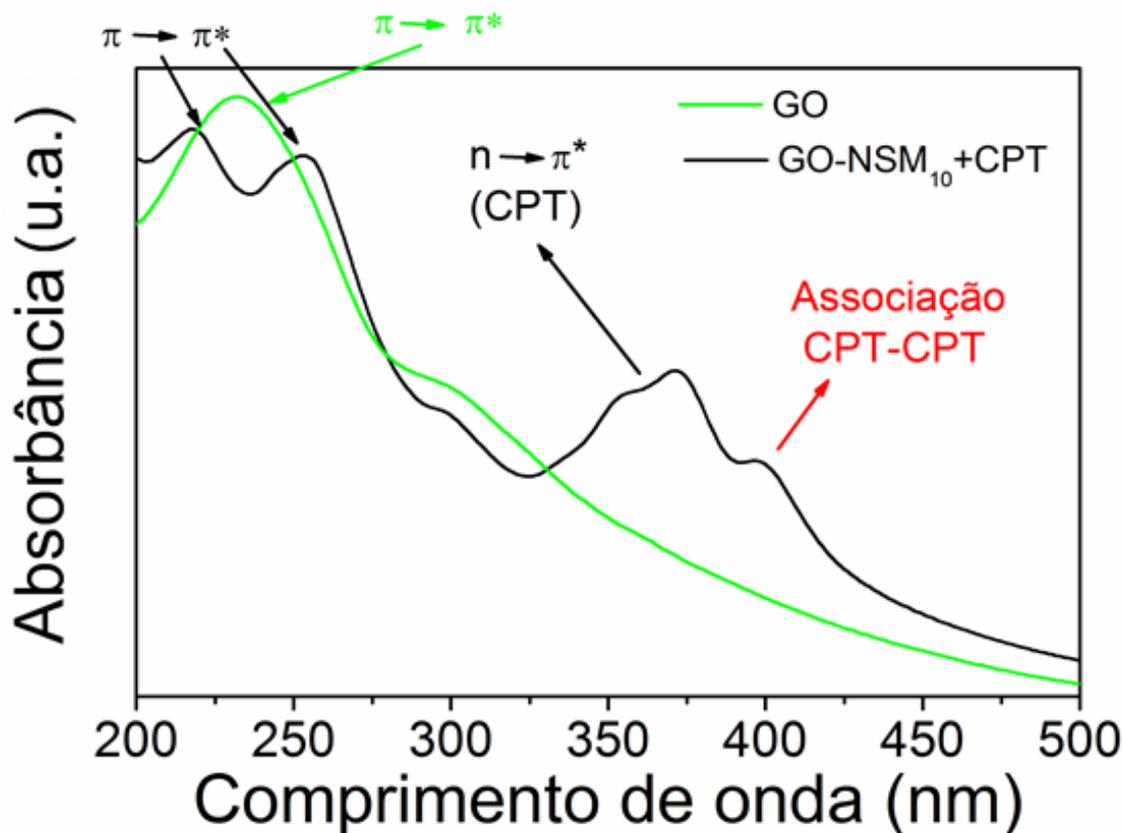


Figura 33 Espectros UV-Vis do óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica e contendo camptotecina adsorvida (GO-NSM₁₀+CPT), adquiridos em água.

A introdução da camptotecina nos materiais NSMs, GO e GO-NSM₁₀ foi avaliada pela difratometria de raios X, sendo os resultados discutidos a seguir.

O difratograma de raios X da NSM+CPT apresentado na Figura 34 manteve o perfil de baixa cristalinidade da NSM já discutido anteriormente.

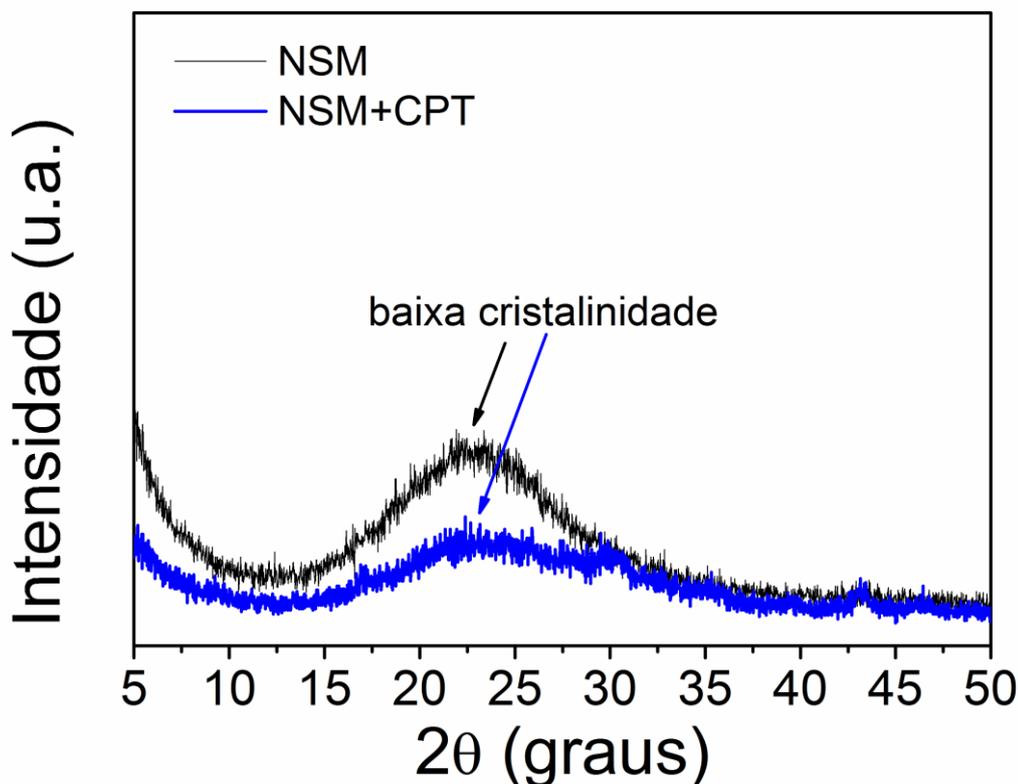


Figura 34 Difratoogramas de raios X das nanopartículas de sílica isenta (NSM) e contendo a camptotecina (NSM+CPT).

A adição da CPT no GO e GO-NSM₁₀ ocasionou diminuição de intensidade do pico referente ao plano (002) em ambas as situações, efeito semelhante ao que ocorre na interação das nanopartículas de sílica com o óxido de grafeno. Nesse contexto, a adição do fármaco gera esfoliação das folhas, o que aumenta a acessibilidade química. Nota-se que o perfil dos picos referentes ao plano (002) no GO+CPT (Figura 35) e GO-NSM₁₀+CPT (Figura 36) foi similar no contexto dos valores de 2θ . Mais especificamente, os valores de d foram medidos considerando-se a largura à meia altura, por se tratar de sistemas complexos. Após a adição de CPT no GO, cujos valores iniciais de d variam de 0,80 a 0,90 nm (medidos na largura à meia altura), o espaçamento interplanar manteve-se constante, variando de 0,80 a 0,95 nm. Os valores de espaçamento interplanar variando de 0,81 a 0,93 nm no GO-NSM₁₀ também se mantiveram constantes no GO-NSM₁₀+CPT (entre 0,85 e 0,93 nm). Esses resultados sugerem que não houve intercalação da camptotecina nesses sistemas, isto é, a adição desse fármaco promoveu apenas a esfoliação.

Adicionalmente, é observado nos difratogramas do GO+CPT e GO-NSM₁₀+CPT um pico em $2\theta = 12,5^\circ$, sugerindo a formação de uma nova estrutura cristalina anteriormente não observada. Em nossa hipótese, esse resultado sugere a possível cristalização de camptotecina na superfície do óxido de grafeno e do nanocompósito. A formação desses cristais é possivelmente atrelada às interações CPT-CPT que ocorrem na dispersão aquosa e, após a secagem da amostra para o experimento de DRX, as moléculas antitumorais se organizam no sistema formando-se uma estrutura cristalina. A presença de picos possivelmente relacionados à formação de cristais de camptotecina corrobora, portanto, com a hipótese de interação CPT-CPT discutida para os resultados observados na espectroscopia UV-Vis do GO+CPT e GO-NSM₁₀+CPT.

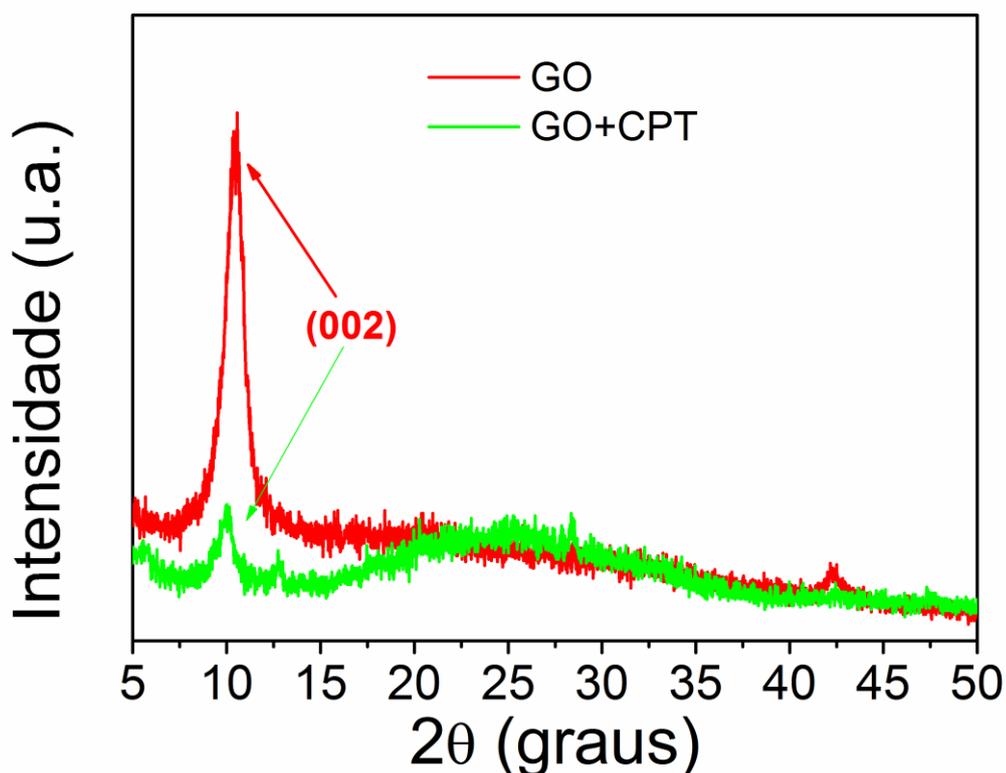


Figura 35 Difratogramas de raios X do óxido de grafeno isento (GO) e contendo a camptotecina (GO+CPT).

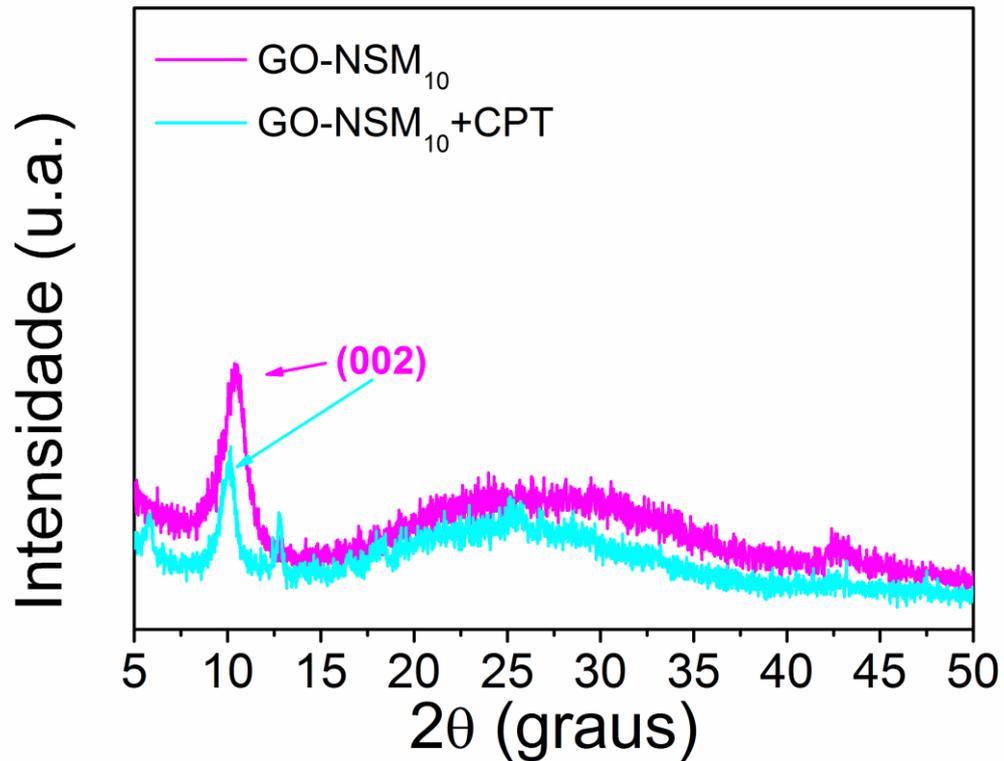


Figura 36 Difratoogramas de raios X do óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica isento (GO-NSM₁₀) e contendo a camptotecina (GO-NSM₁₀+CPT).

Os fenômenos de esfoliação durante a adição da sílica no GO e da camptotecina adicionada no óxido de grafeno e no nanocompósito observados através da difratometria de raios X são apresentados de maneira esquemática na Figura 37.

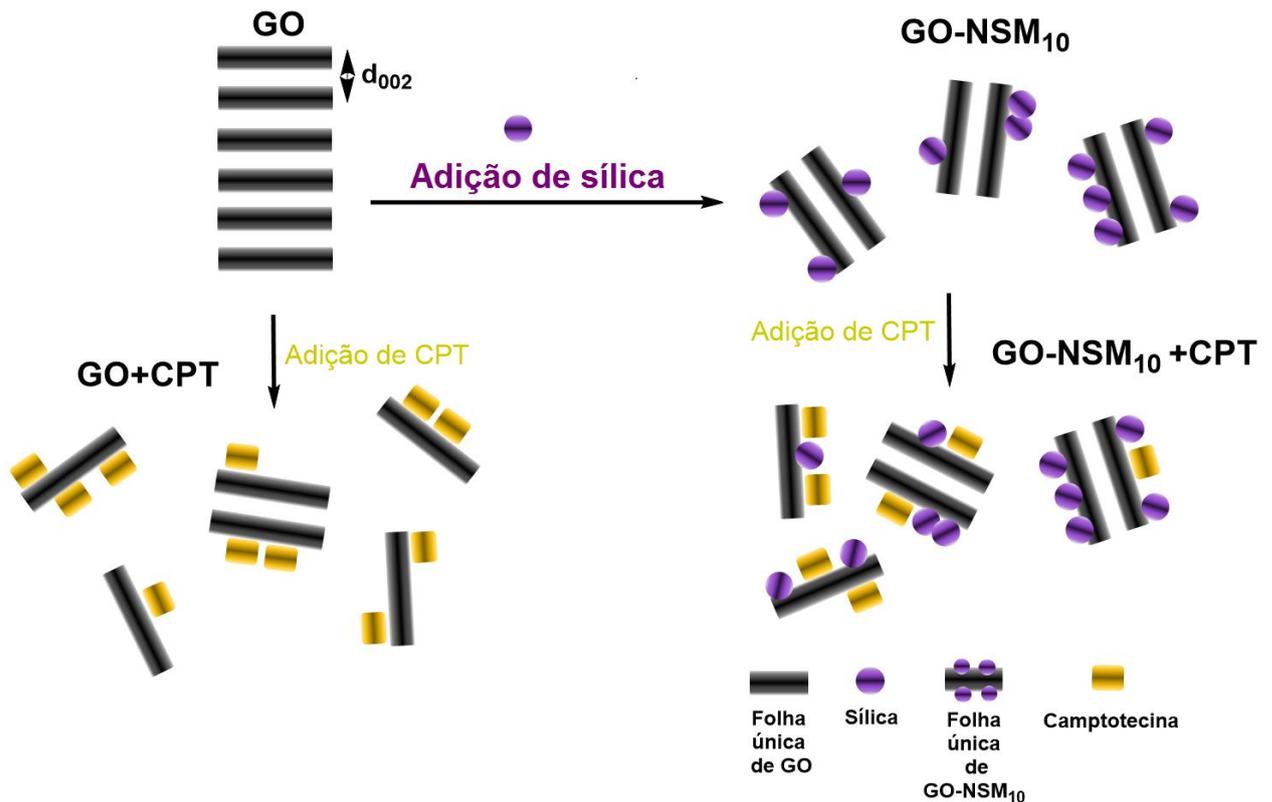


Figura 37 Efeitos estruturais resultantes da adição de camptotecina (CPT) e funcionalização de NSMs no GO e GO-NSM₁₀.

As Figuras 38-40 mostram os resultados de microscopia eletrônica de transmissão (MET) dos nanomateriais NSMs, GO e GO-NSM₁₀ na presença de camptotecina. As nanopartículas de sílica (Figura 38) mantiveram a morfologia esférica irregular compreendendo estrutura porosa e fractais após a adição de camptotecina, mantendo os aspectos morfológicos e estruturais do material de partida utilizado (NSM) e mostrado na imagem MET da Figura 8. Não foi possível visualizar a camptotecina possivelmente devido ao seu reduzido teor ($8,1 \pm 0,4\%$) nas nanopartículas e pelo fato de estar localizadas no interior poroso. A Figura 39 mostra o sistema GO+CPT indicando as folhas de óxido de grafeno através de setas vermelhas e a inesperada formação de cristais de camptotecina indicados pelas setas azuis. A imagem revela folhas de GO compreendendo dimensões micrométricas e lisas, mantendo-se a integridade estrutural do material de partida utilizado (GO). Adicionalmente, os cristais de CPT revelam morfologia semelhante a agulhas de comprimentos micrométricos. A Figura 40 exibe a imagem MET do sistema GO-NSM₁₀+CPT, revelando folhas de óxido de grafeno no domínio micrométrico decorada com nanopartículas de sílica indicadas pelas setas

vermelhas, mantendo-se a integridade estrutural do material de partida utilizado (GO-NSM₁₀). A imagem mostra cristais de camptotecina em forma de agulha que apresentam dimensões semelhantes aos cristais do sistema GO+CPT, complementam a hipótese da interação intermolecular CPT-CPT discutida anteriormente e confirma a hipótese preliminar de cristalização desse fármaco sugerida no difratograma de raios X das figuras 35 e 36.

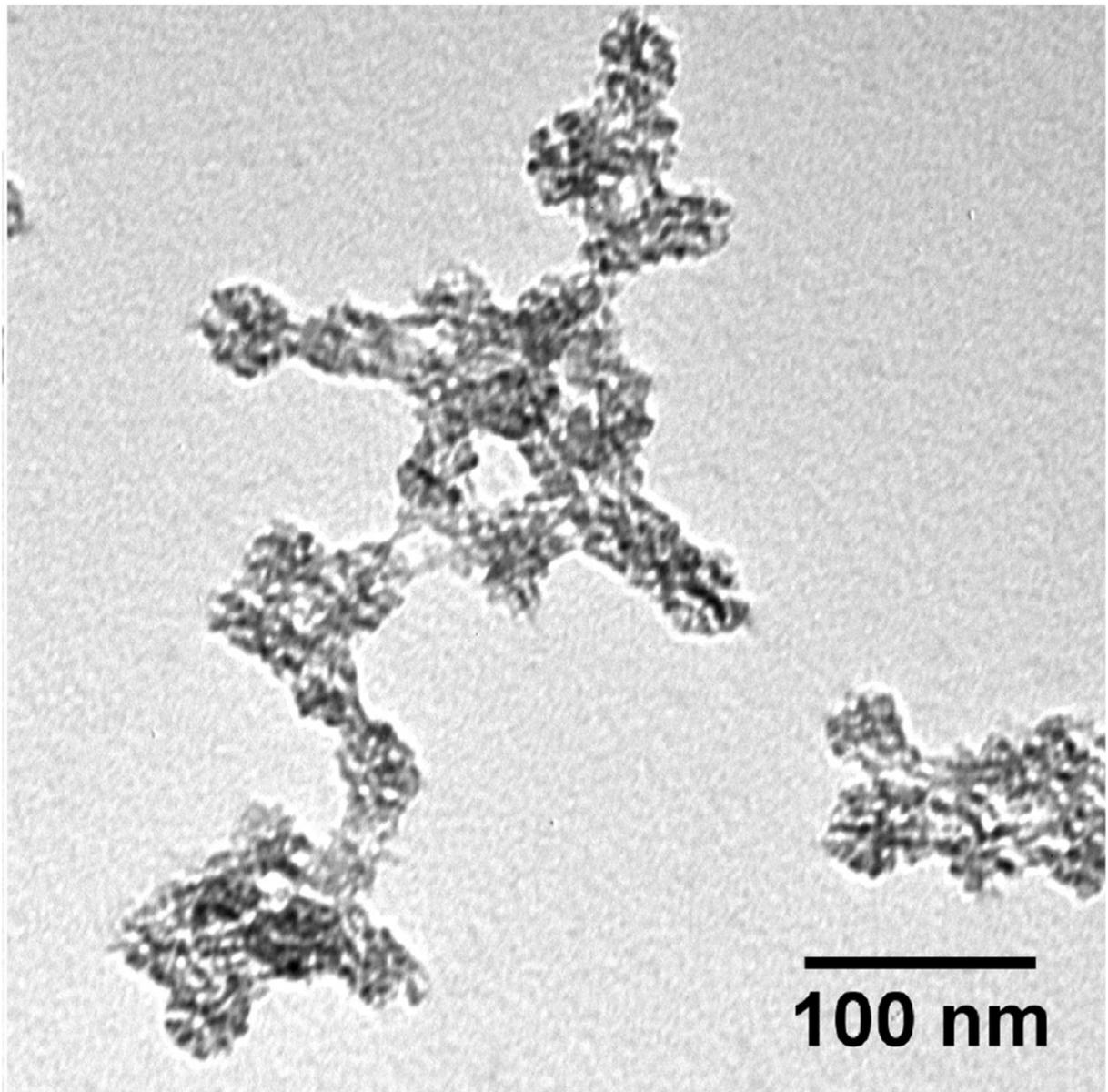


Figura 38 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas de sílica encapsuladas com camptotecina (NSM+CPT).

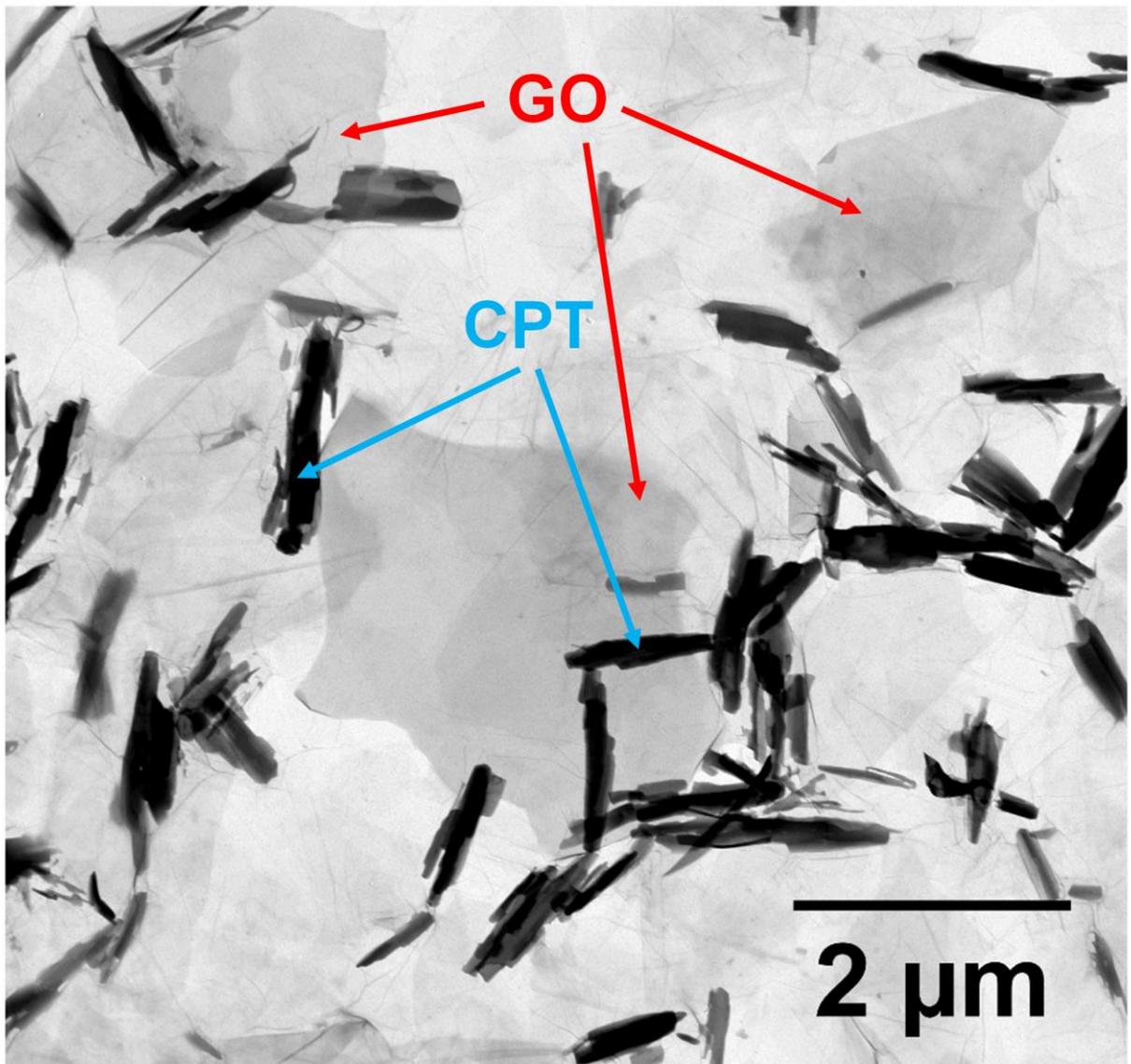


Figura 39 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do óxido de grafeno contendo camptotecina adsorvida (GO+CPT).

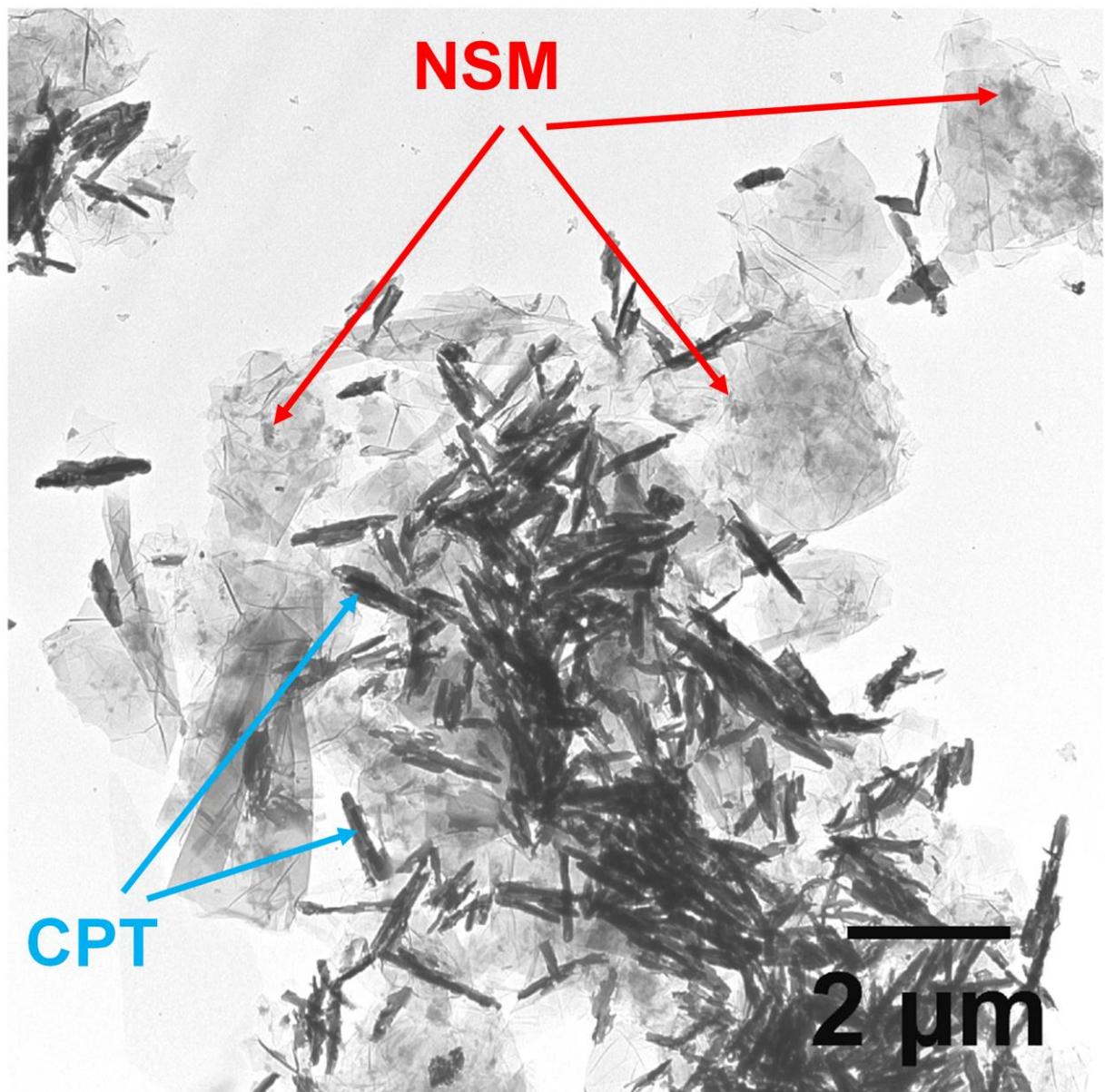


Figura 40 Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica mesoporosa contendo camptotecina adsorvida (GO-NSM₁₀+CPT).

Os métodos de encapsulamento/adsorção adaptados para cada nanomaterial mostram-se eficientes e são validados pelo sucesso nos resultados de caracterização. A próxima etapa é a avaliação da propriedade de entrega de fármacos pelos referidos nanocarreadores discutido no próximo tópico.

4.6. Estudos de liberação de camptotecina nos nanomateriais NSM+CPT, GO+CPT e GO-NSM₁₀+CPT

Os resultados dos ensaios de liberação prolongada são apresentados na Figura 41. As nanopartículas de sílica revelam rápida liberação de 70% do fármaco encapsulado nas primeiras 12 horas de experimento. Em contrapartida, os nanomateriais de óxido de grafeno e o nanocompósito mostraram perfil de liberação prolongada de até 78% de camptotecina no período de 192 horas. Verifica-se através de tais resultados a fraca interação da CPT pelas nanopartículas de sílica e a forte adsorção dessa molécula na superfície dos outros dois nanomateriais estudados, corroborando com a baixa capacidade de encapsulamento revelada pelas primeiras ($8,1 \pm 0,4\%$) e com o elevado teor de molécula antitumoral exibido pelo GO+CPT ($81,1 \pm 3,7\%$) e GO-NSM₁₀+CPT ($80,9 \pm 0,9\%$).

De fato, a distribuição espacial dos grupos fenil limitada pela restrição estrutural dos poros da sílica podem influenciar na baixa interação por empilhamento π - π entre a CPT e os grupos aromáticos desse nanocarreador. Nos sistemas GO e GO-NSM₁₀ as folhas dispõem de maior área de contato caracterizada por inúmeros anéis aromáticos conjugados eletronicamente, o que favorece uma interação π - π mais efetiva na adsorção da camptotecina. O gráfico apresentado na Figura 41 revela liberação mais rápida de camptotecina em pH 7,4 para todos os nanocarreadores, sendo essa característica mais discreta e quase imperceptível pela sílica e significativamente mais pronunciada pelo óxido de grafeno e o nanocompósito. Nessas condições, o anel lactona da camptotecina (CPT-lac) é hidrolisado a carboxilato (CPT-carb⁻)^{13,16-18}, uma espécie mais hidrofílica e, portanto, mais solúvel no meio de liberação (hidrofílico), acelerando o processo de liberação. Adicionalmente, a interação por empilhamento π - π é amenizada devido à quebra do anel lactona, o que também contribui para a mais rápida liberação em pH 7,4. A acidificação do ambiente para pH 5,0, por consequência, transforma o carboxilato da CPT-carb⁻ no anel lactona gerando a espécie CPT-lac mais hidrofóbica, favorecendo sua maior interação com os nanomateriais (detentores de regiões hidrofóbicas) em relação ao meio externo (hidrofílico). Nessa situação a velocidade de liberação é menor e mais prolongada devido à maior interação fármaco-nanocarreador. Do ponto de vista biológico, a camptotecina é inativa durante a circulação intravenosa devido à formação do grupo carboxilato pelo pH neutro do sangue^{13,16-18}. No pH

ácido dos endossomas das células cancerígenas o anel lactona da CPT é formado, transformando-a em uma molécula biologicamente ativa no processo de combate aos referidos sistemas celulares. Assim, a rápida liberação de fármaco em pH 7,4 por um nanocarreador não é desejável pois pode ocorrer anteriormente ao alcance da célula alvo. Logo, os sistemas GO+CPT e GO-NSM₁₀+CPT são promissores frente às nanopartículas de sílica em virtude de sua liberação prolongada durante 192 horas, podendo alcançar as células carregando quantidades significativas dessa substância. Sob o ponto de vista cinético, as condições de entrega vagarosa ou inexistente de fármaco em pH 7 (durante a circulação sistêmica) e mais rápido e completo em pH 5,0 (no interior dos endossomas) são ideais. Devido às características físico-químicas da camptotecina e dos fluidos biológicos as condições neutra e ácida mostram, em todos as situações observadas, velocidades de liberação mais rápida e mais vagarosa, respectivamente, o contrário das condições ideais. Nesse contexto, a otimização dos nanocarreadores no sentido de desacelerar a velocidade de entrega em pH 7,4 e acelerar sua liberação em pH 5,0 (de maneira prolongada) caracterizam um dos objetivos alcançados nesse trabalho. A análise comparativa dos nanocarreadores GO+CPT e GO-NSM₁₀+CPT no gráfico da Figura 41 permite observar a desaceleração e aceleração nas taxas de entrega de camptotecina em pH 7,4 e 5,0, respectivamente, pelo nanocompósito em relação ao óxido de grafeno. Esse resultado mostra, portanto, um diferencial daquele primeiro comparado com este último, dada a necessidade de otimização cinética mencionada. Os resultados sugerem, ainda, a interação mais forte da camptotecina com o GO-NSM₁₀ em comparação com o GO em pH 7,4 (velocidade de liberação mais vagarosa pelo nanocompósito) e interações mais fracas da CPT com o GO-NSM₁₀ em relação ao GO nas condições ácidas (velocidade de liberação mais rápida pelo nanocompósito). Assim, embora a sílica apresente perfil de liberação prematuro, sua presença foi importante do ponto de vista de modulação cinética do sistema, caracterizando o diferencial do nanocompósito em relação aos nanocarreadores restantes. O sistema GO-NSM₁₀+CPT, nesse contexto, apresenta-se como potencial candidato nos processos de *drug delivery*. Do ponto de vista físico-químico as hipóteses relacionadas à modulação cinética observada são debatidas a seguir.

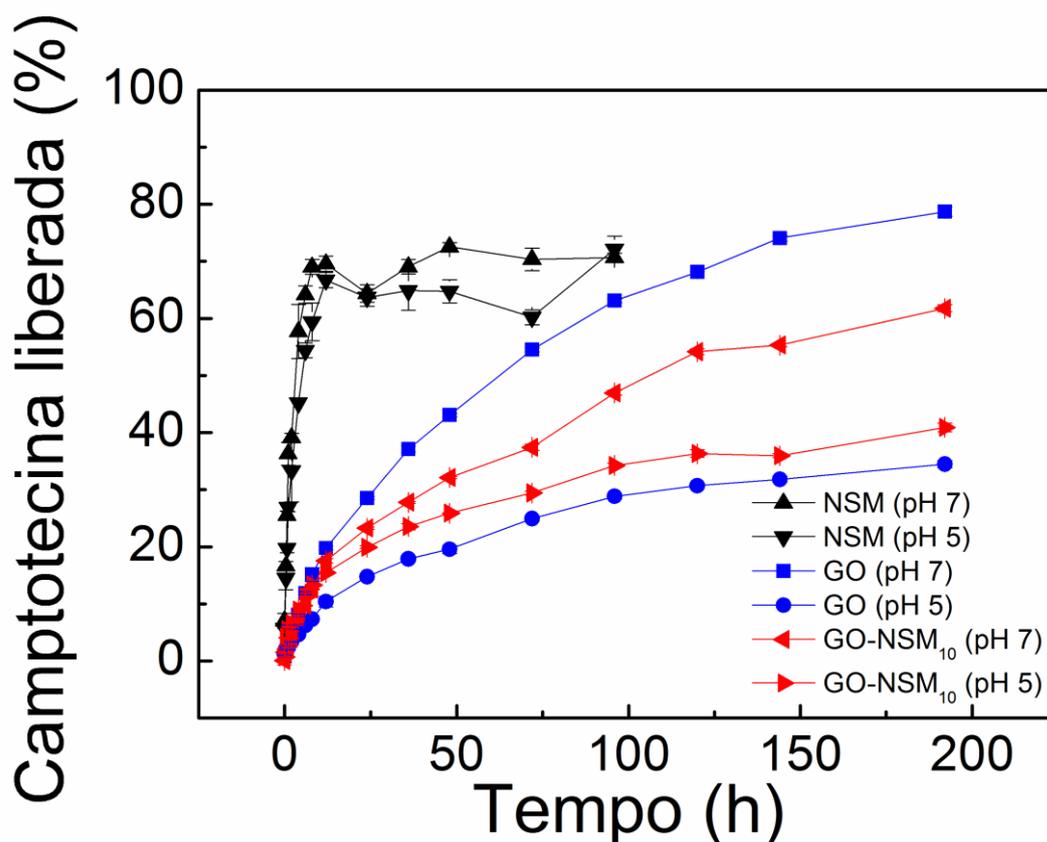


Figura 41 Gráfico de liberação de camptotecina em função do tempo pelas nanopartículas de sílica (NSMs), óxido de grafeno (GO) e nanocompósito (GO-NSM₁₀) em pH 7,4 e 5,0.

O perfil de liberação prematuro de camptotecina das nanopartículas de sílica possui origens na fraca interação que esse fármaco tem com os grupos fenil presentes no interior dos poros (ver Figura 42 (A)), caracterizando a baixa capacidade de encapsulamento desse nanomaterial comparado com os restantes.

No óxido de grafeno a interação fármaco-nanocarreador apresentou diferenças significativas nas taxas de liberação nas duas condições estudadas. Em pH 7,4 no qual predomina-se a CPT-carb⁻ no equilíbrio químico, temos as seguintes interações intermoleculares que explicam a maior velocidade de liberação observada: interações de dispersão de London com pouca interferência na atração da molécula para a superfície do óxido de grafeno, visto que nesse contexto a característica mais hidrofílica dessa molécula predomina e detém forte influência do meio externo altamente hidrofílico, prevalecendo as interações do tipo dipolo-dipolo frente às referidas interações dipolo induzido-dipolo induzido. Adicionalmente, a

presença de cargas negativas oriundas dos grupos O^- e COO^- na superfície do óxido de grafeno interfere eletrostaticamente na repulsão das moléculas $CPT-carb^-$ também negativas, contribuindo para sua rápida liberação nessa situação. Considerando-se como sistema o interior da membrana de diálise contendo o $GO \leftrightarrow (CPT-lac = CPT-carb^-)$ - onde "=" caracteriza o equilíbrio químico e " \leftrightarrow " simboliza as interações intermoleculares entre o nanocarreador e a molécula em equilíbrio químico dinâmico sobre sua superfície - e como vizinhança o meio de liberação, à medida que $CPT-carb^-$ é eliminada para as vizinhanças, o equilíbrio desloca-se no sentido da formação de mais $CPT-carb^-$ seguindo a lei de perturbação do equilíbrio químico de Le Chatelier, repetindo-se o ciclo de liberação e caracterizando uma rápida liberação para as vizinhanças. Por conseguinte, a funcionalização do óxido de grafeno com nanopartículas de sílica formando-se um nanocompósito de maior caráter hidrofílico (devido à presença da sílica com superfície externa hidrofílica) é um dos pontos cruciais para a compreensão das diferentes velocidades de liberação em pH 7,4 quando comparamos o $GO-NSM_{10}+CPT$ e $GO+CPT$. No contexto de comparação entre ambos os nanomateriais, algumas forças passam a agir mais fortemente em relação a outras como veremos a seguir. Devido ao seu caráter mais hidrofílico em relação ao GO, o nanocompósito apresenta regiões hidrofóbicas menos pronunciadas nas folhas de óxido de grafeno. Em pH 7,4 a espécie predominante $CPT-carb^-$ (mais hidrofílica) passa a interagir mais fortemente com o nanocompósito (mais hidrofílico em relação GO), predominando-se nesse caso as interações do tipo dipolo-dipolo frente às interações de dispersões de London, caracterizando uma força que contribui para a atração da $CPT-carb^-$ no nanocompósito no novo sistema adotado $GO-NSM_{10} \leftrightarrow (CPT-lac = CPT-carb^-)$. Nessa situação há, ainda, a competição com a vizinhança também hidrofílica e, dessa maneira, as forças dipolo-dipolo atuam em sentidos opostos: na atração da molécula para dentro do sistema na direção do nanocarreador e na liberação desta para a vizinhança na direção do fluido hidrofílico. Interessantemente outra força atrativa adicional atuando sobre a $CPT-carb^-$ na direção da superfície do $GO-NSM_{10}$ ocorre: são as novas atrações eletrostáticas entre os grupos NH_3^+ da sílica e os grupos negativamente carregados na camptotecina carboxilato (forças inexistentes no GO e presentes no $GO-NSM_{10}$). Consequentemente, a velocidade de liberação da molécula antitumoral mais fortemente retida no $GO-NSM_{10}$ em pH neutro é menor em relação ao GO. Ainda, a

velocidade de formação da CPT-carb⁻ no equilíbrio (CPT-lac = CPT-carb⁻) é menor no nanocompósito, pois menor quantidade de moléculas camptotecina carboxilato são "consumidas" pelo meio de liberação.

Na redução de pH para 5,0 as espécies CPT-lac (hidrofóbicas) são predominantes no equilíbrio químico e passam a interagir mais fortemente com as regiões hidrofóbicas do GO, prevalecendo nesse caso as interações de dispersão de London frente às interações dipolo-dipolo com o meio externo hidrofílico. Conseqüentemente, a liberação de fármaco do sistema para as vizinhanças é significativamente mais vagarosa e a velocidade de formação de CPT-lac a partir de CPT-carb⁻ para restabelecimento do equilíbrio acontece em velocidade significativamente reduzida. Por essa razão as velocidades de liberação em pH 5,0 são significativamente menores em relação ao pH 7,0 quando estudamos isoladamente o GO+CPT e GO-NSM₁₀+CPT. Essa situação é esquematicamente apresentada na Figura 42 (B). Sendo o nanocompósito mais hidrofílico em comparação ao GO, as interações do tipo dipolo induzido - dipolo induzido (dispersões de London) entre a CPT-lac e GO-NSM₁₀ são menos pronunciadas em relação ao GO, de modo que sua interação com a nanoestrutura é mais fraca e, conseqüentemente, a liberação para o meio externo é mais rápida em pH 5,0 comparada com aquela observada no GO+CPT. Esse fenômeno é didaticamente ilustrado na Figura 42 (C).

A discussão acima mostra claramente o diferencial do nanocompósito à base de óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica como nanocarreador detendo características de entrega de fármaco otimizadas em relação aos materiais de NSM e GO isoladamente. Essas propriedades pavimentam o caminho da aplicação de nanocarreadores à base de GO-NSMs no tratamento antitumoral.

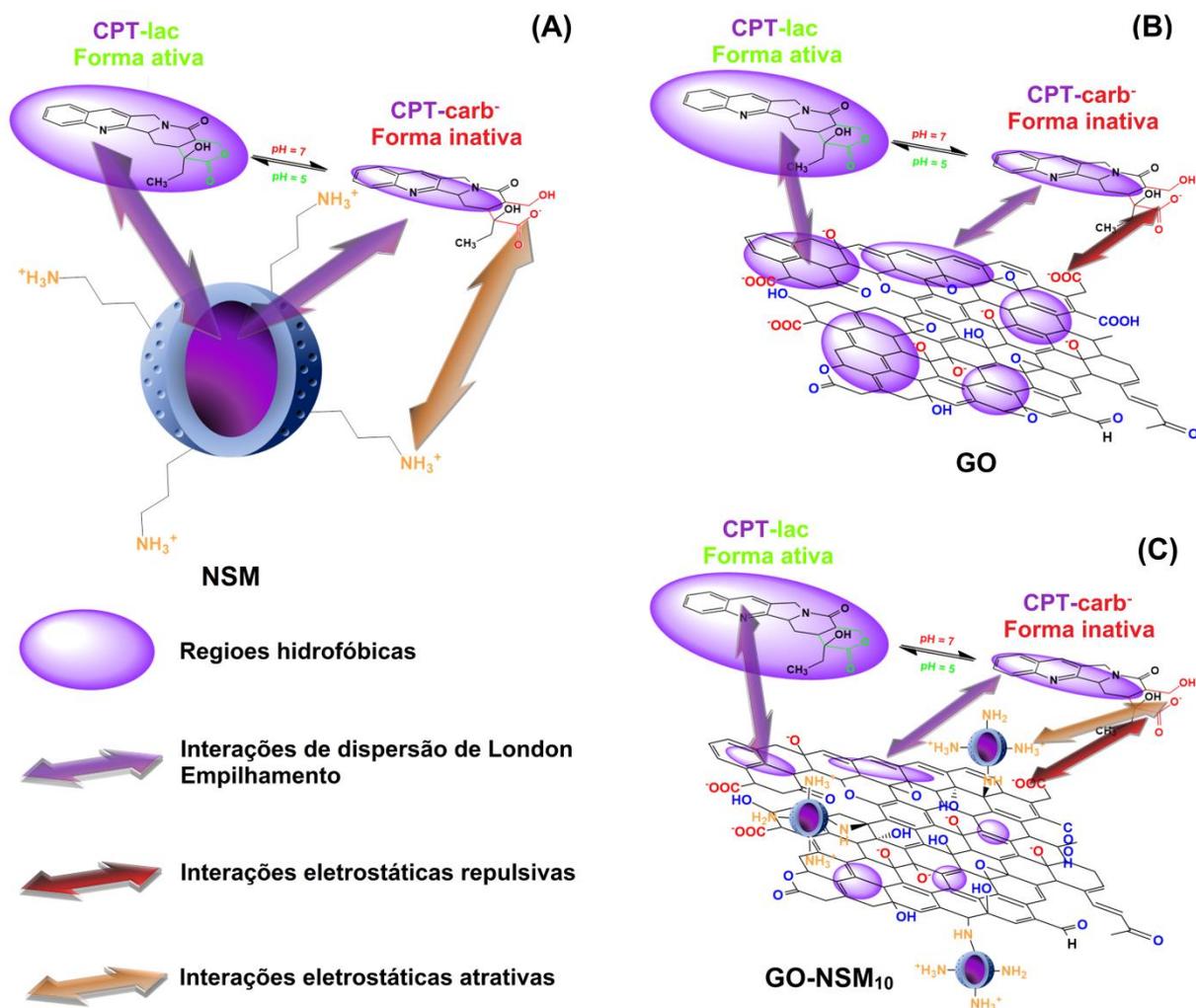


Figura 42 Influência do pH na perturbação do equilíbrio químico entre as espécies camptotecina lactona (CPT-lac) e camptotecina carboxilato (CPT-carb⁻) em dinâmicas interações intermoleculares com as nanopartículas de sílica (NSMs) (A), óxido de grafeno (GO) (B) e nanocompósito de óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica (GO-NSM₁₀) (C).

Foi realizado um estudo de avaliação da estrutura molecular da camptotecina nos estudos de liberação através da espectroscopia eletrônica ultravioleta visível. Para isso, os espectros da camptotecina livre nos meios de liberação em pH 5,0 e 7,4 (após liberação pelo nanomaterial) durante o tempo de 192 horas, foram adquiridos e avaliados. As Figuras 43-45 mostram os espectros da camptotecina liberada em pH 7,4 pelo GO (Figura 43), GO-NSM₁₀ (Figura 44) e NSM (Figura 45). Nas três figuras é notório o aumento da absorvância de uma banda larga em aproximadamente 365 nm, referente às transições eletrônicas n-π* da camptotecina.

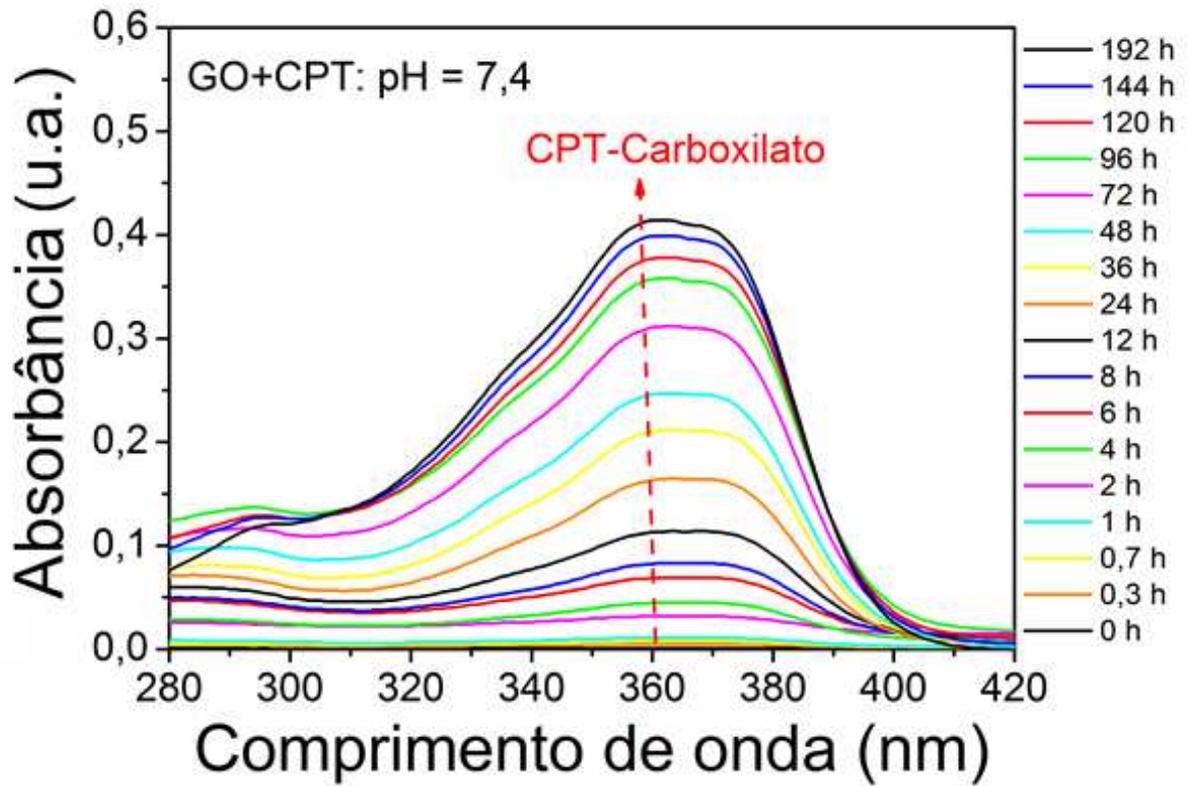


Figura 43 Influência do pH 7,4 na estrutura química da camptotecina liberada pelo óxido de grafeno (GO).

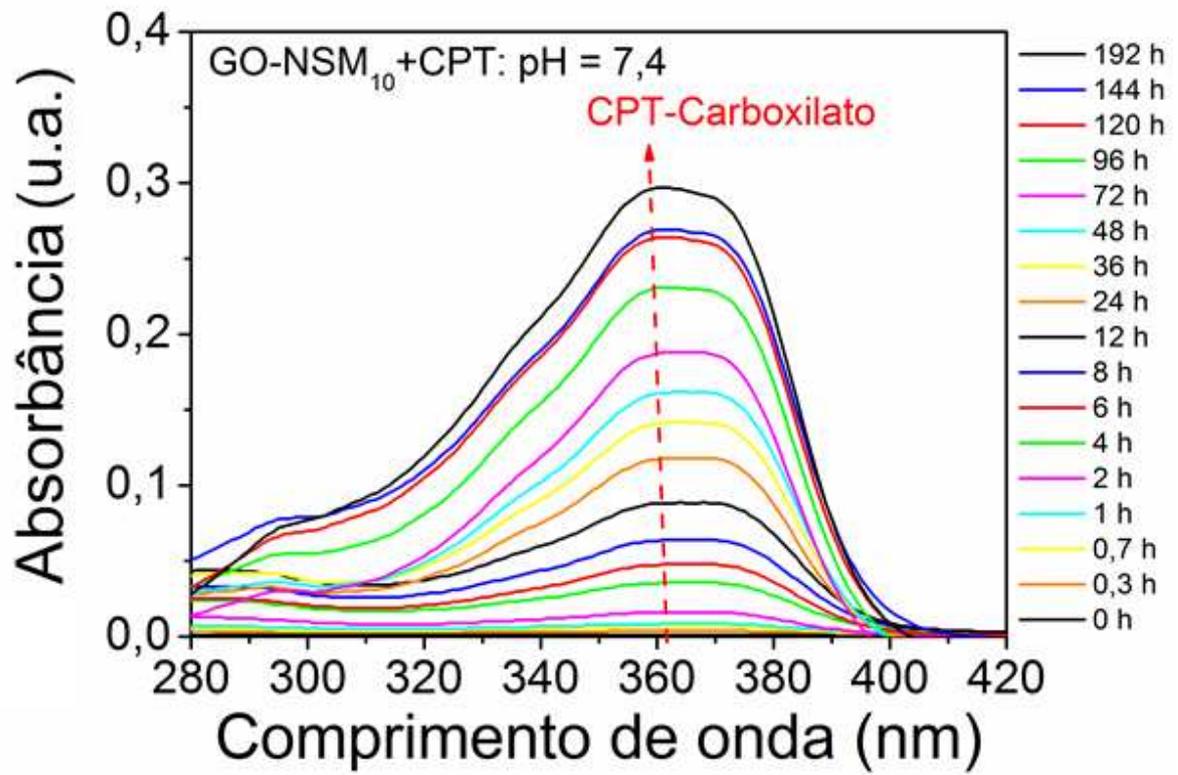


Figura 44 Influência do pH 7,4 na estrutura química da camptotecina liberada pelo óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica (GO-NSM₁₀).

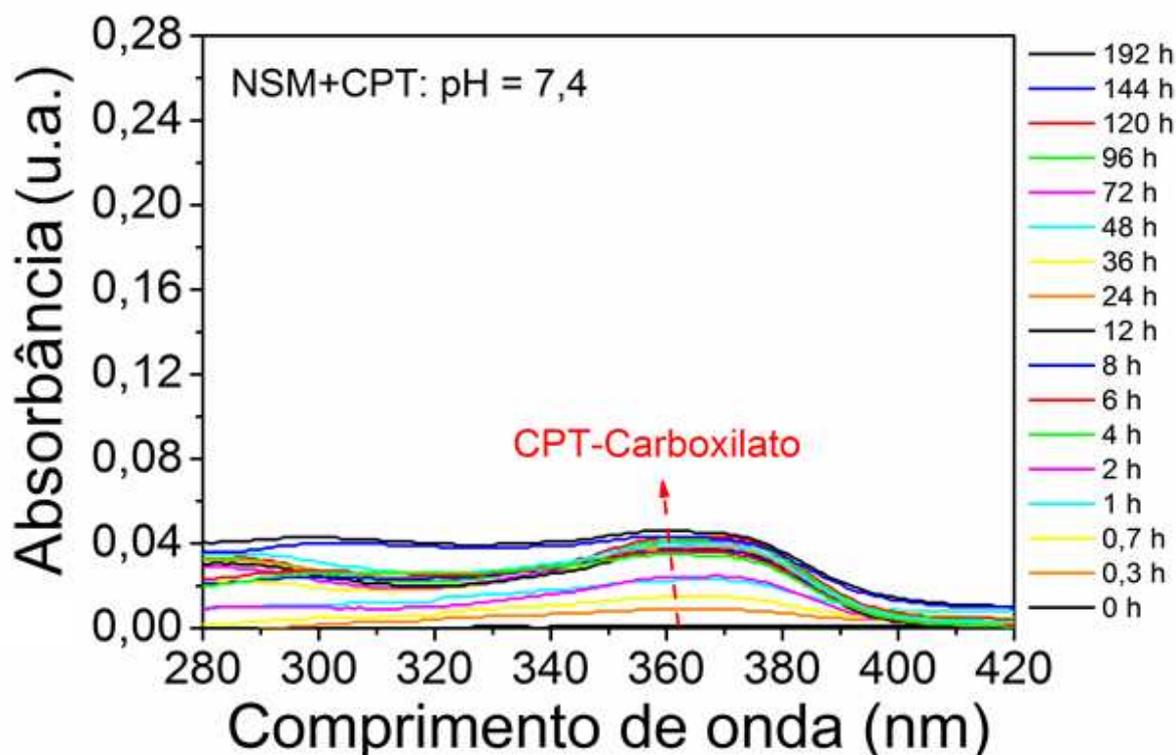


Figura 45 Influência do pH 7,4 na estrutura química da camptotecina liberada pelas nanopartículas de sílica (NSM).

Nos espectros da CPT liberada dos nanomateriais em pH 5,0 (Figuras 46-48), dois ombros em aproximadamente 355 e 370 nm são nitidamente visíveis nos espectros do GO+CPT (Figura 46), GO-NSM₁₀+CPT (Figura 47) e NSM+CPT (Figura 48) em todos os tempos de liberação, também relacionados às transições eletrônicas $n-\pi^*$. Essas últimas, no entanto, ocorrem em uma molécula de camptotecina adotando uma estrutura molecular ligeiramente diferente daquela em pH 7,4. Mais especificamente, os ombros observados são referentes a transições eletrônicas ocorrendo na molécula antitumoral detendo a função orgânica lactona. Após a hidrólise dessa função, gerando a espécie carboxilato, os referidos ombros não são observados e, como resultado, temos aquela banda larga em 365 nm mencionada. Dessa maneira, o presente estudo corrobora com as discussões referentes aos estudos de liberação de CPT e apresenta concordância com os dados da literatura.

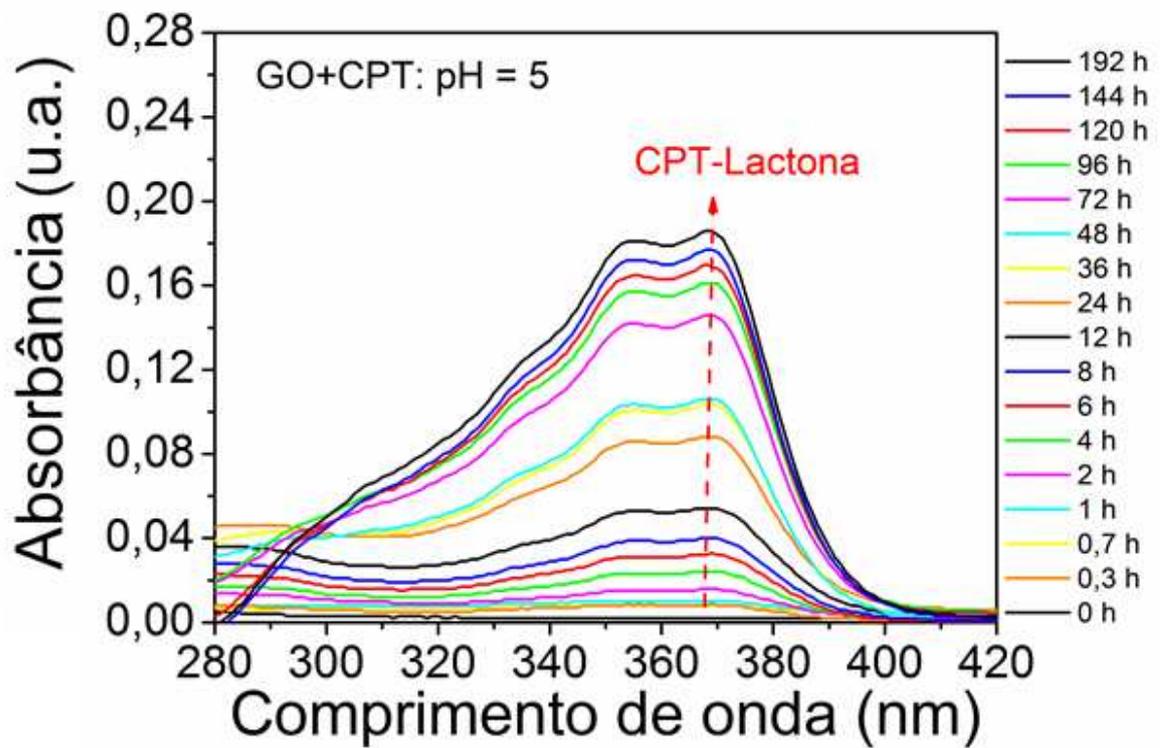


Figura 46 Influência do pH 5,0 na estrutura química da camptotecina liberada pelo óxido de grafeno (GO).

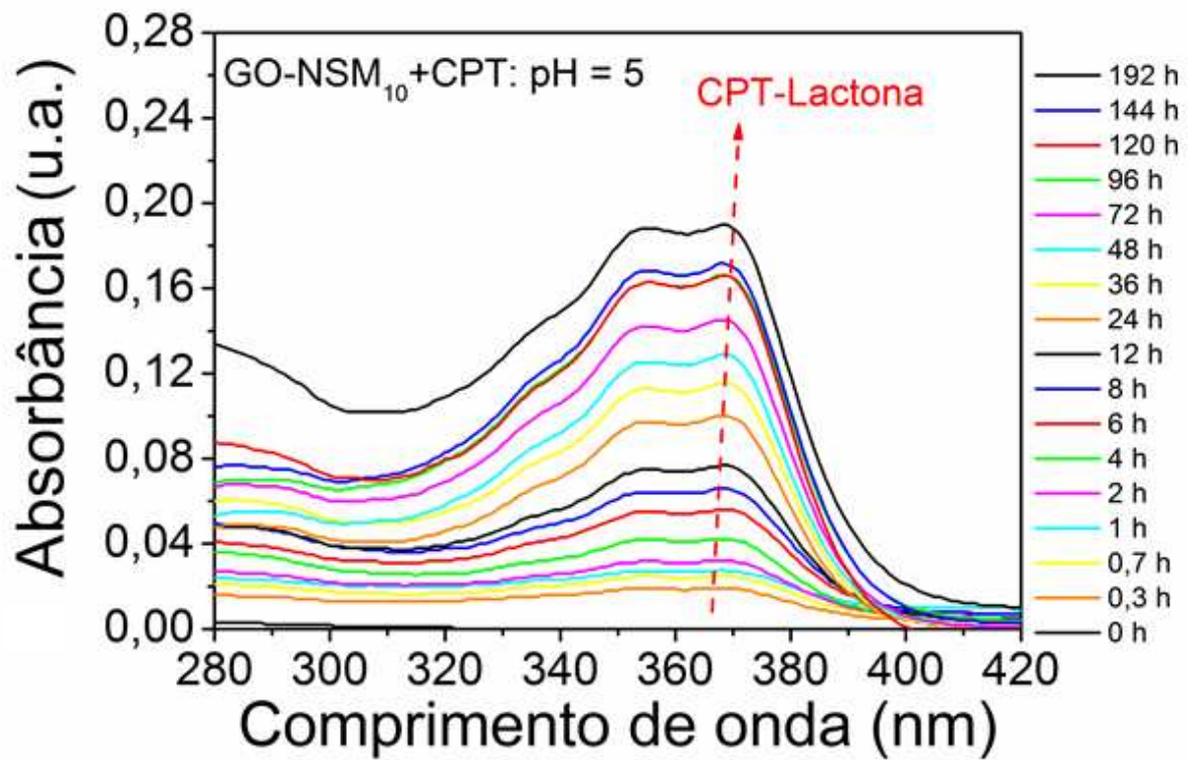


Figura 47 Influência do pH 5,0 na estrutura química da camptotecina liberada pelo óxido de grafeno decorado com nanopartículas de sílica (GO-NSM₁₀).

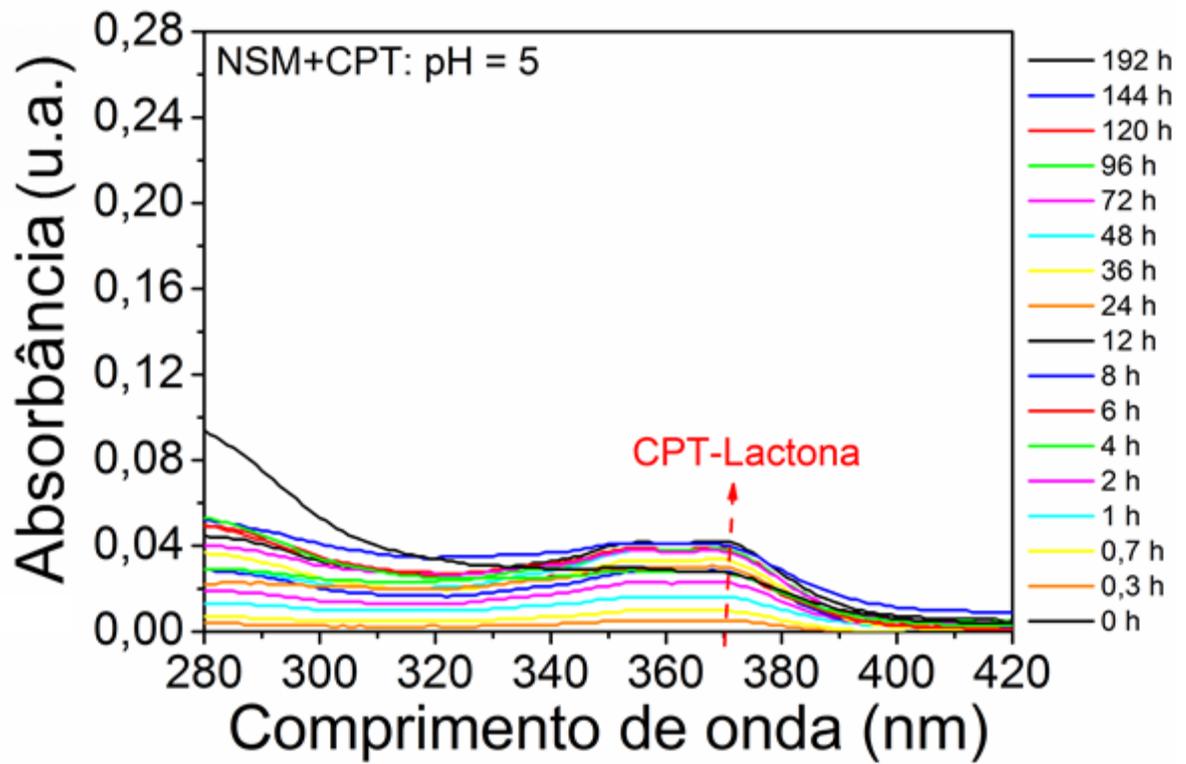


Figura 48 Influência do pH 5,0 na estrutura química da camptotecina liberada pelas nanopartículas de sílica (NSM).

5. CONCLUSÃO

O conjunto de técnicas de caracterizações físico-químicas como o UV-Vis, RMN, DRX, TG/DTG, PZ, ASAP, MET, e MFA comprova a obtenção do óxido de grafeno (GO), das nanopartículas de sílica (NSMs) e dos nanocompósitos de óxido de grafeno decorados com nanopartículas de sílica (GO-NSMs). De acordo com as curvas termogravimétricas, partindo-se da adição de 10, 30 e 50% de sílica (m/m) no óxido de grafeno para formação dos nanocompósitos GO-NSM₁₀, GO-NSM₃₀ e GO-NSM₅₀, respectivamente, a quantidade de sílica que efetivamente encontra-se funcionalizada nesses nanomateriais é de 4, 13 e 18% (m/m), nessa ordem. A ressonância magnética nuclear (RMN) sugere a formação de ligação covalente das nanopartículas de sílica no GO através de formação de ligação amina secundária e mostra um fenômeno inesperado de redução de grupos oxigenados no GO. O fenômeno descrito mostrou ser predominante no nanocompósito GO-NSM₅₀ por questões hipoteticamente relacionadas à saturação de superfície e/ou efeito de redução de grupos oxigenados pelos grupos amino da sílica através de mecanismos de reação semelhantes ao que ocorre nos processos de síntese de óxido de grafeno reduzido utilizando-se hidrazina. Embora pouco frequente, a redução do óxido de grafeno pela sílica ocorre também nos materiais GO-NSM₁₀ e GO-NSM₃₀.

Os estudos biológicos de interação com hemácias mostraram que os materiais GO-NSMs apresentam teores de hemólise no mínimo duas vezes menor e no máximo 8 vezes menor comparado com o óxido de grafeno, na faixa de concentração entre 0 e 250 µg/mL de material que interage. De maneira complementar, os estudos de efeito corona mostram expressiva redução de interação de proteínas do plasma humano com os nanocompósitos, possibilitando minimizar a interação com proteínas específicas do sistema imunológico atuantes no processo de remoção de corpos estranhos.

O conjunto de técnicas de caracterização compreendo as espectroscopias UV-Vis, difratometria de raios X e microscopia eletrônica de transmissão comprova o encapsulamento/adsorção de camptotecina nas NSMs, GO e GO-NSMs. Um inesperado fenômeno de interação camptotecina-camptotecina na superfície do GO e GO-NSM₁₀ foi identificado e discutido em termos de forças intermoleculares incluindo as ligações de hidrogênio e interações de empilhamento π - π formando-se uma camada de camptotecina que interage com a nanoestrutura em uma interface e

com outras multicamadas de camptotecina na interface oposta. Os estudos de liberação prolongada de fármaco em conjunto com os resultados de caracterização mostraram rápida liberação de camptotecina pelas nanopartículas de sílica (12h) e prolongada eliminação pelos materiais GO e GO-NSM₁₀ (192h). A molécula antitumoral detém maior interação química por esses dois últimos materiais e a presença de nanopartículas de sílica sobre a superfície do óxido de grafeno mostrou importância estratégica na modulação e otimização das velocidades de liberação em pH 7,4 (em alusão às condições fisiológicas dos organismos vivos) e pH 5,0 (atrelado às condições dos endossomas de células cancerígenas), inserindo o nanocompósito GO-NSM₁₀ como potencial candidato às aplicações antitumorais em menor risco no contexto de nanosegurança.

Dessa maneira, os nanocompósitos sintetizados, em especial o GO-NSM₁₀, caracterizam-se como potenciais nanocarreadores de fármacos e abre perspectivas como: novos estudos fenomenológicos com outros sistemas biológicos (macrófagos por exemplo); possibilidade de otimização topográfica mediante funcionalização com moléculas específicas para sua internalização seletiva em células antitumorais; estudos de interação com sistemas biológicos mediante modelagem computacional e molecular para maior compreensão das forças envolvidas nesse processo; novas possibilidades de exploração de aplicações no ramo de catálise, remediação ambiental e novos estudos de interação com insetos em processos de controle de pragas em produtos agrícolas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2017**, *67*, 7.
- (2) Miller, K. D.; Siegel, R. L.; Lin, C. C.; Mariotto, A. B.; Kramer, J. L.; Rowland, J. H.; Stein, K. D.; Alteri, R.; Jemal, A. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **2016**, *66*, 271.
- (3) Fan, L.; Zhang, Y.; Wang, F.; Yang, Q.; Tan, J.; Grifantini, R.; Wu, H.; Song, C.; Jin, B. *Biomaterials* **2016**, *76*, 399.
- (4) Hu, Q.; Sun, W.; Wang, C.; Gu, Z. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2016**, *98*, 19.
- (5) Zhang, X.; Ge, J.; Xue, Y.; Lei, B.; Yan, D.; Li, N.; Liu, Z.; Du, Y.; Cai, R. *Chemistry – A European Journal* **2015**, *21*, 11954.
- (6) Allen, T. M.; Cullis, P. R. *Science* **2004**, *303*, 1818.
- (7) Fonseca, L. C.; de Paula, A. J.; Martinez, D. S. T.; Alves, O. L. *New Journal of Chemistry* **2016**, *40*, 8060.
- (8) Qing-Yong, L.; Yuan-Gang, Z.; Rong-Zhen, S.; Li-Ping, Y. *Current Medicinal Chemistry* **2006**, *13*, 2021.
- (9) Jedrzejczak-Silicka, M.; Urbas, K.; Mijowska, E.; Rakoczy, R. *Journal of Alloys and Compounds* **2017**, *709*, 112.
- (10) Liu, L. F.; Desai, S. D.; Li, T.-K.; Mao, Y.; Sun, M. E. I.; Sim, S.-P. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2000**, *922*, 1.
- (11) Venditto, V. J.; Simanek, E. E. *Molecular pharmaceuticals* **2010**, *7*, 307.
- (12) Yu, S.; Huang, Q.-Q.; Luo, Y.; Lu, W. *The Journal of Organic Chemistry* **2012**, *77*, 713.
- (13) Thakral, N. K.; Ray, A. R.; Bar-Shalom, D.; Eriksson, A. H.; Majumdar, D. K. *AAPS PharmSciTech* **2012**, *13*, 59.
- (14) Herben, V. M. M.; Beijnen, J. H.; ten Bokkel Huinink, W. W.; Schellens, J. H. M. *Pharmacy World and Science* **1998**, *20*, 161.
- (15) Mathijssen, R. H. J.; van Alphen, R. J.; Verweij, J.; Loos, W. J.; Nooter, K.; Stoter, G.; Sparreboom, A. *Clinical Cancer Research* **2001**, *7*, 2182.
- (16) Cheng, J.; Khin, K. T.; Davis, M. E. *Molecular pharmaceuticals* **2004**, *1*, 183.
- (17) Çirpanli, Y.; Bilensoy, E.; Lale Doğan, A.; Çaliş, S. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**, *73*, 82.

- (18) Ma, M.; Xing, P.; Xu, S.; Li, S.; Chu, X.; Hao, A. *RSC Advances* **2014**, *4*, 42372.
- (19) Gong, P.; Zhao, Q.; Dai, D.; Zhang, S.; Tian, Z.; Sun, L.; Ren, J.; Liu, Z. *Chemistry – A European Journal* **2017**, *23*, 17531.
- (20) Peng, K.; Yang, H. *Chemical Communications* **2017**, *53*, 6085.
- (21) Shi, B.; Du, X.; Chen, J.; Fu, L.; Morsch, M.; Lee, A.; Liu, Y.; Cole, N.; Chung, R. *Small* **2017**, *13*, 1603966.
- (22) Song, P.; Kuang, S.; Panwar, N.; Yang, G.; Tng, D. J. H.; Tjin, S. C.; Ng, W. J.; Majid, M. B. A.; Zhu, G.; Yong, K.-T.; Wang, Z. L. *Advanced Materials* **2017**, *29*, 1605668.
- (23) Ali, L. M. A.; Gutiérrez, M.; Cornudella, R.; Moreno, J. A.; Piñol, R.; Gabilondo, L.; Millán, A.; Palacio, F. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2013**, *9*, 1272.
- (24) Stamopoulos, D.; Gogola, V.; Manios, E.; Gourni, E.; Benaki, D.; Niarchos, D.; Pissas, M. *Current Nanoscience* **2009**, *5*, 177.
- (25) Stamopoulos, D.; Manios, E.; Gogola, V.; Benaki, D.; Bouziotis, P.; Niarchos, D.; Pissas, M. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 505101.
- (26) Owens lii, D. E.; Peppas, N. A. *International Journal of Pharmaceutics* **2006**, *307*, 93.
- (27) Venerando, R.; Miotto, G.; Magro, M.; Dallan, M.; Baratella, D.; Bonaiuto, E.; Zboril, R.; Vianello, F. *The Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117*, 20320.
- (28) Adami, R.; Reverchon, E. *Powder Technology* **2012**, *218*, 102.
- (29) Zahr, A. S.; Davis, C. A.; Pishko, M. V. *Langmuir* **2006**, *22*, 8178.
- (30) Kavitha, T.; Kang, I.-K.; Park, S.-Y. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2014**, *115*, 37.
- (31) Shan, C.; Yang, H.; Han, D.; Zhang, Q.; Ivaska, A.; Niu, L. *Langmuir* **2009**, *25*, 12030.
- (32) Yang, X.; Zhao, N.; Xu, F.-J. *Nanoscale* **2014**, *6*, 6141.
- (33) Li, Z.-Y.; Liu, Y.; Wang, X.-Q.; Liu, L.-H.; Hu, J.-J.; Luo, G.-F.; Chen, W.-H.; Rong, L.; Zhang, X.-Z. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2013**, *5*, 7995.
- (34) Ma, M.; Xu, H.; Chen, H.; Jia, X.; Zhang, K.; Wang, Q.; Zheng, S.; Wu, R.; Yao, M.; Cai, X.; Li, F.; Shi, J. *Advanced Materials* **2014**, *26*, 7378.

- (35) Paula, A. J.; Araujo Júnior, R. T.; Martinez, D. S. T.; Paredes-Gamero, E. J.; Nader, H. B.; Durán, N.; Justo, G. Z.; Alves, O. L. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2013**, *5*, 8387.
- (36) Arshad, A.; Iqbal, J.; Mansoor, Q.; Ahmed, I. *Journal of Applied Physics* **2017**, *121*, 244901.
- (37) Zhang, Z.; Shi, J.; Song, Z.; Zhu, X.; Zhu, Y.; Cao, S. *J Mater Sci* **2018**, *53*, 1810.
- (38) Lurf, A.; He, H.; Forster, M.; Klinowski, J. *The Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102*, 4477.
- (39) Dreyer, D. R.; Todd, A. D.; Bielawski, C. W. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, 5288.
- (40) Creighton, M. A.; Rangel-Mendez, J. R.; Huang, J.; Kane, A. B.; Hurt, R. H. *Small* **2013**, *9*, 1921.
- (41) Nguyen, K. T.; Zhao, Y. *Nanoscale* **2014**, *6*, 6245.
- (42) Sreejith, S.; Ma, X.; Zhao, Y. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 17346.
- (43) Sun, X.; Liu, Z.; Welsher, K.; Robinson, J.; Goodwin, A.; Zaric, S.; Dai, H. *Nano Res.* **2008**, *1*, 203.
- (44) Sasidharan, A.; Panchakarla, L. S.; Sadanandan, A. R.; Ashokan, A.; Chandran, P.; Girish, C. M.; Menon, D.; Nair, S. V.; Rao, C. N. R.; Koyakutty, M. *Small* **2012**, *8*, 1251.
- (45) Wu, H.; Shi, H.; Wang, Y.; Jia, X.; Tang, C.; Zhang, J.; Yang, S. *Carbon* **2014**, *69*, 379.
- (46) Liao, K.-H.; Lin, Y.-S.; Macosko, C. W.; Haynes, C. L. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2011**, *3*, 2607.
- (47) Singh, S. K.; Singh, M. K.; Kulkarni, P. P.; Sonkar, V. K.; Grácio, J. J. A.; Dash, D. *ACS Nano* **2012**, *6*, 2731.
- (48) Hu, W.; Peng, C.; Lv, M.; Li, X.; Zhang, Y.; Chen, N.; Fan, C.; Huang, Q. *ACS Nano* **2011**, *5*, 3693.
- (49) Mao, H.; Chen, W.; Laurent, S.; Thirifays, C.; Burtea, C.; Rezaee, F.; Mahmoudi, M. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, *109*, 212.
- (50) Mbeh, D. A.; Akhavan, O.; Javanbakht, T.; Mahmoudi, M.; Yahia, L. H. *Applied Surface Science* **2014**, *320*, 596.

- (51) de Sousa, M.; de Luna, L. A. V.; Fonseca, L.; Giorgio, S.; Alves, O. L. *ACS Applied Nano Materials* **2018**.
- (52) Shen, J.-M.; Gao, F.-Y.; Guan, L.-P.; Su, W.; Yang, Y.-J.; Li, Q.-R.; Jin, Z.-C. *RSC Advances* **2014**, *4*, 18473.
- (53) Lai, C.-Y.; Trewyn, B. G.; Jeftinija, D. M.; Jeftinija, K.; Xu, S.; Jeftinija, S.; Lin, V. S. Y. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 4451.
- (54) Liong, M.; Lu, J.; Kovochich, M.; Xia, T.; Ruehm, S. G.; Nel, A. E.; Tamanoi, F.; Zink, J. I. *ACS Nano* **2008**, *2*, 889.
- (55) Slowing, I. I.; Vivero-Escoto, J. L.; Wu, C.-W.; Lin, V. S. Y. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, 1278.
- (56) Wu, S.-H.; Hung, Y.; Mou, C.-Y. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 9972.
- (57) Cauda, V.; Schlossbauer, A.; Kecht, J.; Zürner, A.; Bein, T. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 11361.
- (58) Ferenc, M.; Katir, N.; Milowska, K.; Bousmina, M.; Majoral, J.-P.; Bryszewska, M.; El Kadib, A. *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, *3*, 2714.
- (59) Paula, A. J.; Martinez, D. S. T.; Araujo Júnior, R. T.; Souza Filho, A. G.; Alves, O. L. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2012**, *23*, 1807.
- (60) He, Q.; Zhang, J.; Shi, J.; Zhu, Z.; Zhang, L.; Bu, W.; Guo, L.; Chen, Y. *Biomaterials* **2010**, *31*, 1085.
- (61) Sahu, S.; Sinha, N.; Bhutia, S. K.; Majhi, M.; Mohapatra, S. *Journal of Materials Chemistry B* **2014**, *2*, 3799.
- (62) Xu, Z.; Liu, S.; Kang, Y.; Wang, M. *Nanoscale* **2015**, *7*, 5859.
- (63) Yan, Y.; Fu, J.; Wang, T.; Lu, X. *Acta Biomaterialia* **2017**, *51*, 471.
- (64) Huang, L.; Zhang, Y.; Liu, H.; Liu, B.; Tu, M. *New Journal of Chemistry* **2014**, *38*, 5817.
- (65) Yang, Y.; Liu, Y.; Cheng, C.; Shi, H.; Yang, H.; Yuan, H.; Ni, C. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2017**, *9*, 28195.
- (66) Kecht, J.; Schlossbauer, A.; Bein, T. *Chemistry of Materials* **2008**, *20*, 7207.
- (67) de Moraes, A. C. M.; Andrade, P. F.; de Faria, A. F.; Simões, M. B.; Salomão, F. C. C. S.; Barros, E. B.; Gonçalves, M. d. C.; Alves, O. L. *Carbohydrate Polymers* **2015**, *123*, 217.

- (68) Hummers, W. S.; Offeman, R. E. *Journal of the American Chemical Society* **1958**, *80*, 1339.
- (69) Kumeria, T.; Bariana, M.; Altalhi, T.; Kurkuri, M.; Gibson, C. T.; Yang, W.; Losic, D. *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, *1*, 6302.
- (70) Liang, X.; Wang, S.; Liu, S.; Liu, X.; Jiang, S. *Journal of Separation Science* **2012**, *35*, 2003.
- (71) Sitko, R.; Zawisza, B.; Talik, E.; Janik, P.; Osoba, G.; Feist, B.; Malicka, E. *Analytica Chimica Acta* **2014**, *834*, 22.
- (72) Speltini, A.; Sturini, M.; Maraschi, F.; Consoli, L.; Zeffiro, A.; Profumo, A. *Journal of Chromatography A* **2015**, *1379*, 9.
- (73) Yao, Y.; Miao, S.; Yu, S.; Ping Ma, L.; Sun, H.; Wang, S. *Journal of Colloid and Interface Science* **2012**, *379*, 20.
- (74) Zhang, H.; Tong, C.; Sha, J.; Liu, B.; Lü, C. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, *206*, 181.
- (75) Fonseca, L. C.; de Araújo, M. M.; de Moraes, A. C. M.; da Silva, D. S.; Ferreira, A. G.; Franqui, L. S.; Martinez, D. S. T.; Alves, O. L. *Applied Surface Science* **2018**, *437*, 110.
- (76) Martinez, D. S. T.; Paula, A. J.; Fonseca, L. C.; Luna, L. A. V.; Silveira, C. P.; Durán, N.; Alves, O. L. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2015**, *2015*, 4595.
- (77) Seaton, N. A. *Chemical Engineering Science* **1991**, *46*, 1895.
- (78) Sing, K. S. W. *Advances in Colloid and Interface Science* **1998**, *76–77*, 3.
- (79) Huang, J.; Yin, J.; Chai, W.; Liang, C.; Shen, J.; Zhang, F. *New Journal of Chemistry* **2012**, *36*, 1378.
- (80) van Blaaderen, A.; Vrij, A. *Journal of Colloid and Interface Science* **1993**, *156*, 1.
- (81) Zhou, X.; Shi, T. *Applied Surface Science* **2012**, *259*, 566.
- (82) Chen, W.; Yan, L.; Bangal, P. R. *Carbon* **2010**, *48*, 1146.
- (83) Wang, P.; Liu, Z.-G.; Chen, X.; Meng, F.-L.; Liu, J.-H.; Huang, X.-J. *Journal of Materials Chemistry A* **2013**, *1*, 9189.
- (84) Tan, L.-L.; Ong, W.-J.; Chai, S.-P.; Mohamed, A. R. *Nanoscale Research Letters* **2013**, *8*, 465.
- (85) Akhavan, O. *ACS Nano* **2010**, *4*, 4174.

- (86) Feng, K.; Tang, B.; Wu, P. *Journal of Materials Chemistry A* **2014**, *2*, 16083.
- (87) Dreyer, D. R.; Park, S.; Bielawski, C. W.; Ruoff, R. S. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 228.
- (88) Monceaux, C. J.; Carlier, P. R. *Organic Letters* **2010**, *12*, 620.
- (89) Li, Y.; Chen, H.; Voo, L. Y.; Ji, J.; Zhang, G.; Zhang, G.; Zhang, F.; Fan, X. *Journal of Materials Chemistry* **2012**, *22*, 15021.
- (90) Manfredi, A. A.; Rovere, P.; Galati, G.; Heltai, S.; Bozzolo, E.; Soldini, L.; Davoust, J.; Balestrieri, G.; Tincani, A.; Sabbadini, M. G. *Arthritis & Rheumatism* **1998**, *41*, 205.
- (91) Zhang, N.; Su, X.; Free, P.; Zhou, X.; Neoh, K. G.; Teng, J.; Knoll, W. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2013**, *183*, 310.
- (92) Jokerst, J. V.; Lobovkina, T.; Zare, R. N.; Gambhir, S. S. *Nanomedicine (London, England)* **2011**, *6*, 715.
- (93) Dey, J.; Warner, I. M. *Journal of Luminescence* **1997**, *71*, 105.
- (94) Blanka, Z.; Tomasz, W.; Michal, C.; Stefan, K. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **2016**, *19*, 319.
- (95) Li, J.; Liu, C.-y.; Liu, Y. *Journal of Materials Chemistry* **2012**, *22*, 8426.
- (96) Bao, H.; Pan, Y.; Ping, Y.; Sahoo, N. G.; Wu, T.; Li, L.; Li, J.; Gan, L. H. *Small* **2011**, *7*, 1569.
- (97) Kavitha, T.; Haider Abdi, S. I.; Park, S.-Y. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15*, 5176.
- (98) Harada, Y.; Yamamoto, T.; Sakai, M.; Saiki, T.; Kawano, K.; Maitani, Y.; Yokoyama, M. *International Journal of Pharmaceutics* **2011**, *404*, 271.

ANEXO

CURRÍCULO ACADÊMICO

Publicações

Artigos científicos

- 1) Martins, Carlos Henrique Zanini; de Sousa, Marcelo; **Fonseca, Leandro Carneiro**; Martinez, Diego Stéfani Teodoro; Alves, Oswaldo Luiz. Biological effects of oxidized carbon nanomaterials (1D versus 2D) on *Spodoptera frugiperda*: Material dimensionality influences on the insect development, performance and nutritional physiology. *Chemosphere JCR* (**4,427**), v. 215.

- 2) de Melo Monteiro, Ana Paula; Dias Holtz, Raphael; **Carneiro Fonseca, Leandro**; Zanini Martins, Carlos Henrique; de Sousa, Marcelo; de Luna, Luis Augusto Visani; de Sousa Maia, Djalma Lucas; Alves, Oswaldo Luiz. Nano silver vanadate AgVO synthesis, new functionalities and applications. *Chemical Record JCR* (**4,891**), v. 18, p. 1-14, 2018.

- 3) Kumar, Rajesh; da Silva, Everson T.S.G.; Singh, Rajesh K.; Savu, Raluca; Alaferdov, Andrei V.; **Fonseca, Leandro C.**; Carossi, Lory C.; Singh, Arvind; Khandka, Sarita; Kar, Kamal K.; Alves, Oswaldo L.; Kubota, Lauro T.; Moshkalev, Stanislav A.. Microwave-assisted synthesis of palladium nanoparticles intercalated nitrogen doped reduced graphene oxide and their electrocatalytic activity for direct-ethanol fuel cells. *Journal of Colloid and Interface Science JCR* (**5,091**), v. 515, p. 160-171, 2018.

- 4) de Sousa, Marcelo; de Luna, Luis Augusto Visani; **Fonseca, Leandro**; Giorgio, Selma; Alves, Oswaldo Luiz. Folic acid-functionalized graphene oxide nanocarrier: synthetic approaches, characterization, drug delivery study and anti-tumor screening. *ACS Applied Nano Materials*, v. 1, p. 922-932, 2018.

- 5) de Sousa, Marcelo; Martins, Carlos H. Z.; Silva Franqui, Lidiane S.; **Fonseca, Leandro Carneiro**; Delite, Fabrício; Lanzoni, Evandro; Martinez, Diego; Alves, Oswaldo Luiz. Covalent functionalization of graphene oxide with d-mannose: evaluating the hemolytic effect and protein corona formation. *Journal of Materials Chemistry B JCR* (**4,776**), v. 6, p. 2803-2812, 2018.

6) **Fonseca, Leandro C.**; de Araújo, Maciel M.; de Moraes, Ana Carolina M.; da Silva, Douglas S.; Ferreira, Ariane G.; Franqui, Lidiane S.; Martinez, Diego Stéfani T.; Alves, Oswaldo L.. Nanocomposites based on graphene oxide and mesoporous silica nanoparticles: preparation, characterization and nanobiointeractions with red blood cells and human plasma proteins. *Applied Surface Science* **JCR (4,439)**, v. 437, p. 110-121, 2018.

7) **Fonseca, Leandro C.**; de Paula, Amauri J.; Martinez, Diego Stéfani T.; Alves, Oswaldo L.. How does the chain length of peg functionalized at the outer surface of mesoporous silica nanoparticles alter the uptake of molecules?. *New Journal of Chemistry* **JCR (3,201)**, v. 40, p. 8060-8067, 2016.

8) Martinez, Diego Stéfani T.; Paula, Amauri J.; **Fonseca, Leandro C.**; Luna, Luis Augusto V.; Silveira, Camila P.; Durán, Nelson; Alves, Oswaldo L.. Monitoring the hemolytic effect of mesoporous silica nanoparticles after human blood protein corona formation. *European Journal of Inorganic Chemistry* **JCR (2,507)**, v. 24, p. n/a-n/a, 2015.

9) Paula, Amauri J.; Silveira, Camila P.; Martinez, Diego Stéfani T.; Souza Filho, Antonio G.; Romero, Fabian V.; **Fonseca, Leandro C.**; Tasic, Ljubica; Alves, Oswaldo L.; Durán, Nelson. Topography-driven bionano-interactions on colloidal silica nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces* (print) **JCR (8.097)**, v. 6, p. 3437-3447, 2014.

10) **Fonseca, L. C.**; Faez, R.; Camilo, F.; Bizeto, M.. Evaluation of the doping process of polyaniline produced inside the mesopores. *Microporous and Mesoporous Materials* (print) **JCR (3,649)**, v. 159, p. 24-29, 2012.

Patentes

1) Alves, Oswaldo Luiz; **Fonseca, Leandro Carneiro**; de Paula, Amauri Jardim; Martinez, Diego Stéfani T.. Processo de obtenção de nanopartículas de sílica peguiladas carreadoras de fármacos hidrofóbicos, nanopartículas assim obtidas e seus usos. 2014, Brasil. **Depósito de Patente de Invenção**: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR 10 2014 031684, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 17/12/2014.

2) Alves, Oswaldo Luiz; **Fonseca, Leandro Carneiro**; de Paula, Amauri Jardim; Martinez, Diego Stéfani T.. Processo de obtenção de nanopartículas de sílica peguiladas carreadoras de fármacos hidrofóbicos, nanopartículas assim obtidas e seus usos. 2014, Brasil. **Depósito de Certificado de Adição de Patente**: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR 13 2015 03094, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 17/12/2014.

3) Alves, Oswaldo Luiz; **Fonseca, Leandro Carneiro**; de Paula, Amauri Jardim; Martinez, Diego Stéfani T.. Obtaining process of pegylated silica nanoparticles as hydrophobic drug carriers, the said nanoparticles and its use. 2016, Brasil. **Publicação Internacional – Depósito PCT**: Privilégio de Inovação. Número do registro: WO 2016 094991, Instituição de registro: WIPO - World Intellectual Property Organization. Depósito: 23/06/2016.

4) Alves, Oswaldo Luiz; **Fonseca, Leandro Carneiro**; de Araujo, Maciel Menezes; Moraes, A. C. M.; Martinez, D. S. T.. Processo de obtenção de nanocompósito à base de óxido de grafeno e nanopartículas de sílica, nanocompósito assim obtido e seus usos. 2016, Brasil. **Depósito de Patente de Invenção**: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR 10 2016 03013, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 21/12/2016.

5) Alves, Oswaldo Luiz; De Sousa, Marcelo; **Fonseca, Leandro Carneiro**; Luna, Luis Augusto V.; Giorgio, Selma. Processo de obtenção de nanocompósito, nanocompósito e seu uso. 2017, Brasil. **Depósito de Patente de Invenção**: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR 10 2017 02747, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 19/12/2017.

Capítulos de livro

1) Alves, Oswaldo L.; Moraes, Ana Carolina Mazarin; Simões, Mateus Batista; **Fonseca, Leandro Carneiro**; Nascimento, Rafaella Oliveira; Holtz, Raphael Dias; Faria, Andreia Fonseca. *Nanomaterials. Nanomedicine and Nanotoxicology*. 1ed.: Springer New York, 2014, v. , p. 1-29.

Reconhecimento pela mídia

1) **Fonseca, L. C.**; Paula, A. J.; Martinez, D. S. T.; Alves, O. L.. **TV Globo**. Hoje é dia de nanotecnologia: nanomedicina. 2017. (Programa de TV/Entrevista).

Disponível em: <https://globoplay.globo.com/v/6229577/>

2) **Fonseca, L. C.**; Paula, A. J.; Martinez, D. S. T.; Alves, O. L.. **TV Band**. Brasileiros desenvolvem quimioterapia sem efeito colateral. 2017. (Programa de TV/Entrevista).

Disponível em: https://www.youtube.com/watch?v=h-IWWLWuGW8&index=32&list=PLu9pj3PA2_1JBHT1PgzcNSXEKN600u_Zy

3) **Fonseca, L. C.**; Paula, A. J.; Martinez, D. S. T.; Alves, O. L.. **TV Câmara**. Química Unicamp. 2017. (Programa de TV/Entrevista).

Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=txmvHuSYRW8&t=7s>

Congressos Internacionais

1) **Fonseca, Leandro C.**; de Araujo, Maciel Menezes; Moraes, A. C. M.; da Silva, Douglas Soares; Ferreira, Ariane; Franqui, Lidiane Silva; Martinez, D. S. T.; Alves, O. L.. Development of nanocomposite based on graphene oxide and silica nanoparticles and its interaction to RBCs and plasma proteins. 2017. **Graphene 2017 – Barcelona/Espanha**

2) **Fonseca, Leandro C.**; de Paula, Amauri J.; Martinez, Diego Stéfani T.; Alves, Oswaldo L. Surface Modification of Silica Based Mesoporous Nanoparticles, its biological applications and new trends. 2015. **XIV Encontro da SBPMat – Rio de Janeiro/Brasil**

3) **Fonseca, Leandro C.**; de Paula, Amauri J.; Martinez, Diego Stéfani T.; Alves, Oswaldo L. Surface Modification of Silica Based Mesoporous Nanoparticles for Application as Molecular Vehicles 2014. **1st International Symposium on Nanoparticles/Nanomaterials and Applications – Costa da Caparica/Portugal**

Congressos Nacionais

1) **Fonseca, Leandro C.**; de Paula, Amauri J.; Martinez, Diego Stéfani T.; Alves, Oswaldo L. Surface Modification of Silica Based Mesoporous Nanoparticles for Application as Molecular Vehicles. 2013. **I Workshop on Sol-Gel Chemistry and Process for Ceramic, Composite and Inorganic-Organic Hybrid Materials (USP São Carlos) – São Carlos/Brasil**

Certificados

● **Uso estratégico de patentes em projetos de P & D e negócios, foco em informações tecnológicas**- 29 a 30 de janeiro de 2018

Axonal Consultoria tecnológica e Instituto de Ciências Biomédicas da USP

Ministrante: Henry Suzuki (carga horária de 12 horas)

● **Introdução à Propriedade Intelectual** - 1 a 2 de outubro de 2014

Rede Inova São Paulo (carga horária: 16 horas)

● **Curso geral sobre Propriedade Intelectual (EAD)** - 7 de abril a 23 de maio

Organização Mundial da Propriedade Intelectual (carga horária: 75 horas)

28/02/2018

Rightslink® by Copyright Clearance Center



RightsLink®

Home

Create Account

Help



Title: Nanocomposites based on graphene oxide and mesoporous silica nanoparticles: Preparation, characterization and nanobiointeractions with red blood cells and human plasma proteins

Author: Leandro C. Fonseca, Maciel M. de Araújo, Ana Carolina M. de Moraes, Douglas S. da Silva, Ariane G. Ferreira, Lidiane S. Franqui, Diego Stéfani T. Martinez, Oswaldo L. Alves

Publication: Applied Surface Science

Publisher: Elsevier

Date: 15 April 2018

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

LOGIN

If you're a [copyright.com](#) user, you can login to RightsLink using your [copyright.com](#) credentials. Already a [RightsLink](#) user or want to [learn more?](#)

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

Permissão da revista Applied Surface Science (Elsevier) para utilização das Figuras do artigo mencionado acima, na presente tese de doutorado