



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

**Interação entre Tetrakis-Acetato de DiRódio (II) e o dendrímero PAMAM enxertado em nanopartículas de magnetita: Efeitos nas propriedades magnéticas e no tratamento de células de câncer de mama**

**André Luiz Teixeira**

**Brasília – DF  
2022**



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia

**Interação entre Tetrakis-Acetato de DiRódio (II) e o dendrímero PAMAM enxertado em nanopartículas de magnetita: Efeitos nas propriedades magnéticas e no tratamento de células de câncer de mama**

**André Luiz Teixeira**

**Orientador: Sebastião William da Silva**

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

**Brasília – DF  
2022**

*Agradeço primeiramente a Deus em seguida aos meus pais, Luiz Gonzaga Teixeira e Terezinha Pereira Teixeira, e ao restante de minha família e a todos os meus amigos pelo carinho dedicação e estima em todos os momentos desta jornada.*

# Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a nosso Senhor Deus, por ter permitido a execução e finalização deste trabalho, que é mais uma etapa em minha vida a qual pertence a Nosso Senhor Deus. Porque sem a presença e ajuda do Espírito Santo, eu não teria conseguido.

Quero agradecer a todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para a execução deste trabalho, são elas: Dr. Mosar Correia Rodrigues, Dr<sup>a</sup> Isis Oliveira Szlachetka, Dr José Huamaní Coaquira, e Dr Jason Jerry Atoche Medrano, Dr. Ricardo Bentes e Dr. João Paulo Longo, que Deus os abençoe em todos os seus projetos.

Agradeço também aos professores e técnicos que colaboraram direta ou indiretamente, na execução deste trabalho, em especial aos técnicos da Central Analítica do IQ-UFG, aos técnicos do Laboratório de Microscopia Eletrônica do IF-UFG e do Laboratório de Ressonância Magnética nuclear da UFG e aos apoios Institucionais dos Institutos de Ciências Biológicas – UFG, Institucionais dos Institutos de Ciências Biológicas – UNB, Química – UNB e Química – UFG, Física – UNB e Faculdade de Farmácia – UFG.

Quero muito agradecer, nesta oportunidade aos professores Dr. Sebastião William da Silva, Dr. Denilson Rabelo, Dr. Aparecido Ribeiro de Souza, Dr. Luciano Leão e Dr<sup>a</sup> Tais Pitta Cotta e Dr José Humaní Coaquira, pelo apoio na execução do trabalho.

Em especial quero muito agradecer ao meu orientador, professor Dr. Sebastião William da Silva, pela sua dedicação, paciência e pelo profissionalismo na conduta e execução do trabalho, porque sem sua colaboração nos momentos cruciais, o trabalho não teria chegado ao seu final.

*Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver caridade, sou como o bronze que soa, ou como o címbalo que retine. Ainda que distribuísse todos os meus bens em sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, se não tiver caridade, de nada valerá! A caridade é paciente, a caridade é bondosa. Não tem inveja. A caridade não é orgulhosa. Não é arrogante. Nem escandalosa. Não busca os seus próprios interesses, não se irrita, não guarda rancor." "Não se alegra com a injustiça, mas se rejubila com a verdade. Tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. A caridade jamais acabará. As profecias desaparecerão, o dom das línguas cessará, o dom da ciência findará. A nossa ciência é parcial, a nossa profecia é imperfeita. Quando chegar o que é perfeito, o imperfeito desaparecerá. Quando eu era criança, falava como criança, pensava como criança, raciocinava como criança. Desde que me tornei homem, eliminei as coisas de criança. Hoje vemos como por um espelho, confusamente; mas então veremos face a face. Hoje conheço em parte; mas então conhecerei totalmente, como eu sou conhecido. Por ora subsistem a fé, a esperança e a caridade – as três. Porém, a maior delas é a caridade."*

*I Coríntios, 13*

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana seja apenas outra alma humana”.*

*Carl G. Jung*

## Resumo

Este estudo relata o sucesso da fabricação e caracterização de um novo nanocarreador magnético baseado na associação de nanopartículas de magnetita com dendrímeros de poli (amidoamina) (PAMAM), carregando complexo de Tetrakis-Acetato de DiRódio (II) [DiRh (II)]. A interação entre os dendrímeros do PAMAM e o DiRh (II) e seus efeitos nas propriedades magnéticas e nas atividades biológicas em células de câncer 4T1 e MCF7 foram investigados. A fase de espinélio da magnetita é confirmada por meio de difração de raios X (XRD) e espectroscopia Raman. O tamanho médio de cristalito de magnetita de  $9,5 \pm 0,3$  nm é avaliado a partir de dados de DRX, que está próximo aos valores obtidos por meio de dispersão dinâmica de luz (DLS) e micrografias de microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados sugerem fortemente que os íons Rh (II) interagem com pares de elétrons livres de átomos de nitrogênio em amida-II e aminas primárias das porções terminais na superfície do PAMAM. Os dados de magnetização indicam que a presença de DiRh (II) ligado ao dendrímero PAMAM leva a um forte enfraquecimento da interação dipolo-dipolo magnético em nanopartículas de magnetita revestidas com 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS) e APTS@PAMAM. Os ensaios *in vitro*, realizados em células 4T1 e MCF7 mostram que tanto o complexo de DiRh(II) quanto sistemas MAPP não apresentam citotoxicidade estatisticamente significativa no intervalo de concentração de DiRh(II) estudado. Por outro lado, os sistemas nanoestruturados MAPPRh e PPDiRh(II) apresentam elevada atividade citotóxica em ambas as linhagens celulares, sendo o IC50 observado para o sistema MAPPRh 15 vezes menor que o observado para o sistema PPDiRh(II). Os estudos do perfil de internalização dos sistemas nanoestruturados em células 4T1 e MCF7 mostram que para ambas as linhagens celulares a internalização dos sistemas MAPPRh e PPDiRh(II) foi muito superior ao observado para o sistema MAPP. Por fim, foi identificada a apoptose como o principal mecanismo de morte celular após tratamento com os sistemas MAPPRh e PPDiRh(II). Este resultado foi mais pronunciado para as células 4T1 quando comparado com as células MCF7.

Palavras-chave: Entrega de drogas; nanopartícula magnética; revestimento dendrímero PAMAM; complexo de Tetrakis-Acetato de DiRódio (II).

## Abstract

This study reports the success of the fabrication and characterization of a novel magnetic nanocarrier based on association of magnetite nanoparticles with poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers loading dirhodium(II) tetraacetate complex (DiRh(II)). Interaction between PAMAM dendrimers and DiRh(II) and its effects on magnetic properties and biological activities in 4T1 and MCF7 cancer cells were investigated. Magnetite spinel phase is confirmed via x-ray diffraction (XRD) and Raman spectroscopy data analysis. Magnetite mean crystallite size of  $9.5 \pm 0.3$  nm is assessed from XRD data, which is close to values obtained via dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy micrographs. Our findings strongly suggest that Rh(II) ions interact with lone electron pairs of nitrogen atoms in amide-II and primary amines of PAMAM surface-terminated moieties. Magnetization data indicate that the presence of DiRh(II) attached to PAMAM dendrimer leads to strong weakening of magnetic dipole-dipole interaction in APTS- and APTS+PAMAM coated magnetite nanoparticles. In vitro assays performed on 4T1 and MCF7 cells show that both the DiRh(II) complex and MAPP systems do not show statistically significant cytotoxicity in the range of DirRh(II) concentration studied. On the other hand, the nanostructured MAPPRh and PPDiRh(II) systems show high cytotoxic activity in both cell lines, with the IC<sub>50</sub> observed for the MAPPRh system being 15 times lower than that observed for the PPDiRh(II) system. Studies of the internalization profile of nanostructured systems in 4T1 and MCF7 cells show that for both cell lines the internalization of the MAPPRh and PPDiRh(II) systems was much higher than that observed for the MAPP system. Finally, apoptosis is identified as the main mechanism of cell death after treatment with the MAPPRh and PPDiRh(II) systems. This result is more pronounced for 4T1 cells when compared to MCF7 cells.

Keywords: Drug delivery; magnetic nanoparticle; PAMAM dendrimer coating; Tetrakis-DiRhodium(II) Acetate complex.

# Sumário

Resumo	iv
Abstract	v
Lista de abreviatura e acrônimos	ix
Listas de Tabelas	xi
Lista de Figuras	xi
Capítulo 1	01
Introdução	01
Capítulo 2	05
2.1 - Objetivos gerais	05
2.2 - Objetivos específicos	05
Capítulo 3	06
Revisão bibliográfica	06
3.1 - Câncer	06
3.2 – Quimioterapia	07
3.3 – Metalofármacos	09
3.4 – Materiais Magnéticos	11
3.5 - Dendrímero Poli(amidoamina) (PAMAM)	18
3.6 - Polietileno Glicol (PEG)	23
Capítulo 4	26
Procedimentos Experimentais	26
4.1 - Reagentes	26
4.2 - Amostras	27
4.2.1 - Síntese do complexo Tetrakis-Acetato de DiRódio (II) $[\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$ .	27
4.2.2 - Síntese das Nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) funcionalizadas com ATPS – Amostras MAP	27
4.2.3 – Funcionalização das amostras MAP com o dendrímero PAMAM – Amostras MAPP	28
4.2.4 - Imobilização do complexo $[\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4$ nas amostras MAPP – Amostras MAPPRh	29



4.3 – Experimentos biológicos <i>in vitro</i>	30
4.3.1 - Linhagens de células utilizadas nos testes <i>in vitro</i>	30
4.3.2 - Internalização dos sistemas MAPP e MAPPRh em células 4T1 e MPF7	30
4.3.3 - Viabilidade Celular	31
4.3.4 - Avaliação do perfil da via de morte desencadeada pelos sistemas MAPP e MAPPRh em células 4T1 e MPF7	32
4.3.5 – Testes Estatísticos	33
4.4 – Caracterização Morfológica, Estrutural e Magnética	33
4.4.1 - Difractometria de raio-X.	33
4.4.2 – Microscopia Eletronica de Transmissão	33
4.4.3 – Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta.	34
4.4.4 – Espectroscopia de absorção óptica (OA) na região do UV-Vis e na Região do infravermelho médio (FTIR)	34
4.4.5 – Espectroscopia Raman	35
4.4.5 – Medidas de Magnetização	35
4.4.6 – Espectroscopia de Ressonancia Magnética Nuclear	35
Capítulo -5	36
Resultados e Discursão	36
5.1 - Caracterização Morfológica e estrutural das amostras	36
5.1.1 - Difração de Raios X	36
5.1.2 - Microscopia eletrônica de alta resolução	38
5.1.3 - Estudo das interações entre o DiRh(II) e o dendrímeros PAMAM	41
5.1.3.1 - Espectroscopia UV-Vis	41
5.1.3.2 - Espectroscopia FTIR	43
5.1.3.3 - Espectroscopia Raman	46
5.1.3.4 - Espectroscopia RMN	49
5.1.4 - Propriedades Magnéticas	52
5.2 - Testes Biológicos	60
5.2.1 - Perfil de internalização celular pelo método de microscopia de fluorescência	60
5.2.2 - Citotoxicidade dos sistemas DiRh(II) livre, MAPP, MAPPRh e PPDiRh.	62

5.2.3 – Via de morte celular	65
Capítulo 6	69
6.1 - Conclusões	69
6.2 - Perspectivas de trabalhos futuros	71
Bibliografia	72

## Lista de Abreviaturas e Acrônimos

Anexina V-FITC	Anexina conjugada a fluoresceína-5-ísoiocianato
ATPS	(3-aminopropil) Trietoxisilano
CPS	Ciclo por segundo
DiRh (II)	Tetrakis-Acetato de DiRódio (II).
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRX	Difratometria de Raios X
DOX	Doxorrubicina
Dq	Desdobramento do campo cristalino
DSL	Dynamic Ligth Scattering
$d_m$	Diâmetro da partícula magnética
$D_{DLS}$	Diâmetro hidrodinâmico
$D_{MET}$	Diâmetro medido por MET
$D_{DRX}$	Diâmetro médio do cristalito
$\langle D \rangle_{mag}$	Diâmetro magnético médio
ET <sub>3</sub> N	Etileno de amina
FDA	Food and Drug Administration
FRX	Fluorescência de Raios-X por energia dispersiva (XRF)
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor-Type 2
IC <sub>50</sub>	Concentração Inibitória Média
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LCT	Liquid Crystal Templating
MAP	Magnetita@ATPS
MAPP	Magnetita@ATPS+PAMAM
MAPPRh	Magnetita@ATPS+PAMAM+Tetrakis-Acetato de DiRódio (II)
MCF7	Michigan Cancer Foundation – 7 (células adenocarcinoma mamário humano)

MET	Microscopia eletrônica de transmissão
HRMET	Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução
MEV	Microscopia eletrônica de Varredura
NPMs	<b>Nanopartículas Magnéticas</b>
PPDiRh	PAMAM+Tetrakis-Acetato de DiRódio (II).
PAMAM	Poliamidoamina
PVA	Poliacetato de Vinila
KBr	Brometo de Potássio
NaOH	Hidróxido de Sódio.
NH <sub>3</sub> OH	Hidróxido de Amônia
<b>K<sub>B</sub></b>	Constante de Boltzmann
pH	Potencial hidrogeniônico
<sup>1</sup> H RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons
4T1	Carcinoma Mamário Murino
$\eta$	Viscosidade
$\xi$	potencial zeta
$U_E$	Mobilidade eletroforética
$M_s$	magnetização de saturação
$M_r$	magnetização remanente
$H_c$	Campo coercivo
$L(x)$	função de Langevin de primeira ordem
$\mu$	momento magnético
$\langle M \rangle$	magnetização média
$\langle D \rangle_{mag}$	Diâmetro magnético médio
$\langle T_B \rangle$	Temperatura média de bloqueio
$K_{eff}$	Anisotropia magnética efetiva

## Lista de Tabelas

Tabela I. Parâmetros obtidos das medidas magnéticas das amostras MAP, MAPP e MAPPRh (II).  $M_s$ : magnetização de saturação,  $H_c$ : coercividade,  $M_r$ : Magnetização remanescente,  $\langle D \rangle_{mag}$  = tamanho magnético médio,  $\langle T_B \rangle$ : temperatura média de bloqueio.  $K_{eff}$ : anisotropia magnética efetiva 58

## Lista de Figuras

Fig. 3.1 - Fases de desenvolvimento do câncer. Figura adaptada da referência [34] 7

---

Fig. 3.2 - Representação estrutural para carboxilato de ródio (II), sendo em (a) 11 uma estrutura do tipo gaiola, com os ligantes L na região axial e os grupos carboxilatos na região equatorial. (b) estrutura polimérica de cadeia infinita evidenciando os sítios axiais ocupados pelos átomos de oxigênios da estrutura vizinha. Figura adaptado da referência [46]

---

Fig. 3.3 - Representação esquemática dos alinhamentos dos spins eletrônicos de 13 um material diamagnético (a) e paramagnético (b), na ausência e na presença de um campo magnético externo. Figura adaptada da referência [48].

---

Fig. 3.4 -Representação esquemática do acoplamento entre os spins eletrônicos 14 nos diferentes tipos de comportamentos magnéticos: a) paramagnético; b) ferromagnético; c) antiferromagnético; d) ferrimagnético; e) vidro de spins; f) helimagnéticos. Figura adaptada da referência [49].

---

Fig. 3.5. Representação esquemática da estrutura cristalina espinélio inversa. Os 16 sítios octaédricos e tetraédricos são representados pelas cores alaranjado e azul, respectivamente. Figura adaptada da referência [55].

---

Fig. 3.6. Esquema representativo da estrutura do dendrímero PAMAM até G3. 19 (Figura adaptada da referência [81].

---

Fig. 3.7 - Representação esquemática do tamanho do dendrímero a cada geração: 20 do núcleo, molécula de Etilenodiamina, até a geração 7. Figura adaptada das referências [82] [83].

---

Fig. 3.8. Esquema comparativo em escala de uma série de gerações de dendrímeros PAMAM com uma variedade de proteínas do corpo humano. Figura adaptada da referência [83].	21
Fig. 3.9 - Esquema da síntese do Dendrímero PAMAM, por adição de Michael entre a Etilenodiamina e Acrilato de Metila. Figura adaptada da referência [86].	23
Fig. 3.10 - Esquema representativo da funcionalização da superfície do PAMAM pelo PEG. Figura adaptada da referência [92]	25
Fig. 4.1: Fotomicrografia das células da linhagem 4T1 marcadas com alaranjado de acridina (AO) e iodeto de propídeo (PI) analisadas em microscópio de fluorescência EVOS. A) célula viável; B) célula apoptótica (as setas indicam a formação dos corpos apoptóticos); e C) célula necrótica. Figura adaptada da referência [100].	33
Figura 5.1 - Padrões de difração de raios X das amostras MAP, MAPP, MAPPRh.	37
Fig. 5.2 - (a) Imagem TEM da amostra MAP. (b) Imagens HRTEM da amostra MAP. (c) Histograma de tamanho de partícula para a amostra MAP obtida das imagens TEM e o ajuste correspondente (linha sólida vermelha) à função lognormal. (d) imagem TEM da amostra MAPPRh e (e) DiRh (II) em solução aquosa. A inserção em (e) mostra as imagens HRTEM de nanopartículas cristalinas de DiRh (II). Em (f) e (g) são mostrados os espectros EDS da amostra MAPPRh e DiRh (II), respectivamente.	40
Fig. 5.3 - Espectro UV Vis das amostras MAP, MAPP e MAPPRh e solução de DiRh (II).	42
Fig. 5.4 - Espectros de FTIR das nanoestruturas: MAP (i), DiRh (II) livre, MAPP (iii) e amostra MAPPRh (iv).	43
Fig. 5.5 - (b – f) Ampliações dos espectros de FTIR em diferentes faixas espectrais	45
Fig. 5.6 - Espectros Raman das amostras MAPP (i), MAPPRh (ii) e complexo DiRh (II) livre. A inserção mostra uma ampliação dos espectros Raman da amostra MAPPRh (linha verde) e DiRh (II) livre (linha preta).	47
Fig. 5.7 – (a) Espectros de $^1\text{H}$ NMR para o complexo DiRh (II) livre (i) e para os sistemas nanoestruturados MAPP (ii) e MAPPRh (iii). Os painéis (b – f) mostram ampliações em torno dos deslocamentos químicos dos diferentes picos de ressonância	50
Fig. 5.8 - Representação esquemática proposta para a amostra MAPPRh	51
Fig. 5.9. Curvas $M \times H$ das amostras MAP (símbolos azuis), MAPP (símbolos vermelhos) e MAPPRh (símbolos verdes) registradas em (a) 300 K e (b) 5 K.	55

Inserções do lado direito inferior dos painéis (a) e (b) mostram ampliações das curvas de magnetização na região de baixo campo magnético. As linhas sólidas no painel (a) mostram os ajustes das curvas  $M \times H$  usando as Eqs. (5.1) e (5.2). A inserção do lado esquerdo superior no painel (a) mostra as distribuições de momentos magnéticos acessados a partir dos ajustes.

---

Fig. 5.10 - (a) Curvas de ZFC e FC), obtidas em  $H = 100$  Oe para (i) amostras de MAP, (ii) MAPP e (iii) MAPPRh. (b) Distribuição de temperatura de bloqueio obtida a partir de  $(M_{ZFC} - M_{FC})/dT$  dos dados experimentais (símbolos) ajustados por uma função de distribuição log-normal (linhas tracejadas). 57

---

Fig. 5.11 - Análise de colocalização dos sistemas NPMs em células 4T1 (a) e MCF7 (b) para as células: controle (i) e após exposição aos sistemas MAPP (ii), MAPPRh (iii) e PPDiRh(II) (iv). A marcação em verde representa o fluoroforo contido no sistema de NPMs e azul refere-se o núcleo marcado com DAPI 61

---

Fig. 5.12 - Viabilidade celular (a) 4T1 e (b) MCF7 24 horas após exposição a diferentes concentrações dos sistemas DiRh(II) livre, MAPP, MAPPRh e PPDiRh. O símbolo \* indica diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). 63

---

Fig. 5.13 – Marcação pelo método AO/PI das células (a) 4T1 (b) MCF7 após 24 horas da aplicação dos diferentes sistemas nanoparticulado: controle (i) e após exposição aos sistemas MAPPRh (ii) e PPDiRh (ii). A marcação em verde representa células viáveis, amarelo/laranja células em processo apoptótico e células vermelhas representa necrose 67

---

Fig 5.14 – Quantificação relativa do número de células (a) 4T1 e (b) MCF7 que, após tratamento com os sistemas MAPPRh e PPDiRh(II), são viáveis (barras verde) e sofreram morte por apoptose (barras laranjas), necrose (barras vermelhas). 68

---





# Capítulo 1

## Introdução

Atualmente alguns ramos da ciência tem como objetivo de pesquisa conceber um quimioterápico ou metalofármacos que atue em uma ou mais fases do ciclo celular, tentando levar a celular tumoral para apoptose [1]. Sendo assim, dependendo do tipo e do estágio de desenvolvimento da malignidade depois de diagnosticada, o profissional da área dispõe de três abordagens para o tratamento de câncer, são elas: excisão cirúrgica, irradiação e quimioterapia. A quimioterapia constitui o método mais utilizado como adjuvante da cirurgia para muitos tipos de tumores *in situ*, e metastizada, ela é classificada como curativa, adjuvante, neoadjuvantes e paliativa [2],[3]. O conjunto de quimioterápicos antineoplásicos inclui agentes químicos que podem impedir o desenvolvimento de tumores através da inibição do crescimento celular ou pela morte das células que estão com proliferação exacerbado. Essas drogas incluem agentes alquilantes (ciclofosfamida), antimetabólicos (fluorouracil), antibióticos (doxorubicina), derivados vegetais (vincristina), hormônios (dietilstilbestrol), metalofármacos (Cisplatina), anticorpos monoclonais (Trastuzumab) e agentes diversos, que não se enquadram nas categorias anteriores [4].

Atualmente, a busca por novos sistemas de liberação de fármacos, baseados em nanopartículas magnéticas (NPMs), está longe de ser esgotada. Devido às suas propriedades magnéticas notáveis, as NPMs podem ser manipuladas por gradientes de campo magnético e, portanto, são facilmente removidas de uma suspensão ou conduzidas remotamente para um local alvo específico enquanto atuam como carreadores de drogas[5]. A magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) é uma das fases de óxido magnético mais utilizadas para o desenvolvimento de biomateriais magnéticos nanoestruturados, uma vez que combina

propriedades magnéticas aprimoradas e com toxicidade reduzida. Como resultado, o uso das nanopartículas em aplicações biotecnológicas e biomédicas à base de magnetita ganharam atenção significativa. A magnetita tem sido amplamente utilizada na imobilização de moléculas biologicamente ativas, o que permitiu, por exemplo, o desenvolvimento de diferentes biossensores, sistemas de liberação de drogas, plataformas de bioseparação e bioimunoensaios [6], [7], [8], [9], [10], [11].

Geralmente, em sistemas de liberação de fármacos, a fixação de uma biomolécula é realizada revestindo a superfície da nanopartícula com polímeros, agentes de acoplamento, reagentes de reticulação ou encapsulamento. Dentre os polímeros empregados, os dendrímeros poli(amidoamina) (PAMAM) têm se destacado, devido às suas características monodispersas, alta solubilidade em água, composição homogênea e múltiplos sítios de fixação. Essas características particulares dos dendrímeros PAMAM permitem a conjugação direta e o aprisionamento físico de moléculas de drogas anticancerígenas [12]. Grupos amina primária protonada ( $-\text{NH}_3^+$ ) ou grupos carboxila ( $\text{COOH}$ ) na terminação dos dendrímeros PAMAM oferecem locais adequados para a ligação de moléculas extras. No entanto, a literatura revelou que, devido à sua natureza catiônica, os dendrímeros PAMAM- $\text{NH}_2$  G1-G4 apresentam citotoxicidade dependente de concentração e geralmente da geração [13]. Além disso, também foi observado que a toxicidade dos dendrímeros PAMAM- $\text{NH}_2$  pode diminuir drasticamente quando grupos de superfície de aminas livres são funcionalizados com cadeias de poli(etileno glicol) (PEG) [14]. Por estas razões, os dendrímeros PAMAM são considerados como portadores ideais de agentes terapêuticos, incluindo drogas anticancerígenas [12].

Embora os estudos tradicionais envolvendo a imobilização de agentes biologicamente ativos em nanopartículas tenham sido focados em moléculas orgânicas, o acoplamento de complexos metálicos tem recebido atenção crescente na última década

[15],[16]. Desde a descoberta da cisplatina como uma droga anticancerígena eficaz, muitos outros complexos metálicos têm sido estudados. Dentre eles, merecem destaque os à base de: rutênio, rênio, irídio, ósmio e ródio [17],[18],[19],[20].

O complexo de metal binuclear DiRódio (II) tetraacetato (DiRh (II) -  $(\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4)$ ), apresentou notável atividade anticancerígena para diferentes linhagens de células cancerígenas [21],[22],[23]. Demonstrou-se que DiRh (II) exibe potente atividade citostática contra sarcoma, tumor de Ascítico de Ehrlich e leucemia linfocítica em vários estudos *in vitro* e *in vivo*. Entretanto, a farmacocinética, farmacodinâmica e os mecanismos de ação pelo qual o complexo de ródio exerce atividades antitumorais ainda não são bem elucidados. Os pesquisadores suspeitam que a atividade antitumoral destes complexos pode estar associada a um mecanismo de inibição da replicação de DNA e síntese de proteínas, seguindo o mesmo mecanismo que ocorre com cisplatina [24], indicando assim seu uso potencial como quimioterápico [25],[26]. Por exemplo, DiRh (II) é conhecido há muito tempo por se ligar covalentemente a bases de DNA, preferencialmente em purinas, nucleotídeos e em DNA de fita dupla (*ds*-DNA) e DNA de fita simples (*ss*-DNA), formando DNA interfita reticuladas de forma semelhante à cisplatina [26]. Por outro lado, a elevada toxicidade e a baixa solubilidade têm limitado as aplicações deste complexo de modo que novas formas de metalofármacos a base de ródio, continuam sendo desenvolvidas. Por exemplo, alguns trabalhos mostram que o carboxilato de ródio (II), por ser um ligante mais lipofílico, possui atividade antitumoral maior que o acetado de ródio (II). Entretanto, por apresentar baixa solubilidade, o carboxilato de ródio (II) é dificilmente interiorizado pelas células, o que leva a baixíssima atividade antitumoral.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo sintetizar um novo nanocarreador magnético para o complexo Tetrakis-Acetato de DiRódio (II), complexo ativo anticancerígeno. Em uma primeira etapa, o dendrímero PAMAM (G4) é sintetizado

passo a passo na superfície de nanopartículas de magnetita funcionalizadas com APTS (3-aminopropiltrióxissilano). Posteriormente, nanopartículas de magnetita revestidas com PAMAM foram carregadas com DiRh (II). A fim de investigar os sítios de coordenação do dendrímero PAMAM, contendo DiRh (II) e os efeitos derivados da associação molecular nas propriedades vibracionais, ópticas e magnéticas, três amostras foram investigadas comparativamente: Nanopartículas de magnetita funcionalizadas por APTS (MAP), MAP revestido com PAMAM (MAPP) e DiRh (II)@MAPP (MAPPRh) foram sintetizadas. Em complemento, como o objetivo de testar a eficiência do complexo MAPPRh no tratamento de câncer de mama que superexpressa o gene HER2 foram realizados ensaios *in vitro* com células de adenocarcinoma mamário murino (4T1) e humano (MCF7).

## Capítulo 2

### Objetivos

#### 2.1 - Objetivos gerais

Este trabalho tem por objetivo geral sintetizar, caracterizar e testar as atividades biológicas *in vitro* de nanoestruturas baseadas na associação de nanopartículas de magnetita recobertas com dendrímeros de poli (amidoamina) (PAMAM) e carregadas com o complexo de Tetrakis-Acetato de DiRódio (II) [DiRh (II)]. Esse sistema é formado pela associação de nanopartícula de magnetita com 3-aminopropiltrietoxisilano (APTS) e posterior funcionalização com o dendrímero poliamidoamina (PAMAM - G4) com a finalidade de imobilizar o complexo Tetrakis-Acetato de DiRódio (II), na presença de polietileno glicol (PEG).

#### 2.2 - Objetivos específicos

- Sintetizar nanoestruturas compostas por nanopartículas de magnetita funcionalizada com o dendrímero poliamidoamina (PAMAM – G4) na presença de polietileno glicol (PEG) (MAPP), respectivamente.
- Sintetizar e caracterizar o complexo Tetrakis-Acetato de DiRódio (II) (DiRh (II)).
- Sintetizar e caracterizar a nanoestrutura MAPPRh formadas pela imobilização do DiRh (II) no sistema MAPP.
- Avaliar a citotoxicidade induzidas pelos sistemas MAPP, MAPPRh e PPDiRh (II) em células de câncer de mama 4T1 e MCF7, por meio de testes de viabilidade celular e microscopia óptica de Luz.
- Avaliar o tipo de morte celular induzida pelos sistemas MAPP, MAPPRh e PPDiRh (II) em células de câncer de mama 4T1 e MCF7, por meio de método AO/PI.

# Capítulo 3

## Revisão bibliográfica

### 3.1 - Câncer

De acordo com biologia molecular, a neoplasia maligna ou câncer é definido como sendo o resultado do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que comprometem o controle do crescimento celular normal, sendo, a causa principal deste crescimento descontrolado o acúmulo de mutações no DNA [27]. Quando estas mutações envolvem genes responsáveis pela síntese de proteínas que controla a estabilidade e o reparo do DNA, o crescimento celular, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos, imunidade e resistência a múltiplas drogas, tem-se a carcinogênese. A Carcinogênese é um processo de múltiplas etapas, que apresenta como principais genes o proto-oncogene, os genes supressores de tumor e os genes reparadores de DNA. O Primeiro estimula o crescimento celular e impede a diferenciação e a morte célula, enquanto o segundo limita a proliferação celular, controlando de forma negativa a proliferação e a sobrevivência celular, e por fim, o último atua no reparo do DNA. O desequilíbrio desse sistema pode alterar a função dos genes envolvidos, levando à proliferação exacerbada das células, devido ao acúmulo de sucessivas anormalidades genéticas, caracterizando assim o processo de formação do câncer. Esse processo é muito lento, ocorrendo em quatro etapas, que pode levar vários anos [28],[29], [30], [31]. As quatro etapas estão representadas na Fig. 3.1.

A partir da quarta etapa, as células de cancerígenas tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas. As estatísticas mostram que aproximadamente uma em cada quatro mortes ocorre devido ao câncer e que um câncer invasivo será diagnosticado em mais da

metade da população, em algum período da vida. O aumento da expectativa de vida da nossa população tem sido uma das causas do aumento da incidência de muitos tipos de câncer [32], [29],[33].

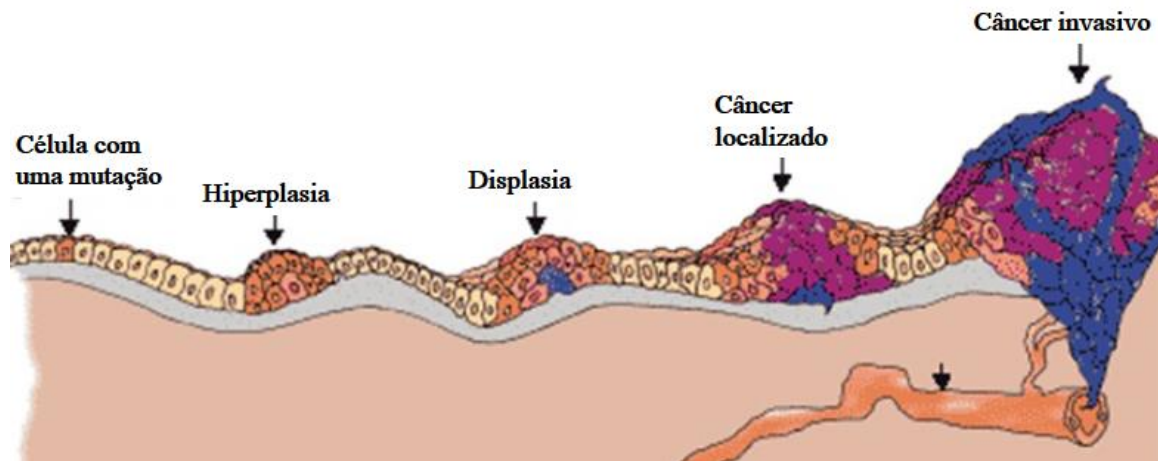


Fig. 3.1 - Fases de desenvolvimento do câncer. Figura adaptada da referência [34]

### 3.2 – Quimioterapia

O termo quimioterapia foi primeiramente usado para descrever o uso de fármacos que são seletivamente tóxicos para os microrganismos invasores, apresentando efeito tóxico mínimo para o hospedeiro. Posteriormente, ao serem utilizados para o tratamento de tumores, estes quimioterápicos passaram a associados a fármacos antitumorais citotóxicos que provocam efeitos adversos como a queda de cabelo, náuseas e vômitos. A escolha do protocolo clínico, a ser usado, no tratamento do câncer de um determinado paciente depende em muito do estágio em que se encontra a patologia no momento do diagnóstico. Quando descoberto em uma fase mais precoce, o tratamento pode levar a uma maior taxa de cura, acima de 50%, sem recorrência. Em um segundo, estágio, com os métodos atuais de tratamento, obtém-se a cura de cerca de um terço dos pacientes, isso para tumor que permanece localizado, no momento do diagnóstico. Entretanto, quando o diagnóstico em

fase de metastática o tratamento necessita de uma abordagem sistêmica mais agressiva, como quimioterapia, radioterapia e cirurgia.

Em pacientes com essa patologia localizadas e avançada, a quimioterapia é combinada com radioterapia para possibilitar uma extirpação cirúrgica, sendo que essa combinação de abordagem tem levado a uma melhora dos resultados clínicos. Atualmente se sabe que uma monoterapia usando somente o quimioterápico tem 10% de cura, contra 50% da terapia combinada, quando o tumor é diagnosticado em estágio avançado [35].

Atualmente a quimioterapia é adotada em três protocolos clínicos principais: (1) tratamento de indução primária para cânceres avançado, para os quais não existe outra abordagem clinicamente efetiva, (2) tratamento neoadjuvante para pacientes que apresentam a patologia localizada, sendo que os protocolos locais de terapias usadas clinicamente, não se mostram adequadas e (3) tratamento adjuvante para métodos locais de tratamento, incluindo cirurgia, radioterapia ou ambas [35],[36].

O conhecimento profundo, na medida do possível, de alguns fatores como a compreensão da farmacologia e dos mecanismos de ação do quimioterápico, juntamente com a cinética de proliferação das células tumorais, é de fundamental importância no planejamento de protocolos otimizados para usar em pacientes com câncer. Além disso, o planejamento empregado no desenvolvimento desses esquemas farmacológico também requer o conhecimento detalhado de características intrínsecas de tumores específicos. Dentre os vários conhecimentos pode se citar: a fração de crescimento, taxa de morte celular espontânea, fase de divisão em que a célula se encontra, fração de células tronco hipóxicas presentes no tumor e controle hormonal da fração normal de células. Por outro lado, é importante o conhecimento da farmacologia dos quimioterápicos específicos. Por exemplo, a sensibilidade das células tumorais ao fármaco, a fase do ciclo celular de atuação do fármaco, se o fármaco requer uma ativação em determinado órgão depois de ser



administrado e se essa ativação se dá no próprio sítio de ação e, finalmente, o conhecimento de anormalidades em vias específicas da cascata de sinalização intracelular [37].

De posse de todo este conhecimento, diversos fármacos foram desenvolvidos e são hoje utilizados em protocolos clínicos ditos convencionais. Dentre estes quimioterápicos pode-se citar: agentes alquilantes (ciclofosfamida), antimetabólicos (fluorouracil), antibióticos (doxorubicina), derivados vegetais (vincristina), hormônios (dietilstilbestrol), metalofármacos (Cisplatina) [38] [39].

Entretanto, a quimioterapia convencional, por não ser um tratamento localizado é adotada no estágio de metástases, o que leva a efeitos colaterais e adversos durante o tratamento. Dessa forma a busca de novas abordagens antineoplásicos mais seletivos e com menos efeito colateral tem recebido bastante atenção da comunidade científica. Assim, a toxicidade final do protocolo pode ser minimizada com o uso de sistemas *drug delivery* nanoestruturados para a administração de quimioterápicos [39],[40].

### **3.3 – Metalofármacos**

O uso de quimioterápicos metálicos teve início em meados do século XV, desde então ficou esquecido até a década de sessenta, do século XX, onde descobriram a ação anticancerígena do complexo inorgânico cis-diaminodicloroplatina (II) (cisplatina), o qual juntamente com a carboplatina (cis-diamino 1,1-ciclobutano dicarboxilato), são atualmente, os dois quimioterápicos metálicos mais usados no tratamento de tumores sólidos. O mecanismo de ação desses dois quimioterápicos resulta em inibição da transcrição e da replicação do DNA, através da formação de ligações cruzadas intra- e interfilamentares entre guanina, principalmente no seu sítio N7 (nitrogênio de posição sete), resultando assim em distorções na dupla hélice. Esse mecanismo de ação resulta em

elevada citotoxicidade, pelo uso de elevadas doses, devido a sua rápida depuração dos líquidos biológicos [2], [24], [41].

A ação antitumoral da cisplatina foi um marco, no qual, iniciou-se a química inorgânica medicinal, esse fato abriu novas frentes de pesquisas que culminaram com a inclusão de novos complexos metálicos, chamados a partir de então de metalofármacos. Já existem no mercado alguns metalofármacos candidatos a fase de testes clínicos. De acordo com o National Institutes of Health (NIH) a razão de metalofármacos testados por compostos comercializados é de somente de 1 para 6000 [42]. Além disso o sucesso de composto antitumoral, como a cisplatina e agente de contraste a base de complexo de Gd (III), usando em ressonância magnética por imagem, torna essa área muito atrativa tanto para pesquisadores como para investidores. Os metalofármacos de platina, mostraram grande potencial inibitório da proliferação das células tumorais. Toda via a incessante busca por compostos mais eficazes e menos tóxicos está conduzindo a síntese de complexos com diferentes centros metálicos e consequentemente diferentes mecanismos de ação. Um exemplo dessa nova classe de metalofármacos são os complexos de platina, rênio, rutênio, irídio, ósmio e ródio [17],[18],[19],[20], [43].

Dentre os Metalofármacos, os complexos de ródio, tal como os carboxilatos de ródio II,  $[\text{Rh}_2(\text{RCOO})_4]$  (onde R é um grupo alquila qualquer) têm se destacado por apresentarem intensa ação antitumoral. Estes compostos, os quais vem sendo estudada desde a década de setenta, mostram atividade antitumoral *in vivo* em linhagens de tumores L1210, Carcinoma Mamário Ascítico de Ehrlich, Sarcoma 180 e P388 [24]. Os carboxilatos de ródio II fazem parte da segunda geração de metalofármacos antitumorais de metais de transição do grupo da platina [44]. Eles possuem formula estrutural espacial do tipo gaiola simples ou na forma de dímeros (Fig. 3.2), com quatro ligantes perpendiculares entre si, que se coordenam aos

átomos do ródio por meio dos grupos carboxilatos, podendo ter ou não dois ligantes na posição axial, situados no eixo da ligação Rh-Rh [45].

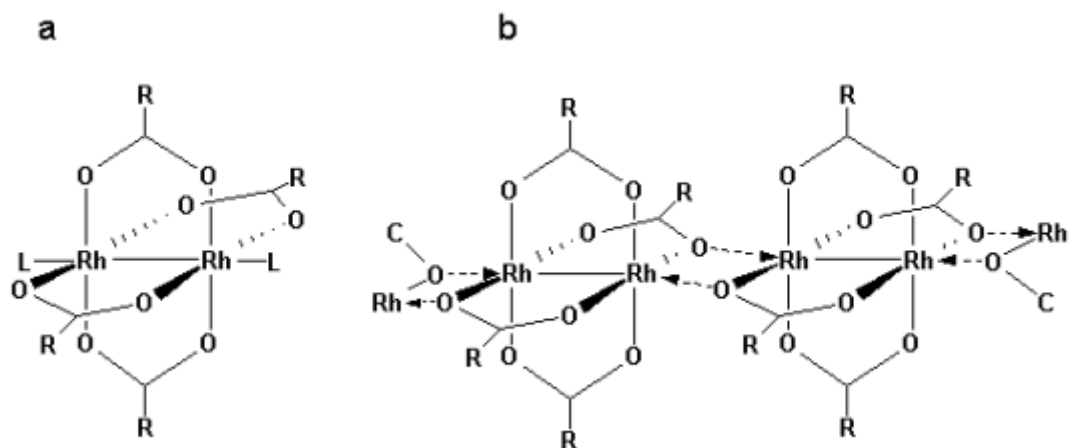


Fig. 3.2 - Representação estrutural para carboxilato de ródio (II), sendo em (a) uma estrutura do tipo gaiola, com os ligantes L na região axial e os grupos carboxilatos na região equatorial. (b) estrutura polimérica de cadeia infinita evidenciando os sítios axiais ocupados pelos átomos de oxigênios da estrutura vizinha. Figura adaptado da referência [46]

### 3.4 – Materiais Magnéticos

O magnetismo é uma propriedade dos átomos que tem origem em sua estrutura eletrônica. Os átomos contêm muitos elétrons, cada um girando em torno de seu próprio eixo e movendo-se em sua própria órbita. Estes movimentos, denominados spin e orbital tem a eles associados momentos magnéticos que podem se combinar de modo a se cancelarem completamente ou parcialmente. Quando os momentos magnéticos de todos os elétrons são tão orientados que se cancelam mutuamente, e o átomo como um todo não tem momento magnético líquido. Esta condição leva ao diamagnetismo. Por outro lado, quando o cancelamento dos momentos eletrônicos é apenas parcial e o átomo fica com um

momento magnético líquido ele é referido como um átomo magnético. Substâncias compostas por átomos desse tipo são para-, ferro-, antiferro- ou ferrimagnético [47].

O diamagnetismo está associado à tendência da carga elétrica de blindar parcialmente o interior de um corpo de um campo magnético aplicado. Isso ocorre porque quando um fluxo de campo magnético que atravessa um circuito elétrico é alterado, uma corrente induzida é criada em uma direção que se opõe à mudança de fluxo. Deste modo, um material diamagnético é uma substância que exhibe, por assim dizer, magnetismo negativo. Estes materiais são caracterizados por um pequeno valor de susceptibilidade, de sinal negativo.

Os materiais diamagnéticos é a classe de materiais em que o seu momento magnético intrínseco é igual a zero. Sendo que, na ausência de um campo magnético os spins dos átomos que constituem o material possuem orientação randômica e não interagem entre si (Fig. 3.3 (a)). Ao serem submetidos a um campo magnético externo, os spins se alinham em direção oposta ao sentido do campo magnético aplicado, induzindo um momento de dipolo magnético de baixo módulo no material.

Nos materiais paramagnéticos, a orientação dos spins na ausência de um campo magnético externo também se apresenta de maneira randômica (Fig. 3.3 (b)), entretanto, quando se encontram na presença de um campo magnético externo, todos os spins eletrônicos que se encontram desemparelhados, tendem a se alinhar na direção do campo magnético aplicado, resultando em um momento de dipolo magnético de módulo elevado. [47].

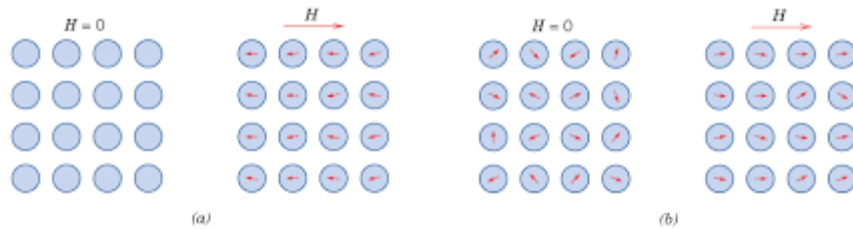


Fig. 3.3 - Representação esquemática dos alinhamentos dos spins eletrônicos de um material diamagnético (a) e paramagnético (b), na ausência e na presença de um campo magnético externo. Figura adaptada da referência [48].

De acordo com o tipo de interação (acoplamento) resultante entre os spins eletrônicos, os materiais paramagnéticos podem ser classificados em: i) materiais ferromagnéticos; ii) materiais ferrimagnéticos; iii) materiais antiferromagnéticos; iv) 11 materiais do tipo ‘vidro de spin’ (spin glass) e v) materiais helimagnéticos. Esses tipos de acoplamentos estão altamente relacionados com a estrutura cristalina do material.

Os materiais ferromagnéticos (Fig. 3.4 (b)) apresentam uma magnetização permanente, até mesmo na ausência de um campo externo, pois o acoplamento entre os spins de elétrons desemparelhados é de mesmo módulo e sentido, resultando em uma magnetização não nula. Do mesmo modo, os materiais ferrimagnéticos (Fig. 3.4 (d)) apresentam uma magnetização intrínseca sem presença de campo magnético externo, contudo, coexistem duas orientações de momentos magnéticos dos spins eletrônicos: uma interação de módulo maior em um determinado sentido e outra no sentido oposto com menor módulo.

Os materiais antiferromagnéticos (Fig. 3.4 (c)) possuem acoplamento de mesma magnitude em sentidos antiparalelos, levando a uma magnetização nula no material na ausência de campo magnético. Ao serem submetidos à presença de um campo magnético, uma quantidade de spins se alinha na direção do campo e uma outra quantidade idêntica de spins se alinha na direção oposta ao campo aplicado, fazendo que a magnetização do material permaneça nula.

O comportamento do tipo spin glass é observado em certos materiais nos quais o ordenamento antiferromagnético não se propaga ao longo de todo material e, em vez disso, existem certas regiões nas quais o ordenamento dos pares de spins leva a um acoplamento ferromagnético, destacado pelos círculos vermelhos na Fig. 3.4 (e). Finalmente, o comportamento helimagnético (Fig. 3.4 (f)) é observado quando o acoplamento entre os pares de spins eletrônicos não se dá estritamente de modo paralelo ou antiparalelo, mas apresenta uma rotação gradual entre os spins adjacentes resultando em um acoplamento do tipo helicoidal [49].

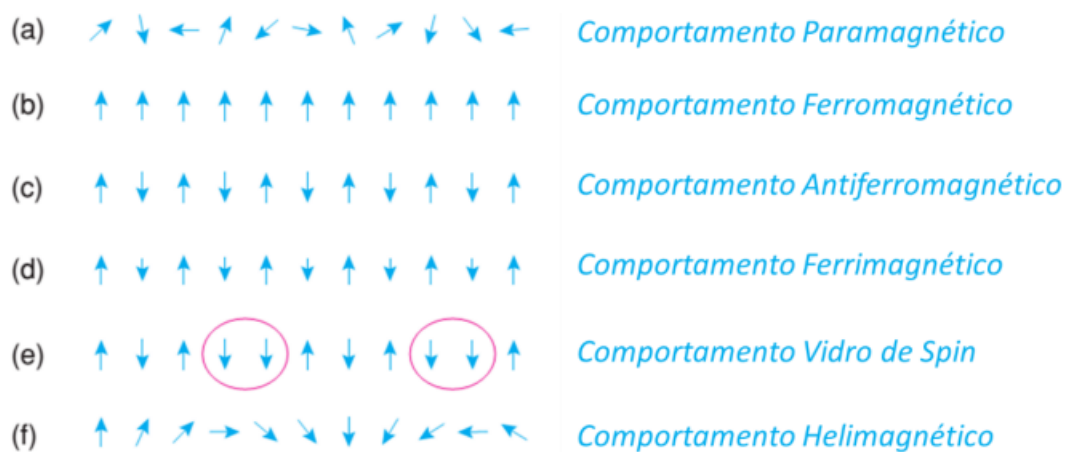


Fig. 3.4 -Representação esquemática do acoplamento entre os spins eletrônicos nos diferentes tipos de comportamentos magnéticos: a) paramagnético; b) ferromagnético; c) antiferromagnético; d) ferrimagnético; e) vidro de spins; f) helimagnético. Figura adaptada da referência [49].

A temperatura é um fator que possui grande influência nas propriedades magnéticas de um material, uma vez que a própria vibração atômica causada pela energia térmica pode alterar a magnitude e o tipo de acoplamento entre os spins. Os materiais ferromagnéticos e ferrimagnéticos só apresentam alguma magnetização quando estiverem submetidos a temperaturas inferiores a uma temperatura crítica, a Temperatura de Curie ( $T_c$ ); acima dessa temperatura, os spins assumem configuração randômica suprimindo a magnetização

intrínseca no material. Para os materiais com comportamento do tipo antiferromagnético e helimagnético, essa temperatura crítica é denominada por Temperatura de Néel ( $T_N$ ). Nas temperaturas  $T_c$  e  $T_N$  os spins eletrônicos passam de um estado ordenado para um estado desordenado [49].

Os materiais ferromagnéticos e ferrimagnéticos que se encontram na dimensão macroscópica (*bulk*) e em temperaturas menores que  $T_c$  apresenta regiões nas quais o alinhamento dos spins é o mesmo. Essas regiões são conhecidas por domínios magnéticos. [50]. No material como um todo, esses domínios podem se orientar de maneira aleatória de forma que o vetor da magnetização de um domínio se anule com o vetor magnetização dos domínios vizinhos. A formação desses multidomínios magnéticos ocorre “*com o intuito de minimizar a energia magneto estática, que é a energia que surge devido à formação de um campo magnético exterior.*” [51] Porém, ao serem submetidos à presença de um campo magnético externo, os spins tendem a se alinhar no mesmo sentido do campo do aplicado [51].

Dentre os materiais nanoestruturados destinados a aplicações biotecnológicas, os materiais a base de óxidos de ferro têm se destacado. Os óxidos de ferro mais utilizados são a Magnetita ( $Fe_3O_4$ ) e a Maghemita ( $\gamma-Fe_2O_3$ ). A magnetita ( $Fe_3O_4$ ) faz partes de classe de ferrita cúbica dos metais de transição do bloco d, que apresenta estrutura do tipo espinélio inverso, a qual foi escolhida para ser usada neste trabalho [52], [53], [54].

Conforme seja a ocupação dos cátions nos sítios cristalinos, tetraédricos ( $T_d$ ) ou octaédricos ( $O_h$ ), tem-se que nos arranjos de estrutura do tipo espinélio os íons cátions bivalentes ocupam sítios tetraédricos e os íons cátions trivalentes ocupam sítios octaédricos. Na estrutura do tipo espinélio inverso o arranjo dos íons cátions trivalentes, dar-se com a metade deles ocupando sítios octaédricos e a outra metade ocupando sítios tetraédricos e os átomos divalentes ocupam sítios octaédricos.

A Fig. 3.5 apresenta a célula unitária de uma estrutura do tipo espinélio inversa, as esferas brancas representam os átomos de oxigênio; os sítios octaédricos e tetraédricos são representados pelas cores alaranjado e azul, respectivamente [55]. Cada célula unitária apresenta 32 íons de oxigênio que se organizam em um empacotamento cúbico de face centrada. Existem oito sítios tetraédricos e 16 sítios octaédricos ocupados, os sítios  $T_d$  e  $O_h$  compartilham seus vértices e os sítios  $O_h$ , por sua vez, compartilham entre si as suas arestas.

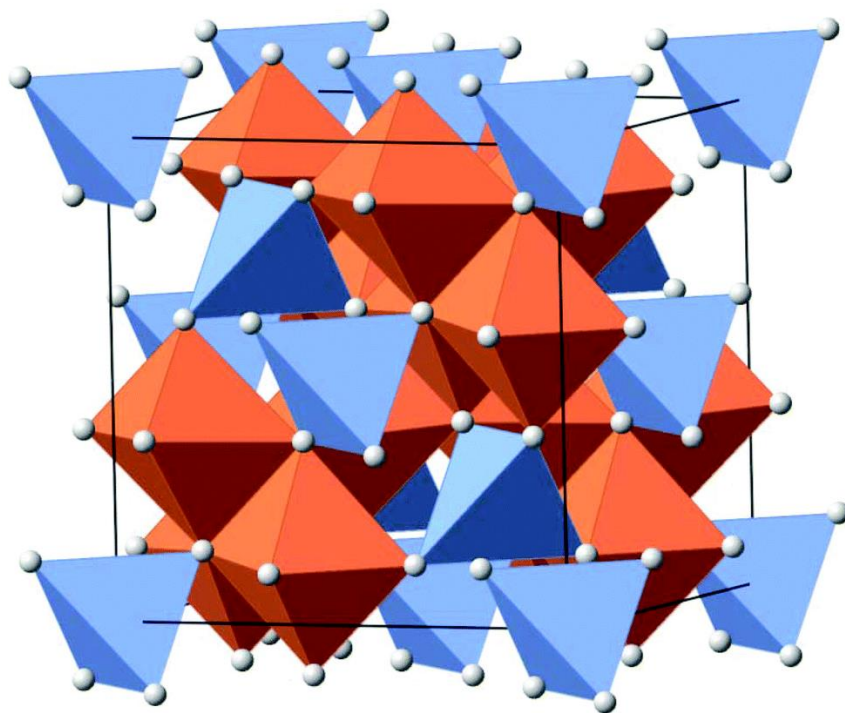


Fig. 3.5. Representação esquemática da estrutura cristalina espinélio inversa. Os sítios octaédricos e tetraédricos são representados pelas cores alaranjado e azul, respectivamente Figura adaptada da referência [55].

A literatura mostra várias abordagens, sejam elas físicas ou químicas, para a síntese de nanopartícula de óxido de ferro. Esses métodos de síntese são críticos no que se refere na determinação do tamanho, distribuição, estrutura, morfologia e composição das nanopartículas além da funcionalização da superfície delas [53],[56].



As tentativas de gerar nanopartículas de magnetita resultaram no desenvolvimento de inúmeras técnicas de síntese, entre elas pode-se citar [57]. i) Síntese da nanopartícula de magnética pela coprecipitação química. [58] [59]; ii) Método pela decomposição térmica [60]; iii) Método da Microemulsão [61]; iv) Pirólise a laser [62] v); Método Sol-Gel [63]. Neste trabalho foi feita opção pelo método da coprecipitação química. A literatura apresenta vários trabalhos que descreve a síntese e caracterização desse tipo de composição [64], [65],[66],[67],[68],[69],[70],[71].

Dentre os métodos de síntese, o método de coprecipitação é sem dúvidas, a rota de síntese mais simples e eficiente para a obtenção de nanopartículas magnéticas. Nessa metodologia, uma mistura estequiométrica de íons Fe (II) e Fe (III), em meio aquoso, são utilizados como fonte de ferro, que em condições alcalinas produzem nanopartículas de óxidos de ferro [72].

A forma, a composição e o tamanho das nanopartículas magnéticas dependem muito do tipo de sal utilizada na síntese, como exemplo, cloreto, sulfato, dentre vários, razão de Fe (II) e Fe (III), valor de pH, temperatura de reação, agente estabilizante e força iônica do meio reacional. A literatura indica, que a termodinâmica mostra que uma completa precipitação das nanopartículas de magnetita, ocorre em condições de pH entre 8 e 14 e com uma razão estequiométrica de Fe (II) e Fe (III) de 1:2 em meio não oxidante, ou seja, atmosfera de argônio ou nitrogênio.

O processo de coprecipitação, para a síntese de nanopartícula de magnetita e seu uso como parte de agente terapêutico apresenta algumas vantagens, entre elas pode-se citar que esse método gera grande quantidade de nanopartículas e, em geral, a distribuição de tamanho é relativamente estreita, estabilidade química, facilidade da rota sintética, baixo custo dos reagentes, biocompatibilidade e a possibilidade de funcionalização de sua

superfície com uma grande quantidade de agentes terapêuticos, desde moléculas pequenas, passando por polímeros, dendrímeros até entidades biológicas como aminoácidos, proteínas e anticorpo [73].

As nanopartículas magnéticas visando a aplicação biológica são geralmente constituídas por um núcleo de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e por um invólucro que permite a fixação de fármacos, ácido nucleico e proteínas. Entre materiais usados nos invólucros os polímeros em geral tem se destacado. Os Polímeros usados nestes sistemas, como o dextrana, PVA/MA, polietileno glicol (PEG) e o dendrímero (PAMAM) devem apresentar propriedades biocompatíveis, além de possuírem grupos ativos, nos quais possam ser ligados, as moléculas de interesse a serem transportadas pela estrutura [14]. Portanto encontra-se hoje na literatura uma série de trabalhos que desde as três últimas décadas, tem explorado a síntese desses materiais e a combinação de estruturas, usando diferentes metodologias, visando à obtenção de estruturas mais eficientes dos pontos de vista biológico, farmacológico e médico.

A estrutura sintetizada nesse trabalho foi usada para carrear complexo de ródio (II). Em estudos pioneiros, realizados por Katsaros e colaboradores [24] na década de 70, mostraram que o carboxilato de ródio (II) já apresentava promissora atividade antitumoral in vivo em algumas linhagens de células tumorais, das quais pode-se citar L1210 e sarcoma 180 e P388. [24]. [74]. [75]. O mecanismo de ação do carboxilato de ródio (II), junto ao DNA é similar ao da cisplatina, onde a guanina do DNA, liga-se preferencialmente na posição equatorial do complexo e a adenina, liga-se na posição axiais, do complexo de ródio (II). [76], [77].

### 3.5 - Dendrímero Poli(amidoamina) (PAMAM)

O dendrímero poli(amidoamina) (PAMAM) representa uma nova geração de polímeros que tem despertado grande interesse dos pesquisadores de várias áreas. [78] São polímeros sintéticos com grandes cadeias com estrutura química muito bem definida. Sua estrutura apresenta três partes distintas que são: (a) o núcleo, (b) as gerações ou camadas, formadas por unidades repetidas e radialmente ligadas ao núcleo e (c) grupos terminais funcionalizados ou não (Fig. 3.6) [79], [80].

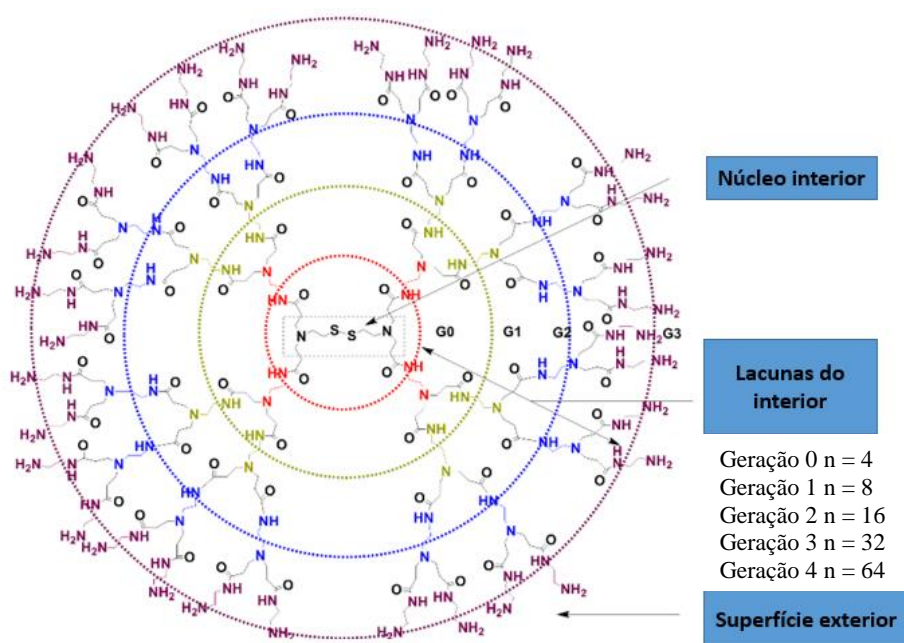


Fig. 3.6. Esquema representativo da estrutura do dendrímero PAMAM até G3. (Figura adaptada da referência [81].

A origem etimológica da palavra dendrímero vem do grego onde o prefixo “dendro” significa árvore e o sufixo “meros” parte, ou seja, partes de uma árvore devido ao grande número de ramificações na estrutura da molécula, característica essa, responsável pela funcionalidade dos dendrímeros. Sendo assim, pode-se ligar em sua superfície, tanto no

sentido qualitativo quanto quantitativo, moléculas, fármacos e metalofármacos. A quantidade de grupos periféricos, tamanho e peso molecular do dendrímero são características que determinam sua geração. A geração do dendrímero é determinada a cada novo monômero adicionado, isso faz com que seu diâmetro aumente linearmente (aproximadamente 1 nm, a cada geração) e seu grupos superficiais aumente exponencialmente, ou seja dobra a cada geração (Fig. 3.7) [82].

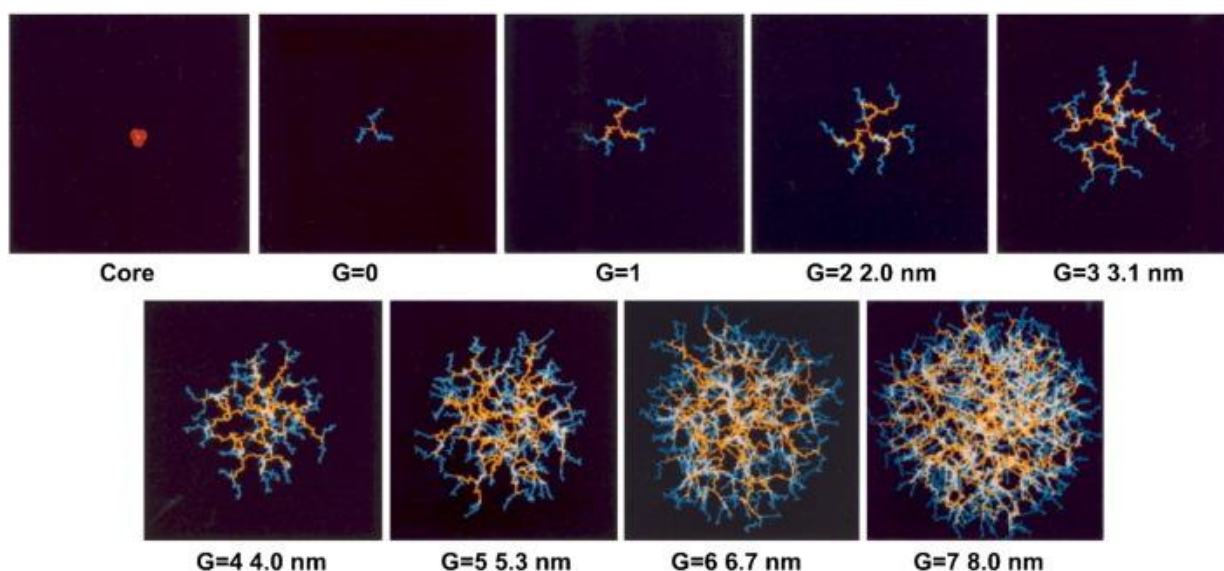


Fig. 3.7 - Representação esquemática do tamanho do dendrímero a cada geração: do núcleo, molécula de Etilenodiamina, até a geração 7. Figura adaptada das referências [82],[83].

A versatilidade dos dendrímeros, como plataforma nanométrica para *drug delivery* é devido algumas características especiais como: forma esférica bem definida, dimensões nanométricas, além de uma baixa polidispersividade. Eles são muito semelhantes a importantes proteínas do nosso organismo, como a insulina, hemoglobina, Citocromo C, dentre várias outras, sendo por isso conhecidos também por proteínas sintéticas. Uma comparação entre as duas estruturas é mostrada na Fig. 3.8. Seu sucesso e importância como sistema nanométrico de liberação de fármacos se deve, além das características mencionadas, ao fato de se apresentarem inertes para o organismo humano, demonstrando

baixa toxicidade e imunogenicidade. A literatura científica mostra em vários estudos em que as atividades biológicas de muitos princípios ativos foram potencializadas ou modificadas quando foram encapsulados, complexados ou ligados aos dendrímeros, isto nas últimas duas décadas. [78], [83], [84].

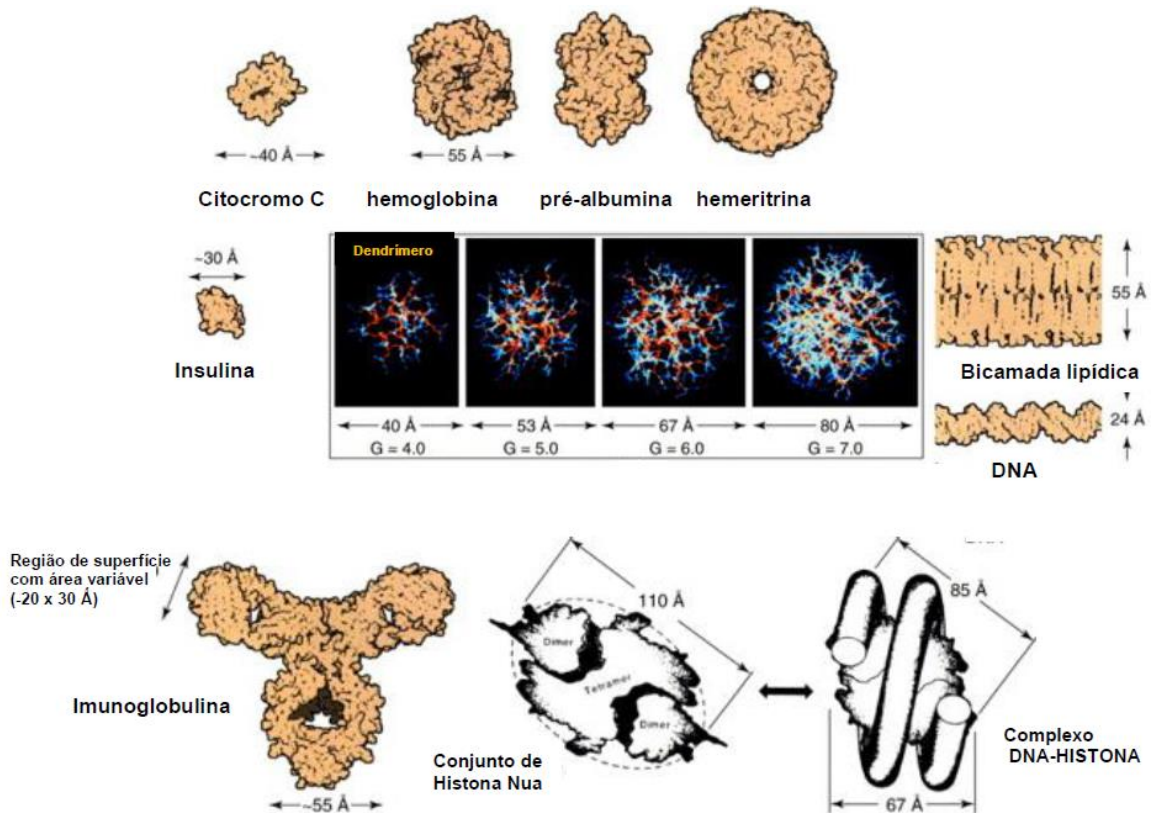


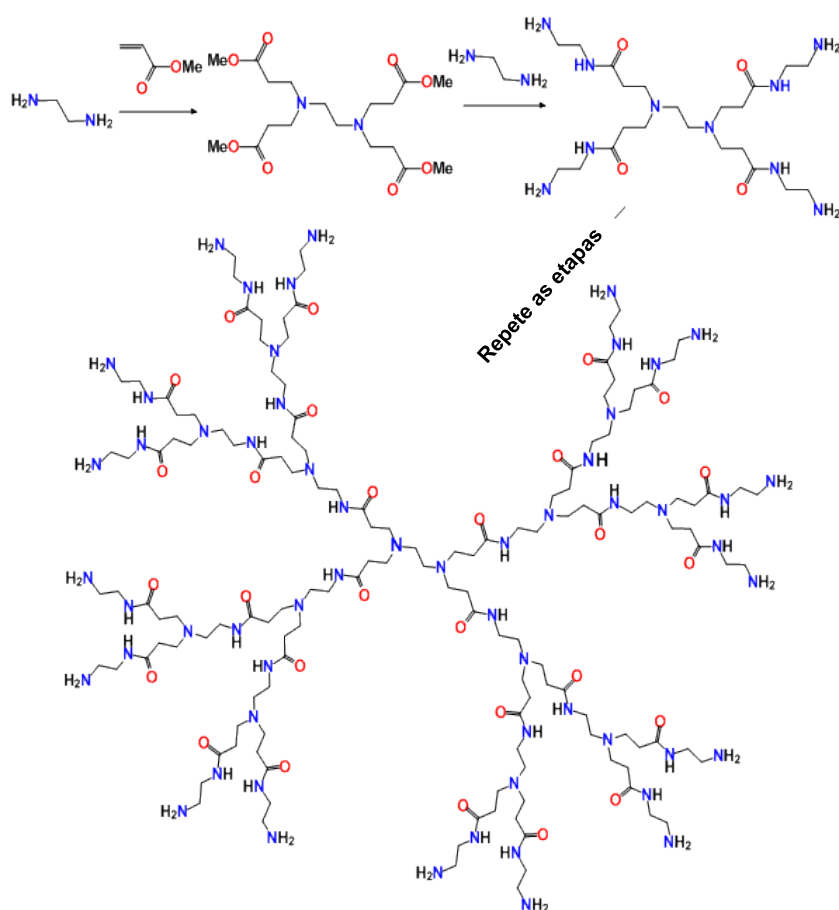
Fig. 3.8. Esquema comparativo em escala de uma série de gerações de dendrímeros PAMAM com uma variedade de proteínas do corpo humano. Figura adaptada da referência [83].

O PAMAM, sintetizado nos anos 80, por Tomalia e colaboradores, apresenta algumas características químicas e físicas excelentes, tais como: fáceis métodos de síntese, fácil manipulação, baixa toxicidade, mimetizam em tamanho e peso várias proteínas importantes do organismo e apresenta grande número de grupos superficiais. Os dendrímeros PAMAM podem se ligar (conjugar), encapsular, absorber e alvejar vários grupos de moléculas de diversas naturezas. As ligações podem ser desde covalente com os grupos periféricos do dendrímero ou ainda interações intermoleculares nas ramificações ou

no seu núcleo interno. A natureza da ligação depende das características físico-químicas da molécula de interesse e dos grupamentos funcionais presentes no dendrímero. Por exemplo, fármacos hidrofóbicos podem ser ligar ao núcleo ou ramificações do PAMAM, facilitando seu transporte, pelo dendrímero, através dos tecidos e células do corpo humano. A liberação do fármaco pelo PAMAM, pode ser feita de forma específica para determinado sítio de ação. Por exemplo, um estudo de dinâmica molecular desse tipo de dendrímero com grupos amino terminais mostrou que sua conformação pode passar de globular para estendida em função do pH do meio. Sendo assim em pH fisiológico o PAMAM-NH<sub>2</sub> apresenta estrutura globular, pois somente as amins dos grupamentos terminais, com pK<sub>a</sub> = 9 - 11, apresentam-se protonada. Já em pH ácido, como do interior do citoplasma celular (pH= 5) as amins que estão no interior do dendrímero ficam protonada, pois apresentam pK<sub>a</sub> = 5, nesse pH ácido, as amins protonadas no interior e na superfície do PAMAM se repetem e o dendrímero adquire uma conformação estendida, rompendo o citoplasma e liberando o fármaco. A multivalência do PAMAM permite multifuncionalidades, no que diz respeito a carrear fármacos através dos tecidos e células do corpo humano. Conseqüentemente o PAMAM pode aumentar a solubilidade aquosa de moléculas hidrofóbicas, porque ele pode hospedar em seu interior várias moléculas do fármaco. Estudos mostram que esta interação parece favorecer a penetração transdérmica de fármacos hidrofóbicos. Por exemplo, verificou-se que alguns dendrímeros, dentre os quais o PAMAM, agem como promotores de absorção cutânea de fármaco, para tal eles promovem a desorganização do estrato córneo, e assim aumentando a absorção cutânea. Também foi verificado que o de dendrímero (PAMAM) de baixa gerações G2, G4 e G6, em baixas concentrações, podem atravessar o extrato córneo e penetrar a pele. Já o PAMAM geração G4, com grupos funcionais do tipo hidroxila, é capaz de aumenta a

penetração da protoporfirina IX (PpIX), *in vitro*, assim como aumentar a atividade fototóxica da PpIX em culturas de células [83], [85].

A síntese do dendrímero PAMAM, apresenta as seguintes etapas: usa-se como núcleo o monômero etilenodiamina, no qual, em seguida será ligado por uma adição de Michael, o acrilato de metila (G0,5) e posteriormente acrescenta-se outra etilenodiamina às terminações do acrilato de metila (G1), e assim sucessivamente (G2, G3, G4...). A Fig. 3.9 representa um esquema da síntese do dendrímero PAMAM, pela adição de Michael entre a Etilenodiamina e o Acrilato de metila, método conhecido por divergente [86].



Fig, 3.9 - Esquema da síntese do Dendrímero PAMAM, por adição de Michael entre a Etilenodiamina e Acrilato de Metila. Figura adaptada da referência [86].

### 3.6 - Polietileno Glicol (PEG)

O polietileno glicol de fórmula molecular mínima  $H(OCH_2CH_2)_nOH$ , são polímeros obtidos a partir da reação de polimerização de óxido de etileno. Os polímeros obtidos vão desde líquidos viscosos até materiais sólidos, isso é claro dependendo de sua massa molar. [87],[88]. Durante as últimas décadas diversificou-se muito a utilização do PEG e de seu hidrogel, como agente de funcionalização da superfície de nanopartículas, as quais são utilizadas como dispositivo de liberação controlada de drogas (*drug delivery*), bem como veículos para que as células promovam a regeneração de tecido e diferenciação celular [89].

Atualmente, o PEG é usado na área biomédica, por ser biocompatível, atóxicos, solúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos. Além disso possui boa estabilidade térmica, baixa volatilidade e é considerado um produto não iônico. A sua ótima biocompatibilidade aliada as propriedades acima, principalmente sua grande solubilidade em água, tem estimulado o desenvolvimento de muitos sistemas de hidrogel para aplicação na medicina regenerativa. O PEG apesar de apresentar uma grande estabilidade apresenta-se higroscópico, propriedade essa que aumenta com a diminuição da massa molar do polímero sintetizado. Isto ocorre porque aumenta relativamente o número de hidroxilas terminais [84], [90]. Devido a esta propriedade tem aumentado muito seu uso em aplicações, químicas, biomédicas e industriais. O PEG promove uma não opsonização dos biomateriais, quando estão circulando pela corrente sanguínea, levando a maior tempo de circulação do fármaco carregado e conseqüentemente melhorando a biodisponibilidade [90], [91]. O polietilenoglicol por essas propriedades é aprovado pela FDA, que ganhou então grande atenção, por parte dos pesquisadores, para a modificação de superfície de complexos nanoestruturados, como o dendrímero



PAMAM [91]. Portanto a conjugação do PEG no PAMAM não apenas aumenta o espaço de sua cavidade para carregamento de fármacos, como também reduz o fluxo descontrolado de fármacos durante a viagem pelo sistema circulatório, reduz a carga superficial positiva do PAMAM e mantém a concentração apropriada do fármaco nos sítios de ação, por sustentar a sua liberação controlada [90]. A interação não específica entre as proteínas séricas e PAMAM também é evitada pelo PEG. O que impede a captação do PAMAM pelo sistema reticulo-endotelial, reduzindo a depuração renal e consequentemente melhorando a meia-vida circulante da nanoestrutura [91]. Um esquema representativo de um sistema *drug delivery* PAMAM/PEG está representada na Fig. 3.10.

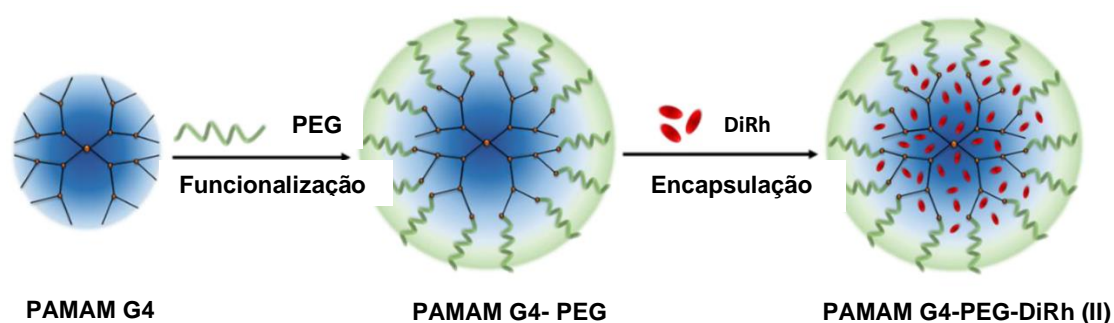


Fig. 3.10 - Esquema representativo da funcionalização da superfície do PAMAM pelo PEG. Figura adaptada da referência [92].

## Capítulo 4

### Procedimentos Experimentais

O complexo de Tetrakis-Acetato de DiRódio (II) (DIRh(II)) e as nanopartículas de magnetita funcionalizadas com ATPS (MAP) e os sistemas nanoestruturados MAPP (sistema MAP funcionalizado com dendrímeros PAMAM e PEG), MAPPRh (nanopartículas MAPP complexado com DIRh(II)) foram sintetizados na Universidade Federal de Goiás. Os testes biológicos foram realizados na Universidade de Brasília.

As caracterizações morfológicas, estruturais e magnéticas foram realizadas na Universidade Federal de Goiás (MET e RMN) e na Universidade de Brasília (Raman, FTIR, UV-Vis e magnetização)

#### 4.1 - Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho são de grau analítico e foram utilizados como adquiridos, sem purificação. O cloreto de ferro (II) tetrahidratado  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (99%) e o cloreto de ferro (III) hexahidratado,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (97%-100%) utilizados como precursores da nanomagnetita foram adquiridos da Acros Organisc e Vertec respectivamente, a solução de amônia 28-30% foi adquirida da Merck Millipore. Os reagentes PAMAM G4 (99,8%), o 3-Aminopropiltriétoxisilano (APTS) (99,7%), utilizado para funcionalizar a magnetita, O cloreto de ródio III Trihidratato, utilizado como precursor do Tetrakis-Acetato de Diródio (II), os monomeros etilenodiamina  $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2$  (99,7%) e acrilato de metila  $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$  (98,9%), utilizados na síntese do PAMAM G1, G2, G3 e G4 e o Polietileno glicol (PEG) utilizado para funcionalizar a nanomagnetita-APTS-PAMAM foram adquiridos a partir da Sigma-Aldrich (Br), anticorpo trastuzumab, Zedora 150mg pó liofilizado, lote; BF18006737, adquirido junto a Nova Comercio de medicamentos

especiais LTD, SP . Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram registrados no solvente indicado no espectrômetro BrukerAvance III 500.13 MHz.

## **4.2 - Amostras**

### **4.2.1 - Síntese do complexo Tetrakis-Acetato de DiRódio (II) $[\text{Rh}_2 (\text{O}_2\text{CCH}_3)_4 2\text{H}_2\text{O}]$ .**

A uma massa de  $\text{RhCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (4.3 g, 16 mmol) foram adicionados 80 mL de etanol com agitação manual até completa dissolução do sal. Esta solução foi misturada com outra solução de acetato de sódio (4.9 g, 60 mmol) dissolvida em 80 mL de ácido acético glacial. O sistema foi aquecido sob refluxo por 2 horas sob agitação magnética. A formação do complexo pôde ser evidenciada pela coloração do meio à qual mudou de vermelho-vinho para verde escuro e a formação de um precipitado. A mistura foi filtrada em um funil de placa porosa N° 4 e recristalizado utilizando metanol. O solvente foi aquecido até redução de 2/3 do volume, resfriado à temperatura ambiente e o béquer colocado no freezer por 12 horas. Os cristais verdes foram coletados, lavados 3 vezes com metanol gelado e secos na estufa a  $80^\circ\text{C}$  por 16 horas. Rendimento: 1,1 g (2.5 mmol), 31.3%. [23].

### **4.2.2 - Síntese das Nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) funcionalizadas com ATPS –**

#### **Amostras MAP**

As nanopartículas de magnetita foram sintetizadas pelo método de coprecipitação em meio alcalino dos íons de Fe (II) e Fe (III) [93],[94]. Em um balão de fundo redondo (1000mL), em atmosfera de argônio, acoplado a um agitador mecânico, dissolveu-se 6.80g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e 2,50g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (proporção de  $2,72\text{Fe}^{3+}:1\text{Fe}^{2+}$ ) em 600 mL de água deionizada tipo Milli-Q, e gotejou-se lentamente uma solução de amônia 28%, com agitação mecânica de 1200 rpm, em temperatura ambiente, até o pH 12. Manteve-se a

agitação por mais 30 minutos, em seguida, as nanopartículas de magnetita foram separadas magneticamente e lavadas três vezes com água e etanol e secas em vácuo a temperatura ambiente por dois dias.

Para o revestimento das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com APTS e metacrilato, 2,0 g de nanopartículas secas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foi dispersada em 100 ml de uma mistura de etanol e água de Milli-Q ( $[\text{Fe}] = 0,0862 \text{ mol/L}$ ), na proporção de 4:1 respectivamente, sendo em seguida, sonificada por 30 minutos. Depois do qual acrescentou-se APTS em excesso (8mL) e o sistema foi aquecido à  $80^\circ\text{C}$  e finalmente agitado por 48 horas. Terminado o tempo o sistema foi deixado em repouso até resfriar-se a temperatura ambiente, após o qual foi lavado três vezes com metanol e seco por 24 horas em temperatura ambiente. As amostras obtidas nesta fase foram denominadas MAP.

#### **4.2.3 – Funcionalização das amostra MAP com o dendrímero PAMAM – Amostras MAPP.**

Para a funcionalização com o dendrímero PAMAM, pesou-se 1,6g de nanopartícula de magnetita funcionalizada com APTS (MAP) e suspendeu-se em 40 mL de metanol anidro sob sonicação por 30 minutos. Em seguida adicionou-se 4 mL de acrilato de metila, e deixou-se o sistema sobre agitação a  $50^\circ\text{C}$  por uma semana. Em seguida, as nanopartículas, foram separadas magneticamente e lavadas três vezes com metanol anidro e posteriormente secadas a temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida, 1,4g de nanopartícula de magnetita funcionalizada com APTS e metilacrilato e suspendeu-se em 60 mL de metanol anidro, sendo o sistema, sonificado por 30 minutos. Em seguida adicionou-se 5 mL de etilenodiamina, e em seguida a solução foi agitado por 24 horas a temperatura ambiente. Logo após, o sistema foi deixado sob agitação a  $50^\circ\text{C}$  por uma semana, proporcionando a formação da primeira geração do dendrímero PAMAM (G1).

As NPMs revestidas com PAMAM (G1) foram separadas magneticamente e lavadas três vezes com metanol anidro antes de secar por 24 h à temperatura ambiente. Uma série de gerações do PAMAM (G2, G3 e G4) foi preparada seguindo o mesmo procedimento; usando 50 vezes o excesso de volume de metil acrilato nas etapas G1.5, G2.5 e G3.5 e 125 vezes o excesso de volume de etilenodiamina em relação à quantidade de grupos amino nas etapas G2, G3 e G4 (amostra MAP) [93],[94]. Em uma segunda etapa, 0,5 g das NPMs revestidas com PAMAM (G4) foram suspensas em 100 mL de metanol seco e agitadas à temperatura ambiente durante 40 min. Em seguida, 6 g de PEG dimetil éster foram adicionados e a mistura foi agitada por duas semanas a 60 °C para formar ligações amida entre os grupos amina primária ( $-NH_2$ ) de PAMAM e o grupo éster de PEG dimetil éster. Finalmente, o produto resultante (amostra MAPP) foi separado magneticamente e lavado três vezes com metanol e depois deixado para secar em baixo vácuo [26]. Em seguida, 25 mg de amostras de MAPP foram suspensas em 100mL de água Milli-Q para a solução estoque por sonicação ( $2,5 \times 10^{-2}$  g/mol - pH= 5,6) (Sol. 1)

#### **4.2.4 - Imobilização do complexo $[Rh_2(O_2CCH_3)_4]$ nas amostras MAPP – Amostras MAPPRh.**

A imobilização de DiRh(II) na amostra de MAPP foi realizada primeiramente dissolvendo 25 mg de DiRh(II) em 50 mL de água Milli-Q para a solução estoque (1,0 mmol) (Sol.2). Em seguida, foram retirados 1800  $\mu$ L da solução estoque de MAPP (Sol.1), que foi adicionado juntamente com 1800  $\mu$ L da solução Sol. 2, em Erlenmeyer contendo 50 mL de água Milli-Q, em seguida deixado em agitação em mesa Shaker a 37° por 12 horas.

Para comparação um sistema similar ao sistema MAPPRh, contudo este sem a presença de nanopartículas de magnética, foi produzido e utilizado nos ensaios biológicos (PPDiRh).

### **4.3 – Experimentos biológicos *in vitro*.**

#### **4.3.1 - Linhagens de células utilizadas nos testes *in vitro*.**

No estudo *in vitro*, utilizou-se de células de adenocarcinoma mamário murino (4T1) e células de adenocarcinoma humano mamário (MCF7). As células MCF7 são células de câncer de mama responsivas a estrógenos, as células dessa linhagem são originárias de efusão pleural de carcinoma ductal invasivo [95]. Já as células da linhagem 4T1, são células de adenocarcinoma mamário derivado de tumor de camundongos BALB/c, e é um ótimo modelo para realizar estudos comparativos *in vitro* e *in vivo*, uma vez que pode ser cultivado *in vitro* e é facilmente transplantável *in vivo* [96]. Desta maneira, essas duas linhagens 4T1 e MCF7 foram escolhidas para comparação nesse estudo.

#### **4.3.2 - Internalização dos sistemas MAPP e MAPPRh em células 4T1 e MCF7**

As células 4T1 e MCF7 foram cultivadas por 24 h a uma concentração inicial de  $5 \times 10^4$  células por poço em microplaca de 24 poços. Em seguida o meio celular foi removido e 1 mL dos sistemas MAPP, MAPPRh (nas concentrações de 20 mM de Fe) conjugadas com um marcador fluorescente foi adicionado. Após 15 minutos o meio contendo as nanopartículas foi descartado e as células foram lavadas com PBS. Para estudar o efeito das nanopartículas magnéticas nos ensaios biológicos o complexo de DiRh(II) foram complexados com nanopartículas de PAMAM (sem nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (amostra PPDiRh). A teor de DiRh(II) nas amostras MAPPRh e PPDiRh forma de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Após a incubação dos sistemas com os marcadores foram fixadas com álcool 70% em

temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida as células tiveram o núcleo marcado com DAPI (4',6-diamidino-e-fenilindol) e as imagens da internalização foram obtidas utilizando o microscópio de fluorescência EVOS.

### 4.3.3 - Viabilidade Celular

Todos os testes de viabilidade celular foram feitos utilizando o método de avaliação colorimétrica de brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), descrita por Mosmann (1983) [97]. Após os tratamentos propostos, as células foram expostas à solução de MTT em meio de cultivo. Essa solução em células viáveis interage com as desidrogenases mitocondriais como a succinil desidrogenase, promovendo a redução do reagente MTT a um composto denominado formazan, caracterizado pela coloração púrpura e pela insolubilidade em meios hidrofílicos. A viabilidade celular é indicada pela quantificação da produção de cristais de formazan de acordo com a presença de desidrogenases ativas. A partir da medida do espectro de absorvância com comprimento de onda de 595 nm, obtido em espectrofotômetro conjugado à leitora de microplacas, a produção de formazan foi quantificada e, portanto, determinada a viabilidade celular

As células 4T1 e MCF7 foram cultivadas por 24 h a uma concentração inicial de  $1 \times 10^4$  células por poço em placa de cultura com 24 poços e mantidas durante a noite em incubadora com atmosfera úmida (80%) a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os sistemas nanoestruturados MAPPRh, PPDiRh (ausência partículas de magnetita) e soluções de DiRh(II) livre com concentrações variando de 0 - 50 µM – referente ao DiRh(II) foi adicionado. Para efeito de comparação, o sistema MAPP (ausência de DiRh(II)) também foi testado. A concentração do sistema MAPP foi calculado de modo a manter o teor de Fe das nanopartículas de magnética equivalente ao encontrado para a amostra MAPPRh (20 mM de ferro). Em seguida, as células foram mantidas em incubadora. Após o tempo de

incubação com os tratamentos supracitados, as células foram lavadas com PBS e sua viabilidade foi medida pelo método colorimétrico MTT descrito na referência [97].

#### **4.3.4 - Avaliação do perfil da via de morte desencadeada pelos sistemas MAPP e MAPPRh em células 4T1 e MPF7**

A verificação das vias morte das células 4T1 e MCF7 após tratamento com os sistemas MAPPRh e PPDiRh foi realizado de acordo com um protocolo descrito na literatura [98]. Os ensaios envolvendo os experimentos de via de morte foram realizados com concentrações dos sistemas MAPPRh e PPDiRh iguais 50  $\mu$ M.

Para detecção e quantificação do número de células em processo de apoptose ou necrose, foi realizada a avaliação do perfil de marcação para alaranjado de acridina e iodeto de propídeo AO/PI descrita na referência [99]. Desta forma, as imagens foram obtidas e a avaliação foi realizada em relação as cores referentes à marcação, sendo: contagem de células verdes (viáveis), contagem de células amarelas/laranjas (apoptose) e contagem de células vermelhas (necrose). O marcador AO faz marcação tanto de células viáveis quanto de células mortas, já o marcador PI cora apenas células mortas, ou seja, que perdeu a integridade da membrana. Neste contexto, as formas de identificação foram divididas em três estágios representados na Fig. 4.1, sendo:

- (A) - Célula viável – marcação em verde uniforme tanto o núcleo quanto citoplasma;
- (B) - Célula em apoptose – membrana plasmática parcialmente degradada, o que permite a entrada do PI. Formação de corpos apoptóticos com a fragmentação e a condensação da cromatina (seta branca). As células apresentam uma coloração alaranjada.
- (C) - Células necróticas – a célula fica uniformemente marcada de vermelho, isso se dá pela alteração na membrana que permite a entrada do PI.



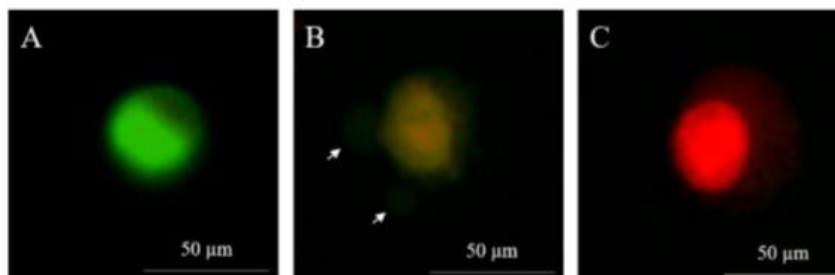


Fig. 4.1: Fotomicrografia das células da linhagem 4T1 marcadas com alaranjado de acridina (AO) e iodeto de propídeo (PI) analisadas em microscópio de fluorescência EVOS. A) célula viável; B) célula apoptótica (as setas indicam a formação dos corpos apoptóticos); e C) célula necrótica. Figura adaptada da referência [100] .

#### 4.3.5 – Testes Estatísticos

Os dados foram avaliados por meio de estatística paramétrica ou não paramétrica de acordo com a distribuição da normalidade. Para os dados paramétricos foi realizada ANOVA (análise de Variância) seguido do teste Tukey-Kramer.

### 4.4 – Caracterização Morfológica, Estrutural e Magnética

#### 4.4.1 - Difratometria de raio-X.

O difratograma de Difração de Raios X (DRX) foram obtidos pelo método do pó em um equipamento Shimadzu modelo XRD 6000 utilizando a radiação Cu-K Cu ( $\lambda = 1,54056$  Å), 40 KV e 30 mA. Os difratogramas foram obtidos na configuração  $\theta - 2\theta$  no intervalo de  $10^\circ - 80^\circ$  com um passo de  $0,05^\circ$  e com uma velocidade de varredura de  $0,5^\circ$  por minuto.

#### 4.4.2 – Microscopia Eletronica de Transmissão

A morfologia das nanopartículas foi avaliada por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e TEM de alta resolução (HRTEM) em um microscópio JEOL, modelo JEM-2100, equipado com acessório EDS, operado a 200 kV.

#### 4.4.3 – Diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta.

Os diâmetro hidrodinâmico ( $D_{DLS}$ ) e o potencial zeta ( $\zeta$ ) dos sistemas MAP, MAPP e MAPPRh e DIRh(II) livre foram avaliados em suspensões coloidais por meio de espalhamento de luz dinâmico (DLS), em um equipamento Zetasizer Nano- ZS® ZEN3600 (Malvern Instruments, UK). O potencial zeta foi calculado pela equação de Henry (Eq. 4.1).

$$\zeta = \frac{U_E 3\eta}{2\epsilon_d f(Ka)} \quad (4.1)$$

Em que  $\zeta$  é o potencial zeta,  $U_E$  é a mobilidade eletroforética,  $\eta$  é a viscosidade,  $\epsilon_d$  é a constante dielétrica do dispersante e  $f(ka)$  é a função de Henry. Foi utilizado o valor de 1,5 conforme aproximação de Smoluchowski. [101][148]

Os diâmetros hidrodinâmicos das NPs nas dispersões coloidais foram calculados por meio da equação de Stokes-Einstein (Eq. 4.2).

$$D_{DLS} = \frac{K_B T}{3\pi\eta D} \quad (4.2)$$

onde  $D_{DLS}$  é o diâmetro hidrodinâmico,  $D$  é o coeficiente de difusão translacional,  $K_B$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura absoluta e  $\eta$  é a viscosidade do meio de dispersão. As medidas foram realizadas em triplicatas a 25°C.

#### 4.4.4 – Espectroscopia de absorção óptica (OA) na região do UV-Vis e na Região do infravermelho médio (FTIR)

Os espectros de absorção óptica (OA) foram realizados em suspensões coloidais por meio de espectrômetro UV-Vis-NIR de feixe duplo (Shimadzu UV 2600). Os espectros de

Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foram realizados em um espectrômetro Vertex 70 modelos (Bruker). Para as medidas de FTIR amostras previamente secas em vácuo a temperatura ambiente em seguida foram maceradas com KBr seco e limpo (1%), originando pastilhas de KBr. Os espectros de infravermelho, foram obtidos na região de 4000 – 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , via análise média de 96 scans.

#### **4.4.5 – Espectroscopia Raman**

Os espectros Raman foram registrados com um espectrômetro Horiba LabRAM Evolution® à temperatura ambiente usando excitação de laser  $\lambda = 532 \text{ nm}$  (3 mW) focada nas amostras por um microscópio OLYMPUS com uma objetiva de 50  $\times$ . Para as medidas as amostras foram previamente secas em vácuo a temperatura ambiente.

#### **4.4.5 – Medidas de Magnetização**

A caracterização magnética foi realizada utilizando um magnetômetro comercial Superconducting Quantum Interference Device (SQUID) (Quantum Design, modelo MPMS3). Ciclos de histerese com campo magnético de até  $\pm 70 \text{ kOe}$  mais curvas refrigeradas a campo zero (ZFC) e refrigeradas a campo (FC) foram registradas na faixa de temperatura de 5 a 300 K.

#### **4.4.6 – Espectroscopia de Ressonancia Magnética Nuclear**

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram obtidos no Laboratório de RMN do IQ-UFG utilizando um espectrômetro Bruker Avance III 500 de 11,75 T (500,13 MHz para o  $^1\text{H}$ ), em uma sonda BBI para análises em solução, de 5 mm com gradiente de campo na direção z. Os espectros foram realizados em triplicata, a 25°C. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram registrados em uma janela de 20 ppm com 64K de pontos, utilizando como solvente água deuterada.

## Capítulo - 5

### Resultados e Discussão.

#### 5.1 - Caracterização Morfológica e estrutural das amostras

##### 5.1.1 - Difração de Raios X

Os padrões de difração de Raios X (DRX) das amostras de MAP, MAPP e MAPPRh são mostrados na Fig. 5.1. Como observado, os picos de difração são identificados com os planos de reflexões de Bragg (111), (220), (311), (400), (422), (511), (440), (620) e (533) da fase espinélio  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de acordo com (JCPDF card nº 39-0315). Nenhum pico extra nos padrões de DRX foi identificado, sugerindo a ausência de fases secundárias. A constante de rede  $a = 8,352 \text{ \AA}$  foi determinada para todas as amostras. Quando comparada com o valor da magnetita *bulk* ( $8,396 \text{ \AA}$ ) o valor baixo obtido sugere a existência da fase maghemita nas amostras sintetizadas. No entanto, a consistência das constantes de rede avaliadas indica que a presença de PAMAM ou DiRh(II)@PAMAM respectivamente, nas amostras MAP ou MAPP, afetam minimamente o parâmetro estrutural. O Diâmetro médio do cristalito ( $D_{\text{XRD}}$ ), calculado usando a equação de Scherrer [102], para amostras MAP, MAPP e MAPPRh, foi estimado como  $D_{\text{XDR}} = 9,5 \pm 0,3 \text{ nm}$ .

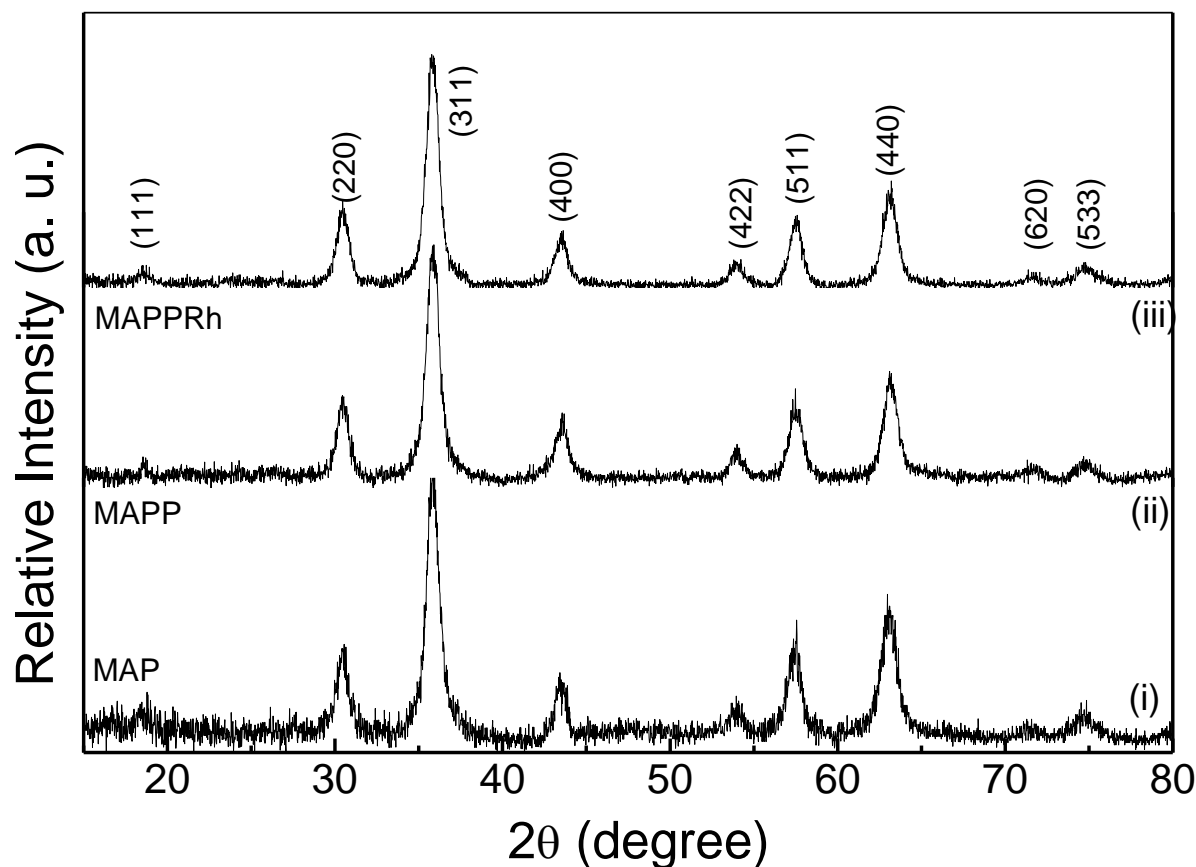


Figura 5.1 - Padrões de difração de raios X das amostras (i), (ii), (ii).

As distribuições de tamanho de partícula das amostras MAP, MAPP e MAPPRh também foram investigadas usando espalhamento dinâmico de luz (DLS). A partir dos experimentos DLS, os seguintes valores de diâmetro médio ( $D_{DLS}$ ) foram obtidos:  $11 \pm 2$  nm,  $265 \pm 100$  nm e  $820 \pm 100$  nm para as amostras MAP, MAPP e MAPPRh, respectivamente. Os potenciais zeta medidos ( $\xi$ ) foram zero para amostras MAP e MAPPRh e  $65 \pm 10$  mV para amostra MAPP. Observe que o valor  $D_{DLS}$  da amostra MAP está próximo dos valores  $D_{DRX}$  e  $D_{TEM}$ , este último mostrado na Fig. 5.2 (c). O valor de  $D_{DLS}$  obtido para a amostra MAPP é consistente com o valor relatado por Pourjavadi et al, que estudaram um sistema semelhante [94]. Comparado com a amostra MAP, o aumento do valor do potencial zeta para a amostra MAPP não apenas revela que o PAMAM foi

carregado com sucesso na superfície do MAP, mas também suporta a imagem de que as porções de amina dos dendrímeros do PAMAM estão apontando para o meio aquoso [103].

### 5.1.2 - Microscopia eletrônica de alta resolução

A caracterização das amostras quanto a forma e ao diâmetro médio das nanopartículas de magnetitas foi realizada por meio de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). A Figura 5.2 mostra micrografias TEM das amostras MAP (a - b) e MAPRh (d). Imagens TEM da amostra MAP (Fig. 5.3 (a)) mostram nanopartículas com formato quase esférico e formando aglomerados. Uma imagem HRTEM da amostra MAP é mostrada na Fig. 5.2 (b) e revelou distâncias interplanares de 0,295 e 0,252 nm, que correspondem aos planos de difração (220) e (311) da fase espinélio, respectivamente. As micrografias de TEM da amostra MAP foram usadas para construir um histograma de tamanho de partícula, a partir do qual os parâmetros morfológicos foram extraídos (ver Fig. 5.2 (c)). O histograma de tamanho de partícula foi modelado (linha vermelha sólida na Fig. 5.2 (c)) usando uma função de distribuição log-normal, fornecendo um tamanho médio de partícula ( $D_{TEM}$ ) de 9,5 nm e um índice de polidispersão ( $\sigma_{TEM}$ ) de 0,27. O  $D_{TEM}$  extraído é consistente com o tamanho médio de cristalito determinado a partir da análise de dados de XRD, sugerindo assim uma boa cristalinidade das nanopartículas de óxido de ferro.

Levando-se em conta que DiRh (II) é ligeiramente dispersível em água, uma solução aquosa de DiRh(II) (1,0 mmol) também foi examinada por DLS. A partir do experimento DLS com DiRh (II), foi encontrado  $D_{DLS} = 280 \pm 60$  nm. A fim de investigar ainda mais a presença de aglomerados de DiRh(II), como sugerido por medições DLS, foram registradas micrografias TEM e HRTEM da solução DiRh(II), conforme mostrado na Fig. 5.2 (e) e sua inserção, respectivamente. A imagem HRTEM (inserção da Fig. 5.2 (e)) mostra nanopartículas cristalinas de DiRh (II), com formato quase esférico e tamanho

~3 nm, cerca de duas ordens de magnitude menores que o diâmetro médio ( $280 \pm 60$  nm) revelado por a medição DLS. Muito provavelmente, o DLS de DiRh (II), em solução aquosa, está medindo grandes aglomerados formados pelo complexo. A análise EDS foi empregada para investigar a composição química da amostra MAPPRh e da solução DiRh (II), como mostrada nas Figs. 5.2 (f) e (g), respectivamente. Os espectros de EDS revelaram apenas a presença de Fe, Rh e Cu para a amostra MAPPRh (ver Fig. 5.2 (f)) e Rh e Cu para a solução DiRh (II) (ver Fig. 5.2 (g)). Exceto pelo pico relacionado ao cobre (devido à malha de suporte), não há elementos adicionais observados dentro do limite de detecção do instrumento. De fato, os dados EDS indicam fortemente que as nanopartículas magnéticas revestidas com PAMAM foram carregadas com sucesso com DiRh (II) na amostra MAPPRh.



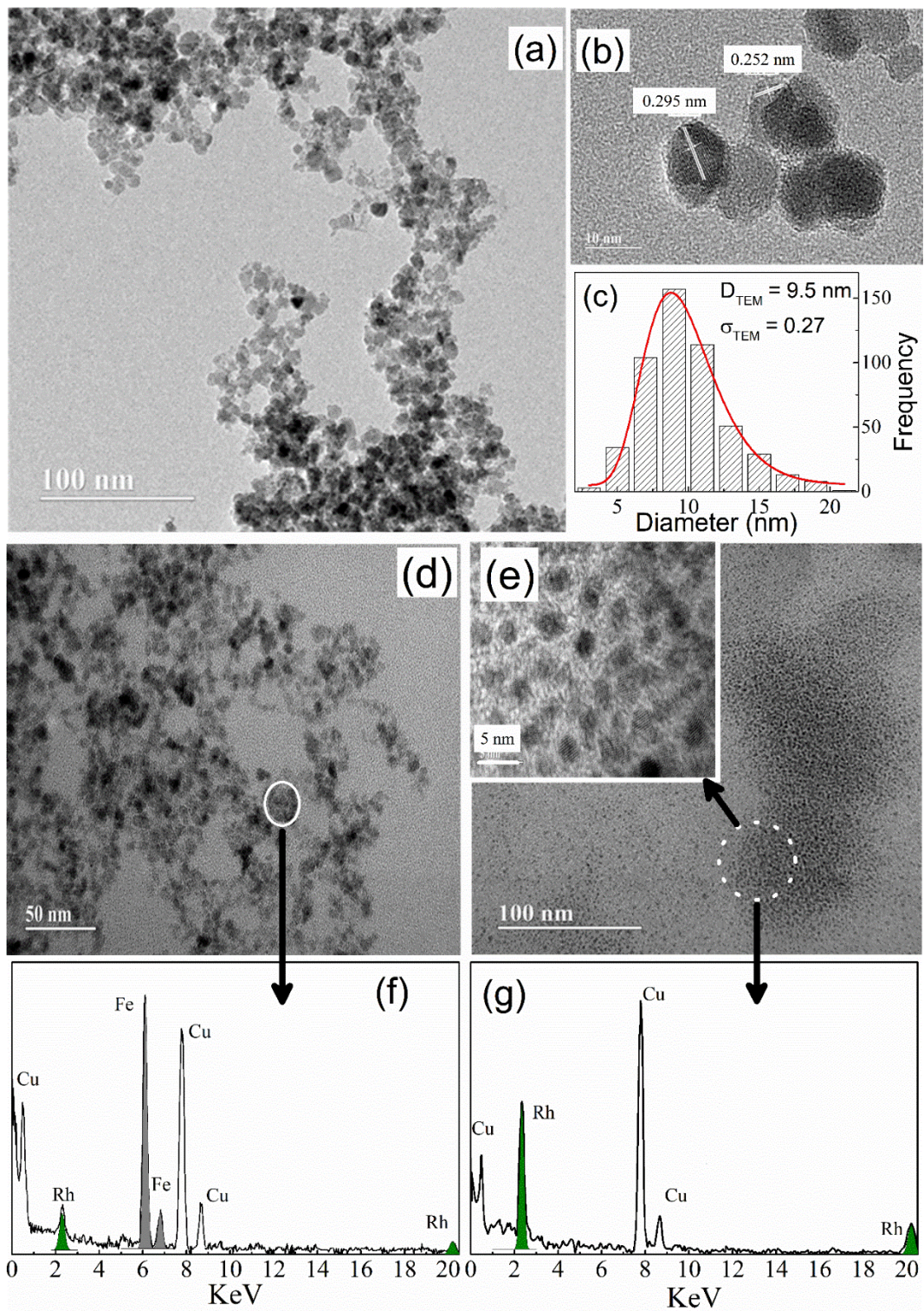


Fig. 5.2 - (a) Imagem TEM da amostra MAP. (b) Imagens HRTEM da amostra MAP. (c) Histograma de tamanho de partícula para a amostra MAP obtida das imagens TEM e o ajuste correspondente (linha sólida vermelha) à função lognormal. (d) imagem TEM da amostra MAPRh e (e) DiRh (II) a amostra foi preparada a partir da dispersão das partículas e seguida medida em vácuo. A inserção em (e) mostra as imagens HRTEM de nanopartículas cristalinas de DiRh (II). Em (f) e (g) são mostrados os espectros EDS da amostra MAPRh e DiRh (II), respectivamente.



### 5.1.3 - Estudo das interações entre o DiRh(II) e o dendrímeros PAMAM

#### 5.1.3.1 - Espectroscopia UV-Vis

O espectro de absorção UV-Vis da solução DiRh (II) (linha sólida azul na Fig. 5.3) mostrou duas bandas características em  $\sim 585$  nm (banda I) e  $\sim 450$  nm (banda II). A banda I foi atribuída à transição  $\pi^* (\text{Rh} - \text{Rh}) \rightarrow \sigma^* (\text{Rh} - \text{Rh}) (5_{eg} \rightarrow 4a_{2u})$ , que é sensível à natureza dos ligantes axiais [104]. Por sua vez, a banda II está relacionada à transferência de carga ligante-metal (LMCT), característica de complexos Rh(II) contendo ligações Rh–Rh. Além do mais, a banda II pode ser atribuída à transição  $\pi^* (\text{Rh} - \text{Rh}) \rightarrow \sigma^* (\text{Rh} - \text{O}) (5_{eg} \rightarrow 4b_{2u})$  e é conhecida por ser insensível a ligantes axiais [104].

O carregamento de DiRh (II) na estrutura MAPP produz uma mudança de cor perceptível de amarelo-esverdeado para marrom-avermelhado claro com a banda I deslocando hipsocrômico de  $\lambda_{\text{max}} \sim 585$  nm para  $\sim 490$  nm. De acordo com relatos na literatura, produtos de coloração azul ou verde geralmente estão relacionados à presença de doadores de oxigênio, vermelho ou violeta estão relacionados à presença de doadores de nitrogênio e bordô ou laranja à presença de doadores de enxofre ou fósforo [45]. Portanto, o deslocamento observado da banda I é provavelmente causado pela estabilização dos níveis de  $\pi^* (\text{Rh} - \text{Rh})$  em DiRh(II) devido à interação do orbital axial da ligação (Rh – Rh) com ligantes doadores de pares de elétrons contendo nitrogênio do núcleo interno da estrutura o dendrímeros PAMAM [105]. Isso significa que a energia orbital  $\pi^* (\text{Rh} - \text{Rh})$  é menor na amostra MAPPRh do que no DiRh (II) livre, levando a uma transição com maior energia, conforme observado nos espectros UV-Vis correspondentes apresentados na Fig. 5.3 (linhas contínuas verde e azul, respectivamente).

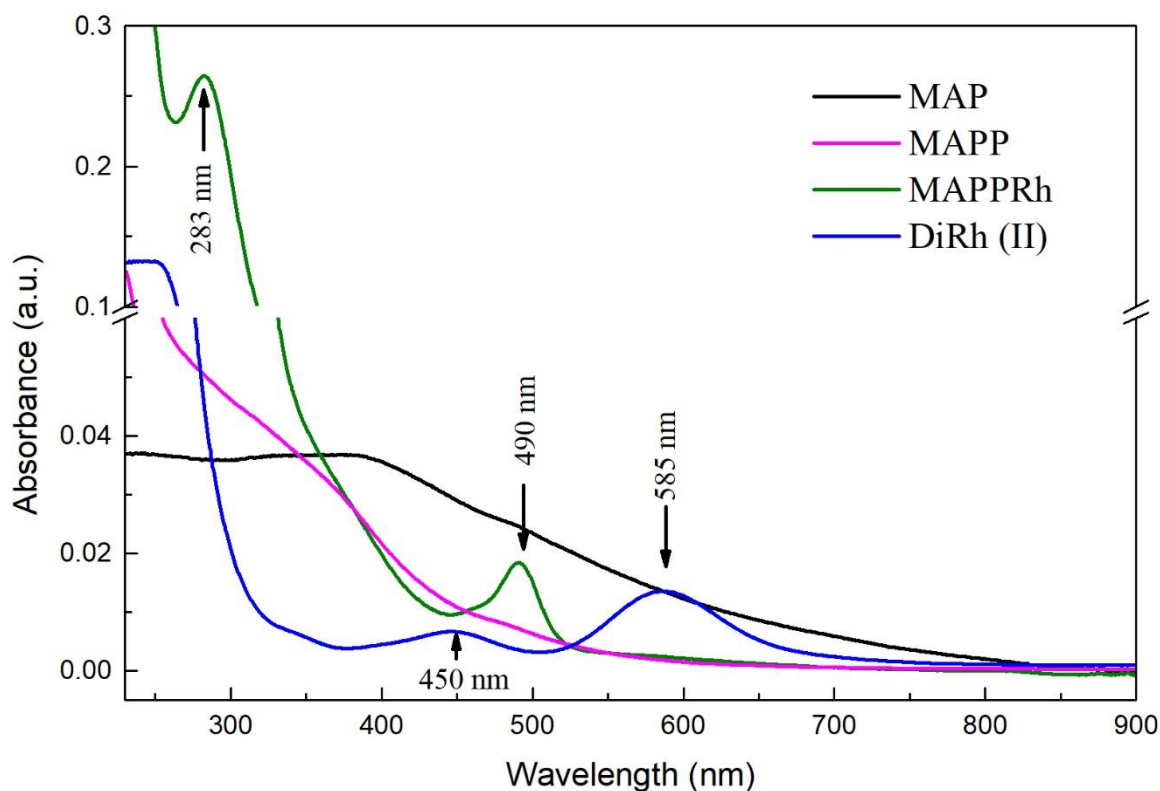


Fig 5.3 - Espectro UV Vis das amostras MAP, MAPP e MAPPRh e solução de DiRh (II).

O pico emergente no espectro UV-Vis da amostra MAPPRh (~283 nm) pode ser explicado levando em consideração a sensibilidade da banda I à natureza dos ligantes axiais. Dubicki e Martin [106] encontraram uma dependência bastante moderada da energia da banda I no parâmetro  $Dq$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) ( $Dq$ : desdobramento da energia do campo cristalino) para ligantes axiais ( $L = \text{I}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NCS}^-$ ,  $\text{NH}_3$ ). Assim, o aparecimento de um pico em ~283 nm é provavelmente devido à transição eletrônica  $\sigma(\text{Rh-L}) \rightarrow \sigma^*(\text{Rh-Rh})$ , onde L está associado ao terminal do dendrímero PAMAM.

### 5.1.3.2 - Espectroscopia FTIR

As interações entre o dendrímero PAMAM e o complexo de DiRh (II), após o revestimento das NPMs de magnetita pelo dendrímero foram examinadas por espectroscopias FTIR, Raman e RMN.

Os espectros de FTIR das amostras MAP (i) e DiRh (II) livres (ii) e MAPP (iii) e MAPPRh (iv) são mostrados na Fig. 5.4. Na parte inferior da Fig. 5.4, é mostrado o espectro da amostra MAP (i), o qual apresenta evidências das bandas dos grupos hidroxilas ligadas à superfície da nanopartícula localizados em torno de 1630 e 3400  $\text{cm}^{-1}$  [107],[108]. As bandas em torno de 440, 585 e 635 são características dos óxidos de ferro. Sendo que as bandas localizadas em torno de 440 e 585  $\text{cm}^{-1}$  podem ser atribuídas aos modos de estiramento das ligações  $\text{Fe}^{3+}\text{-O}^{2-}$ , nos sítios tetraédricos e ligações  $\text{Fe}^{2+}\text{-O}^{2-}$  nos sítios octaédricos, respectivamente [109].

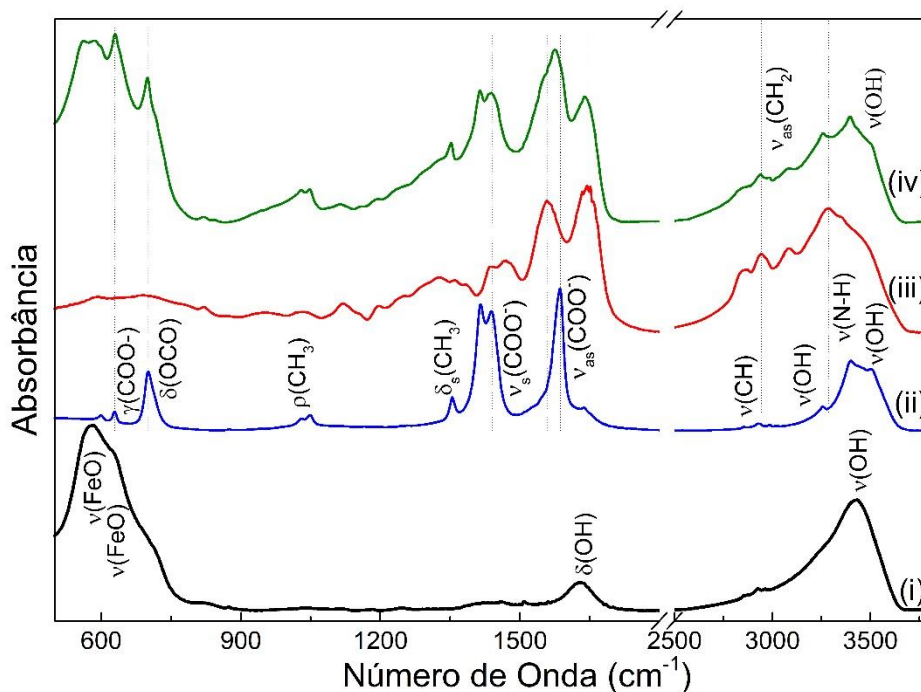


Fig. 5.4 - Espectros de FTIR das nanoestruturas: MAP (i), DiRh (II) livre (ii), MAPP (iii) e amostra MAPPRh (iv).

O espectro de absorção do complexo de DiRh (II) exibe bandas intensas em 1440 e 1585  $\text{cm}^{-1}$ , que podem ser atribuídas aos modos de estiramento simétrico ( $\nu_s$ ) e antissimétrico ( $\nu_{as}$ ) da ligação  $\text{COO}^-$ . Como esperado, a separação ( $\Delta = 145 \text{ cm}^{-1}$ ) entre  $\nu_s(\text{COO}^-)$  e  $\nu_{as}(\text{COO}^-)$  indica a presença de coordenação de ponte bidentada [110]. Em complemento, bandas de absorção associadas a pontes de acetato e grupos metil pode ser observadas. Os modos vibracionais do acetato podem ser encontrados em 603, 628 e 701  $\text{cm}^{-1}$  e na faixa de 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$ . Essas vibrações estão associadas aos modos de alongamento no plano  $\beta(\text{COO}^-)$ , fora do plano  $\gamma(\text{COO}^-)$ , deformações  $\delta(\text{OCO})$  e  $\delta(\text{C} - \text{H})$ , respectivamente. Os modos vibracionais dos grupos metil estão em 1355  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta_s(\text{CH}_3)$ ) e 1415  $\text{cm}^{-1}$  ( $\delta_{as}(\text{CH}_3)$ ). Bandas atribuídas aos modos de estiramento  $\text{O} - \text{H}$  de ligantes axiais de água presentes na posição axial do DiRh(II) são claramente observadas em torno de 3255, 3400 e 3500  $\text{cm}^{-1}$  [111].

O espectro de FTIR da amostra MAPP (ii) na Fig. 5.5 (c), mostra bandas de absorção característicos de PAMAM, com bandas em 1380 ( $\tau$ ), 1440 ( $\delta$ ) e 1470 ( $\rho$ )  $\text{cm}^{-1}$  associados a ligações  $\text{CH}_2$  (torção  $\text{CH}_2$ , deformação e tesoura  $\text{CH}_2$ , respectivamente) e 1561 e 1642  $\text{cm}^{-1}$  atribuídos a amida-II e amida-I, respectivamente. Na região de alta energia (2900 – 3500  $\text{cm}^{-1}$ ) emergem bandas vibracionais de estiramento simétrico e antissimétrico do  $\text{CH}_2$  e  $\text{N} - \text{H}$  em 2850, 2950, 3285 e 3408  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. O pico em 3084  $\text{cm}^{-1}$  está associado à banda harmônica da amida-II [16],[112].

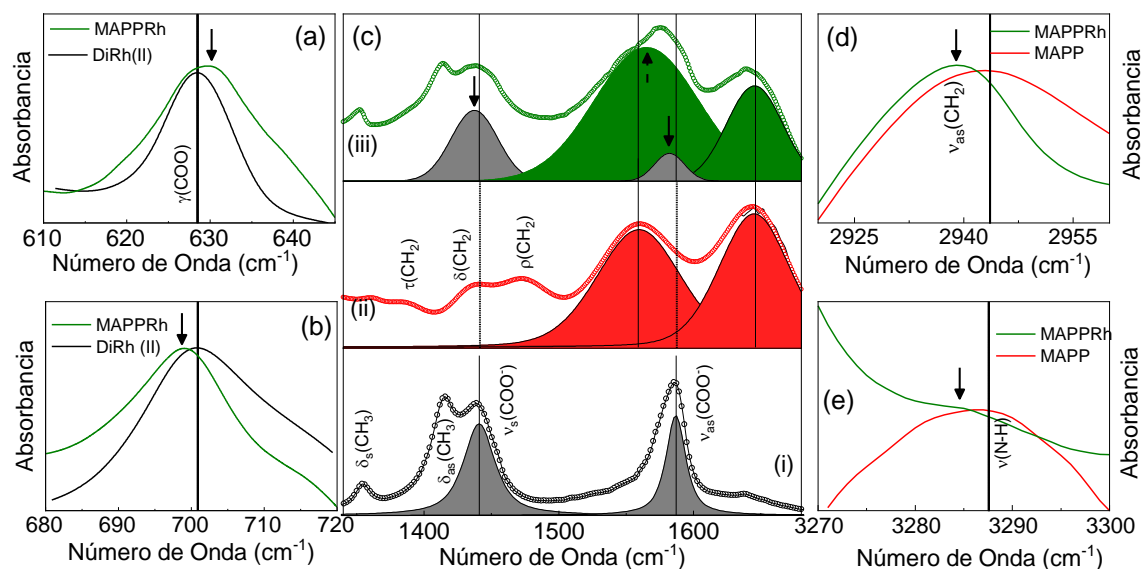


Fig. 5.5 - (a – e) Ampliações dos espectros de FTIR em diferentes faixas espectrais.

Mudanças importantes nos espectros de FTIR são observadas ao carregar o complexo de DiRh(II) no dendrímero PAMAM (veja a Fig. 5.5 (a – e)). Uma comparação entre os espectros de FTIR do DiRh(II) livre (linha sólida preta) e da amostra MAPPRh (linha sólida verde) mostra que as energias vibracionais de todos os modos de acetato são desviados para o menores energias após o carregamento do DiRh(II) nos dendrímeros PAMAM (Fig. 5.4 e 5.5 (c)). O modo fora do plano  $\gamma(\text{COO}^-)$  é exceção (Fig. 5.5 (a)). A tendência de deslocamento para menores energias indica o enfraquecimento das ligações  $\text{O} - \text{C} - \text{O}$  do DiRh(II) após o carregamento nos dendrímeros PAMAM.

Ao comparar os espectros de FTIR da amostra MAPP (linha sólida vermelha – Fig. 5.5) com o da amostra MAPPRh (linha sólida verde – Fig. 5.5), observa-se um desvio para o vermelho dos modos  $\nu(\text{CH}_2)$  e  $\nu(\text{N} - \text{H})$  da amida-I de 2943 para 2939  $\text{cm}^{-1}$  e de 3287 para 3282  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente (ver Fig. 5.5 (d) e (e)). Além do mais, verifica-se também que após o carregamento do DiRh (II) a banda amida-II desloca-se para maior número de onda (1559 para 1565  $\text{cm}^{-1}$ ) enquanto a energia da banda amida-I permanece inalterada

(1645  $\text{cm}^{-1}$ ) (Fig. 5.5 (c)). Observa-se também que a razão de intensidade entre a banda amida-I/amida-II ( $I_V/I_{II}$ ) varia de cerca de 1,0 na amostra MAPP para cerca de 0,4 na amostra MAPPRh.

A banda amida-I ocorre devido aos modos vibracionais  $\nu(\text{C} = \text{O})$ , enquanto a banda amida-II ocorre devido aos modos vibracionais  $\delta(\text{C} - \text{N} - \text{H})$  e  $\nu(\text{C} - \text{N})$  [113]. Mudanças nas energias vibracionais ou nas intensidades dessas bandas estão relacionadas a mudanças nas estruturas secundárias das moléculas. A energia vibracional inalterada da amida-I (ligação dupla de oxigênio) sugere que os íons Rh (II) interagem principalmente com nitrogênio em vez de oxigênio. Esta observação é consistente com a análise de dados UV-Vis e indica que durante o carregamento do DiRh (II) no dendrímero PAMAM, o último atua como um ligante multidentado tridimensional, interagindo com íons Rh (II) por meio de duas ou mais ligações de coordenação de nitrogênio (amida e amina). Mais especificamente, os íons Rh (II) do DiRh (II) interagem com pares de elétrons livres de átomos de nitrogênio em amida-II e amina primária presentes nos grupos terminais dos dendrímeros PAMAM.

### 5.1.3.3 - Espectroscopia Raman

A hipótese reportada acima é apoiada por dados de espectroscopia Raman. Os espectros Raman das amostras MAPP e MAPPRh e do complexo DiRh (II) livre são mostrados na Fig. 5.6 (i) – (iii), respectivamente. O espectro Raman mostrado na Fig. 5.6 (iii) foi registrado após secagem em vácuo de 5 mL de solução DiRh (II) (1,0 mmol), previamente preparada. O espectro Raman da amostra MAPP (Fig. 5.6 (i)) mostra a presença de bandas Raman características em cerca de 200, 310, 490, 585, 675 e 715  $\text{cm}^{-1}$ . As primeiras cinco bandas estão em boas concordância com cinco modos Raman ópticos ativos ( $A_{1g} + E_g + 3T_{2g}$ ) da estrutura espinélio cúbica inversa (grupo espacial  $Fd\bar{3}m$ ) da

fase magnetita [114]. O ombro em  $715\text{ cm}^{-1}$  está relacionado à oxidação parcial de íons Fe (II) em Fe (III) e sugere a presença de fase maghemita, provavelmente na superfície do núcleo de magnetita. Este resultado está em acordo com os dados de DRX avaliados anteriormente.

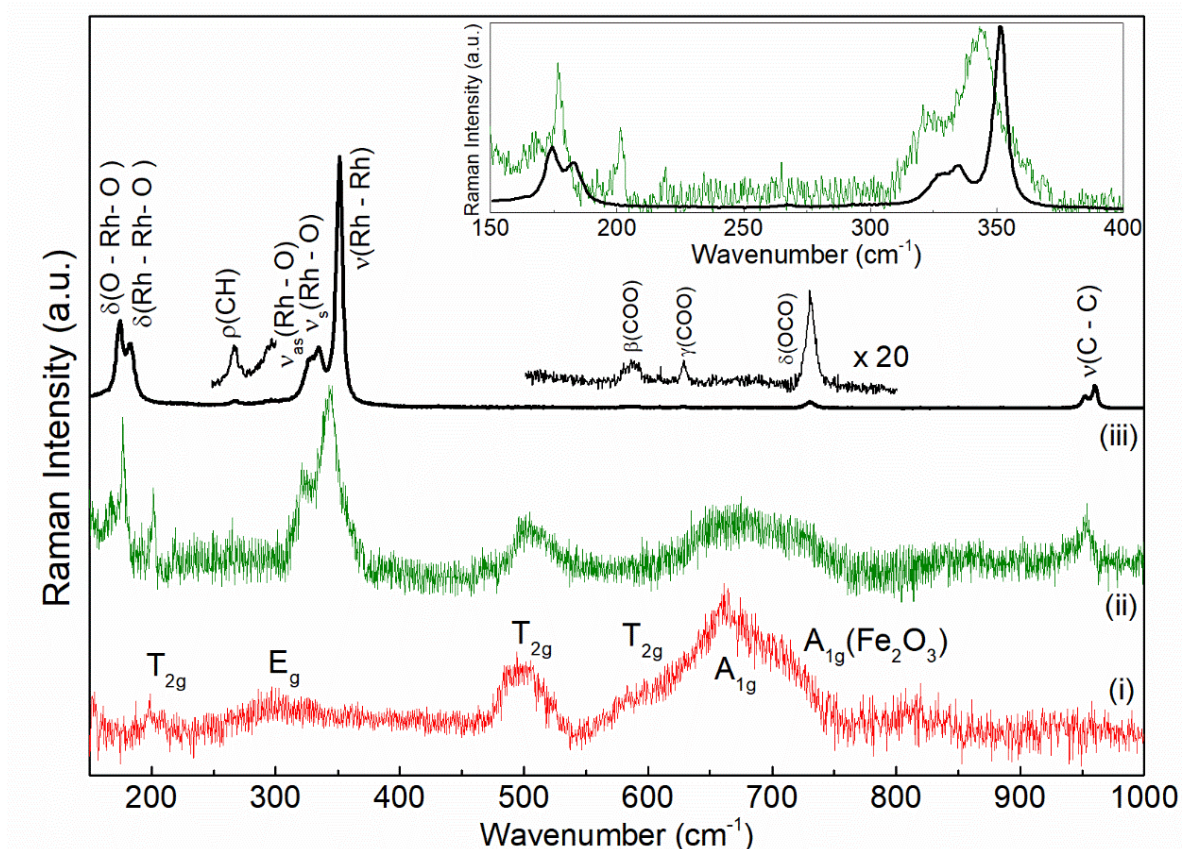


Fig. 5.6 - Espectros Raman das amostras MAPP (i), MAPPRh (ii) e com complexo DiRh (II) livre. A inserção mostra uma ampliação dos espectros Raman da amostra MAPPRh (linha verde) e DiRh (II) livre (linha preta).

O espectro Raman da amostra MAPPRh (Fig. 5.6 (ii)) mostra claramente as bandas Raman correspondentes à fase de óxido de ferro que são picos estreitos e sobrepostos, centrados em torno de 177, 200, 225, 343 e  $950\text{ cm}^{-1}$ . O espectro Raman do DiRh (II) livre na Fig. 5.6 (iii) mostra bandas em torno de 175, 184, 268vw, 328sh, 335, 351, 950 e  $960\text{ cm}^{-1}$ . Bandas mais fracas, também são observadas em torno de 587, 628 e  $731\text{ cm}^{-1}$ , as

quais são atribuídas aos modos no plano, fora do plano e modos de deformação do acetato ( $\delta(\text{OCO})$ ) [45].

Clark e Hempleman mostraram que para DiRh(II) anidro o modo Raman  $\nu(\text{Rh-Rh})$  ocorre em torno de  $355 \text{ cm}^{-1}$ , enquanto os modos  $\nu_{as}(\text{Rh-O})$  e  $\nu_s(\text{Rh-O})$  aparecem em torno de  $331$  e  $338 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente [111]. Por outro lado, verificou-se que a presença do ligante axial (L) no DiRh (II) modifica a energia vibracional do modo  $\nu(\text{Rh-Rh})$ . Nestes casos ele pode ser encontrado na região de  $285 - 320 \text{ cm}^{-1}$ , enquanto os modos vibracionais  $\nu(\text{Rh-O})$  aparecem na região de  $320 - 350 \text{ cm}^{-1}$ . Por exemplo, os espectros Raman dos complexos  $[\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{L})_2]$  (L =  $\text{PPH}_3$ ,  $\text{AsPh}_3$ ,  $\text{SbPh}_3$ ,  $\text{S}(\text{CH}_2\text{Ph})_2$ ) mostraram que as energias vibracionais do modo  $\nu(\text{Rh-Rh})$  podem ser encontradas em torno de  $286$ ,  $297$ ,  $306$  e  $315 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente [115], [116],[117],[118]. Além do mais, foi demonstrado que as energias vibracionais desses modos estão diretamente relacionadas ao comprimento da ligação Rh-Rh, tornando a distância  $d_{\text{Rh-Rh}}$  decrescente de acordo com  $\text{L} = \text{PPH}_3 > \text{AsPh}_3 > \text{SbPh}_3 > \text{S}(\text{CH}_2\text{Ph})_2$  [2,4505, 2,427, 2,421, 2,406 Å], seguindo a expressão  $\bar{\nu}(\text{cm}^{-1}) = 2069 - 729 \times d_{\text{Rh-Rh}}$ , onde  $\bar{\nu}$  é a energia vibracional do modo  $\nu(\text{Rh-Rh})$  e  $d_{\text{Rh-Rh}}$  é a distância Rh-Rh. Este comportamento foi explicado em termos das propriedades das ligações mais fraca dos ligantes axiais, como refletido pelo aumento da distância Rh-L, para L mais pesado [119]. Por esta razão, com a energia vibracional do modo  $\nu(\text{Rh-Rh})$  avaliada para um determinado ligante L, é possível estimar o comprimento da ligação Rh-Rh. Portanto, levando em consideração que os modos  $\nu(\text{Rh-Rh})$  estão localizados em torno de  $351$  e  $343 \text{ cm}^{-1}$  para as amostras DiRh(II) e MAPPRh, respectivamente (ver inserção na Fig. 5.6), é possível estimar que o comprimento da ligação Rh-Rh é da ordem de  $2,36 \text{ \AA}$  para DiRh(II) e  $2,37 \text{ \AA}$  para a amostra MAPPRh. O último valor está dentro da faixa esperada para grupos CN atuando como doadores para átomos metálicos [120]. Assim, o deslocamento para menores energias, observado para o modo  $\nu(\text{Rh-Rh})$ , na amostra



MAPPRh, sugere fortemente que a interação entre o DiRh(II) e os dendrímeros PAMAM, ocorre por meio dos átomos de nitrogênio. O notável alargamento da banda juntamente com seu desvio para o vermelho reflete uma flutuação significativa das forças de ligação Rh-Rh. Este último provavelmente resulta de uma forte desordem nos ligantes axiais no DiRh(II).

#### 5.1.3.4 - Espectroscopia RMN

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) tem sido uma importante ferramenta para caracterizar a natureza das interações entre os grupos funcionais da matriz hospedeira e os diferentes tipos de hóspedes. A atribuição do deslocamento químico de cada próton do composto a ser estudado em comparação com seus constituintes livres pode ser útil para definir a zona de interação entre o hospedeiro e o hóspede. Ao fornecer uma sonda espectroscópica direta das perturbações para grupos funcionais dentro do dendrímero, que estão próximos da nanopartícula encapsulada, a RMN tem sido uma ferramenta importante para caracterizar a estrutura e as propriedades físicas dos dendrímeros [121]. Por exemplo, a RMN foi usada para investigar o grau de PEGuilação do dendrímero PAMAM [122],[123] ou a interação química hospedeiro-hospede o entre PAMAM dendrímeros e ácido micofenólico [121]. A natureza das interações entre grupos funcionais internos do dendrímero PAMAM e íons metálicos também foi investigada [124].

Assim, a fim de investigar a interação molecular e química hospedeiro-hóspede entre o dendrímero PAMAM e o complexo DiRh (II), foi utilizada a espectroscopia de  $^1\text{H}$  RMN (Fig. 5.7). Para maior clareza, a Fig. 5.8 apresenta a representação esquemática proposta para a amostra MAPPRh. A Fig. 5.7 (a - i) apresenta o espectro de  $^1\text{H}$  NMR para o complexo DiRh (II) livre, que mostra sinal característico do grupo metil (pico H) em  $\delta = 1,97$  ppm [125]. Observe que o sinal correspondente do grupo metil do complexo DiRh(II)

após seu carregamento no dendrímero PAMAN (amostra MAPPRh) (Fig 5.8 (a - iii)) muda ligeiramente para campos mais altos ( $\delta = 1,96$  ppm), sugerindo um possível interação entre o complexo DiRh (II) e o dendrímero PAMAN.

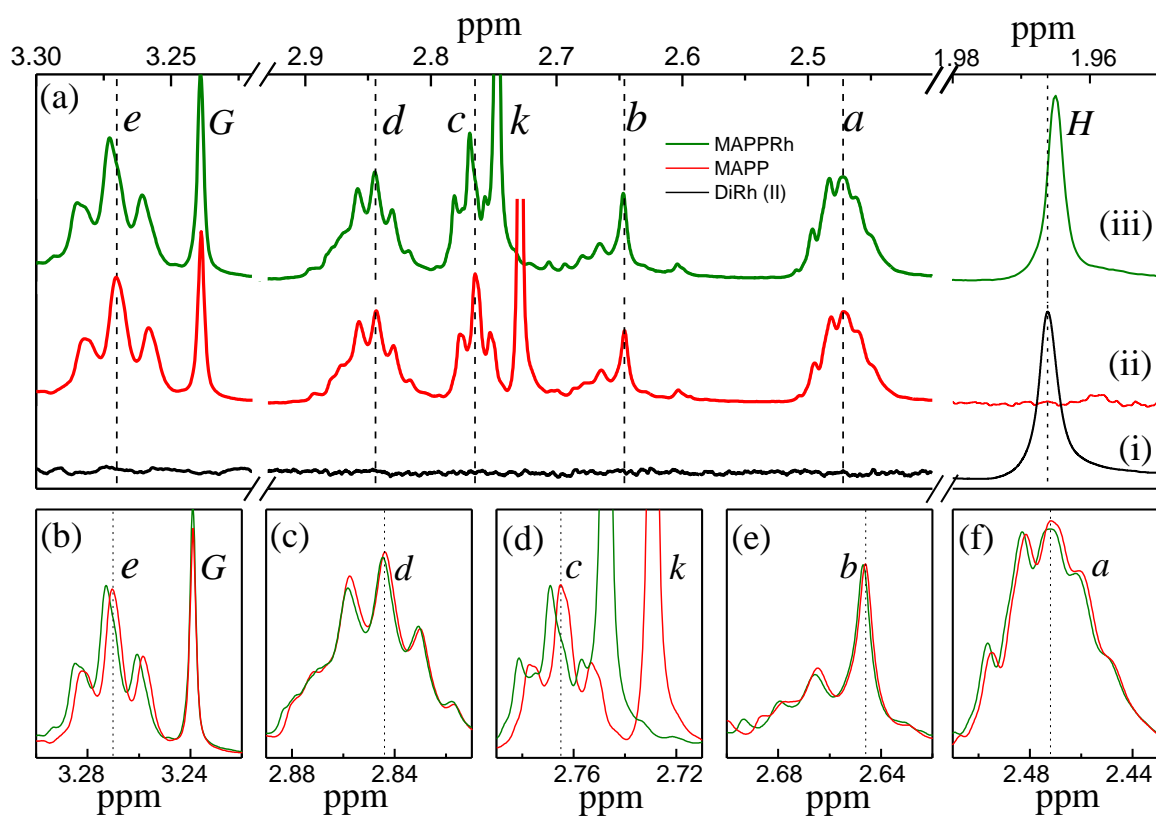


Fig. 5.7 – (a) Espectros de <sup>1</sup>H NMR para o complexo DiRh (II) livre (i) e para os sistemas nanoestruturados MAPP (ii) e MAPPRh (iii). Os painéis (b – f) mostram ampliações em torno dos deslocamentos químicos dos diferentes picos de ressonância.

O espectro de <sup>1</sup>H NMR da amostra MAPP (Fig. 5.7 (a - ii)) mostra sinais característico do PAMAN e do PEG. Os grupos metoxila terminais da cadeia PEG (pico *G*) são encontrados  $\delta = 3,24$  ppm [126]. Os sinais de hidrogênios de metileno PEG que aparecem entre 3,5 – 4,0 ppm, não são mostrados aqui. Estes resultados confirmam a ligação covalente de porções de PEG ao PAMAM [127].

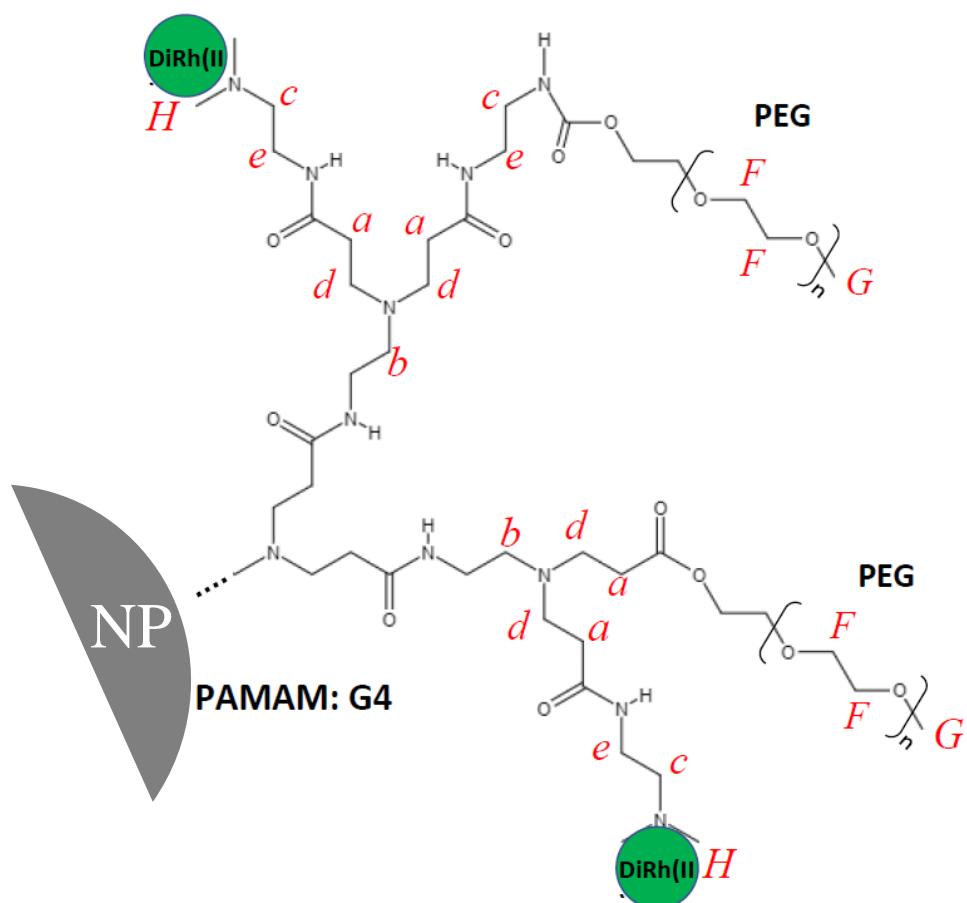


Fig. 5.8 - Representação esquemática proposta para a amostra MAPPRh

Os sinais característicos para os hidrogênios metileno do dendrímero PAMAM aparecem com deslocamentos químicos variando de 2,0 a 3,3 ppm. No espectro de  $^1\text{H}$  RMN do PAMAM existem cinco tripletos (Fig. 5.7 - picos *a*, *b*, *c*, *d* e *e*), atribuíveis ao grupo metileno da cadeia do PAMAM [128]. É também observado um singlete (pico *k*) em  $\delta = 2,73$  ppm, o qual foi atribuído ao grupo metileno do monômero da etilenodiamina residual da síntese [129]. O pico em  $\delta = 2,47$  ppm (pico *a*) corresponde aos hidrogênios de metileno próximos aos grupos carbonila do dendrímero ( $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ ). Picos em  $\delta = 2,65$  e  $2,84$  ppm (picos *b* e *d*) são atribuídos aos hidrogênios de metileno adjacentes à amina terciária pelo lado mais interno ( $-\text{CONHCH}_2\text{CH}_2\text{N}-$ ) e pelo lado mais externo ( $-\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CO}-$ ), respectivamente. Por fim, os picos *c* ( $\delta = 2,76$  ppm) e *e* ( $\delta = 3,27$  ppm) são atribuídos aos

hidrogênios de metileno perto das amidas de superfície (-CONHCH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) e aminas secundárias (-CONHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-), respectivamente [128].

O espectro de <sup>1</sup>H NMR da amostra MAPPRh apresenta picos com características semelhantes aos encontrados para a amostra MAPP. No entanto, observa-se nas ampliações mostradas nos painéis (a - f) da Fig. 5.7, que após o carregamento do complexo DiRh(II) na amostra MAPP os deslocamentos químicos dos tripletos *a*, *b*, *d* e do singlete *G* permanecem constantes (em ppm), enquanto os deslocamentos químicos dos tripletos *c* e *e* sofrem deslocamento para menores campos. A constância do pico *G* é explicada considerando a não interação entre o complexo DiRh(II) e a cadeia de PEG, como esperado. Por outro lado, a constância dos picos *a*, *b* e *d* indica que o complexo DiRh(II) não interage diretamente com grupos carbonila, assim como com a amina terciária do dendrímero.

Os deslocamentos químicos para menores campos, observados para os picos *c* e *e* sugere a existência de dois sítios de interações entre o complexo DiRh(II) e o dendrímero PAMAM. Ou seja, o complexo DiRh(II) interage com o par de elétrons livre dos átomos de nitrogênio da amida II e com as aminas primárias presentes nas porções terminais na superfície das NPs. Confirmando assim, os resultados das espectroscopias UV-Vis, FTIR e Raman.

#### 5.1.4 - Propriedades Magnéticas.

A Fig. 5.9 mostra os ciclos de histerese (magnetização versus campos aplicado) das amostras MAP, MAPP e MAPPRh nas temperaturas de 300 K (a) e 5 K (b). As inserções da Fig. 5.9 (a) e (b) mostram uma visão ampliada das curvas de histerese em uma janela mais estreita de campo aplicado (*M* x *H*), ao redor da origem. O comportamento de *M* x *H* mostrado nas Fig. 5.9 (a) e (b) sugere que todas as amostras apresentam comportamento

superparamagnético a 300 K e bloqueada a 5 K. Os parâmetros magnéticos extraídos estão resumidos na Tabela I. Observa-se que a magnetização remanescente ( $M_r$ ) da amostra MAP é 50% maior que  $M_r$  das amostras MAPP e MAPPRh. Enquanto isso, o campo coercitivo ( $H_c$ ) da amostra MAPPRh é cerca de duas vezes maior que o  $H_c$  das amostras MAPP e MAPPRh. A magnetização de saturação da amostra MAP é de cerca de 92 emu/g a 5 K, o que é consistente com o valor esperado para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  na forma *bulk* ( $M_S = 92$  emu/g) [130]. A 5 K, os valores de  $M_S$  das amostras MAPP e MAPPRh são 71 e 65 emu/g, respectivamente. Valores reduzidos de  $M_S$  nas amostras MAPP e MAPPRh, a 5 K, são devidos à presença de componentes não magnéticos de PAMAM e DiRh(II)@PAMAM, respectivamente. Além disso, observa-se que, enquanto as curvas de magnetização das amostras MAP e MAPP se aproximam rapidamente da saturação, a amostra MAPPRh apresenta uma tendência mais lenta à saturação, conforme mostrado nas Figs. 5.9 (a) e (b).

Levando-se em conta que no estado superparamagnético (300 K) a resposta magnética do sistema é a soma de cada monodomínio magnético (todos os spins apontando na mesma direção), cada nanopartícula possuindo um momento magnético ( $\mu$ ), a magnetização média ( $M$ ) de um conjunto de grãos superparamagnéticos sob a ação de um campo magnético ( $H$ ) pode ser descrito por:

$$\langle M \rangle = \int_0^\infty \mu L(x) f(\mu) d\mu \quad (5.1)$$

onde  $L(x) = \coth(x) - 1/x$  é a função de Langevin de primeira ordem,  $x = \mu H/k_B T$  e  $\mu = M_S V = M_S \frac{4\pi}{3} \left(\frac{d_m}{2}\right)^3$ .  $M_S$  é a magnetização de saturação e  $d_m$  é o diâmetro da partícula magnética, assumida como esférica. É bem conhecido que em amostras reais o tamanho da partícula ( $d_m$ ) segue uma função de distribuição. Da mesma forma, o momento magnético

segue uma função de distribuição. As imagens de microscopia eletrônica indicam que a distribuição de tamanho em sistemas granulares geralmente segue uma função de distribuição log-normal. Portanto, para realizar os cálculos, conforme indicado na Eq. (5.1), onde foi utilizada a distribuição log-normal dos valores de  $\mu$  [131].

$$f(\mu) = \frac{1}{\mu\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{\ln^2(\mu/\mu_o)}{2\sigma^2}\right) \quad (5.2)$$

onde  $\mu_o$  e  $\sigma$  são, respectivamente, a mediana e a largura da distribuição log-normal, que pode ser obtida por meio de ajustes apropriados das curvas experimentais. As linhas sólidas, mostradas na Fig. 5.9 (a), são ajustes das curvas de magnetização a 300 K usando as Eqs. 5.1 e 5.2. A 300 K, ocorre uma semelhança muito boa entre conjuntos de dados experimentais e calculados para as amostras MAP, MAPP e MAPPRh com parâmetros  $\mu_o = 19800\mu_B$  ( $\sigma = 1,83$ ),  $17200\mu_B$  ( $\sigma = 1,84$ ) e  $4200\mu_B$  ( $\sigma = 1,87$ ), respectivamente. A inserção da Fig. 5.9 (a), no lado superior esquerdo, mostra as funções de distribuição log-normal ( $f(\mu)$ ) dos momentos magnéticos obtidos a partir das curvas de magnetização ajustadas.

A diferença significativa nos perfis de distribuição de momento magnético (amostra MAPPRh versus amostras MAP e MAPP) mostrados na Fig. 5.9 (a) indica claramente que o tamanho médio da partícula associado à amostra MAPPRh é menor do que os tamanhos médios da partícula determinados para amostras MAP e MAPP. Como consequência, para a amostra MAPPRh a curva  $M \times H$  tende à saturação mais lentamente do que para as amostras MAP e MAPP.

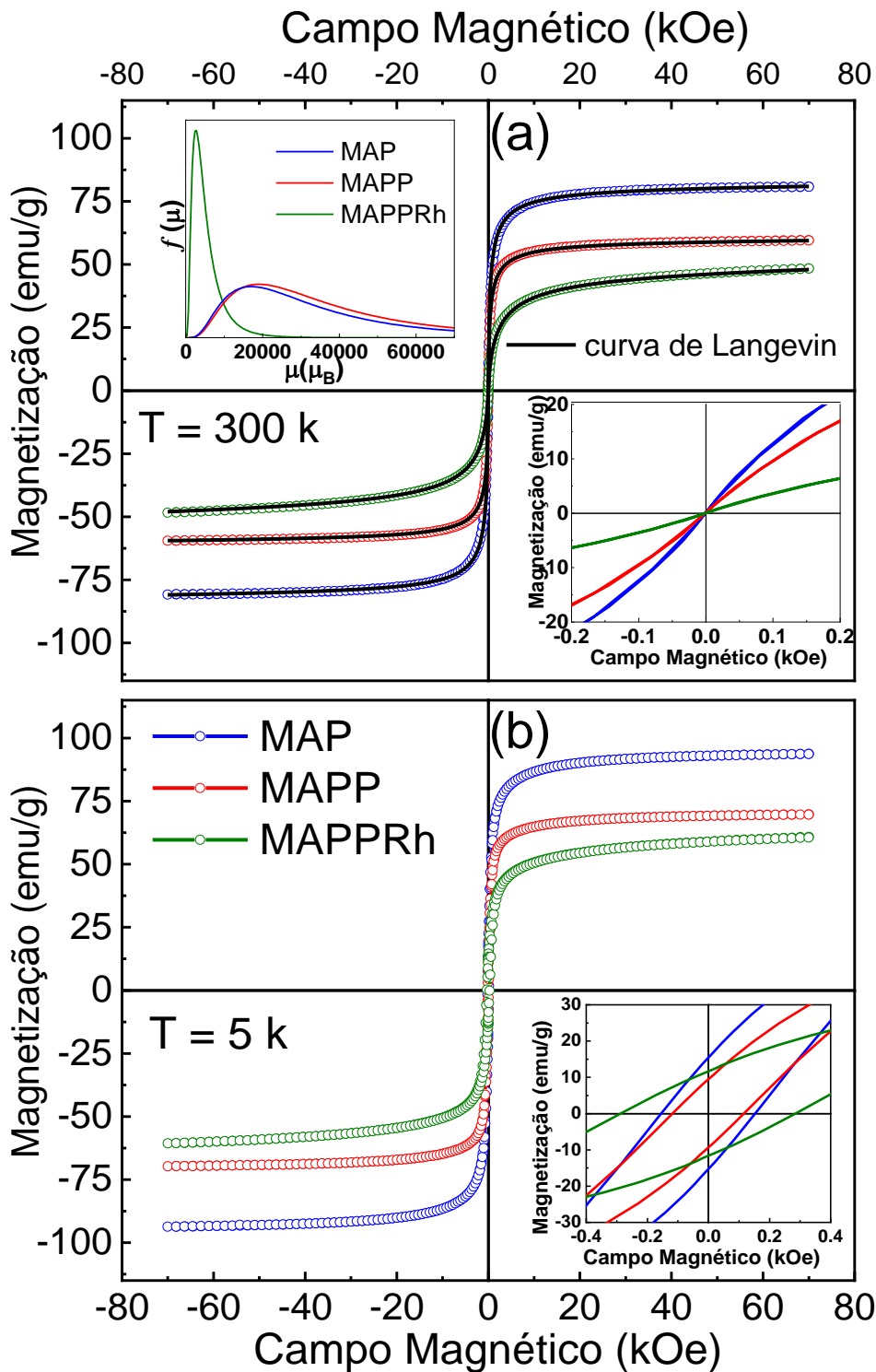


Fig. 5.9. Curvas  $M \times H$  das amostras MAP (símbolos azuis), MAPP (símbolos vermelhos) e MAPPRh (símbolos verdes) registradas em (a) 300 K e (b) 5 K. Inserções do lado direito inferior dos painéis (a) e (b) mostram ampliações das curvas de magnetização na região de baixo campo magnético. As linhas sólidas no painel (a) mostram os ajustes das curvas  $M \times H$  usando as Eqs. (5.1) e (5.2). A inserção do lado esquerdo superior no painel (a) mostra as distribuições de momentos magnéticos acessados a partir dos ajustes.

De acordo com a Eq. 5.2, o momento magnético médio é dado por  $\langle \mu \rangle = \mu_0 \exp(\sigma^2/2)$ . Se consideramos que os grãos possuem formato esférico, é possível obter o perfil de distribuição de tamanho e o tamanho magnético médio dos grãos. Os valores de  $\langle D \rangle_{mag}$  e  $(\sigma)$  encontrados para as amostras MAG MAPP e MAPPRh (II) foram 16,5 nm (0,24), 16,1 nm (0,24) e 9,8nm (0,22) respectivamente. Observe que o tamanho magnético médio das nanopartículas magnéticas na amostra MAPPRh é próximo ao tamanho físico obtido a partir de medições de microscópio eletrônico de transmissão (TEM) (ver Fig. 5.2 (c)). Este resultado sugere a ausência de acoplamento dipolo-dipolo na amostra MAPPRh, devido à repulsão esférica entre as partículas, que é potencializada pela presença do complexo DiRh (II) ligado ao dendrímero PAMAM. Além do mais, os maiores valores de  $\langle D \rangle_{mag}$  encontrados para as amostras MAG e MAPP confirmam que o revestimento ATPS (na amostra MAG) ou o revestimento ATPS@PAMAM (na amostra MAPP) não são suficientes para garantir a não interação magnéticos entre as NPMs.

As propriedades superparamagnéticas das amostras MAP, MAPP e MAPPRh também foram confirmadas estudando a dependência da temperatura da magnetização usando curvas de resfriamento de campo zero (ZFC) e de resfriamento com campo (FC), obtidos com  $H = 100$  Oe (ver Fig. 5.10). As curvas FC e ZFC apresentam características de irreversibilidade, típicas do processo de bloqueio de um sistema superparamagnético. O máximo das curvas ZFC em  $T_{MAX}$  é geralmente interpretado como cruzamento entre estados bloqueados e comportamento superparamagnético, que depende significativamente da estrutura núcleo/casca. Alguns grupos de pesquisa utilizam o máximo da curva ZFC como temperatura de bloqueio, enquanto outros consideram a existência de uma distribuição de barreira de energia (distribuição de temperatura de bloqueio), dada por [132].



$$f(T_B) \sim \left[ \frac{d(M_{ZFC} - M_{FC})}{dT} \right] \quad (5.3)$$

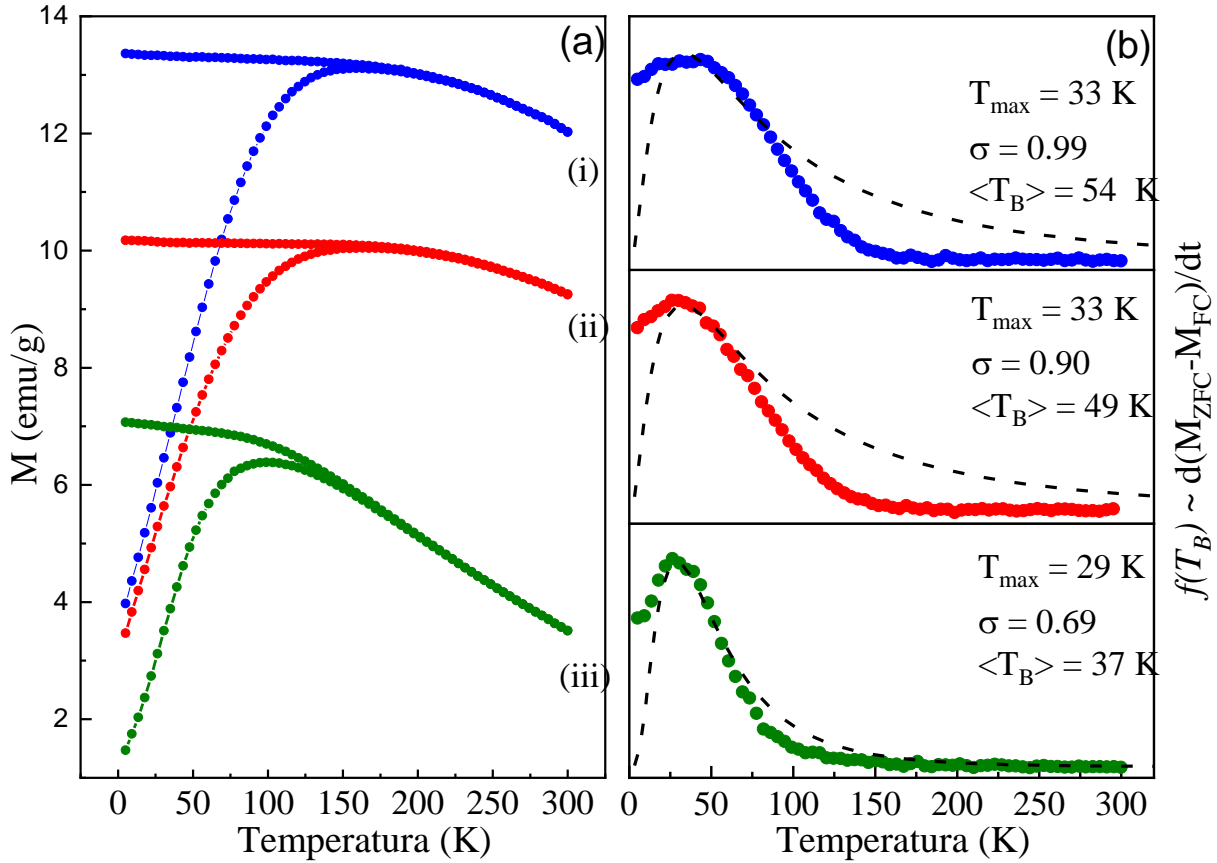


Fig. 5.10 - (a) Curvas de ZFC e FC), obtidas em  $H = 100$  Oe para (i) amostras de MAP, (ii) MAPP e (iii) MAPPRh. (b) Distribuição de temperatura de bloqueio obtida a partir de  $(d(M_{ZFC} - M_{FC})/dT)$  dos dados experimentais (símbolos) ajustados por uma função de distribuição log-normal (linhas tracejadas).

As distribuições experimentais de temperatura de bloqueio são determinadas a partir da Eq. 5.3 (ver Fig. 5.10 (b)). Os dados ajustados com uma função de distribuição lognormal são mostrados pelas linhas tracejadas na Fig. 5.10 (b). Apesar de não obter bons

ajustes experimentais, os ajustes indicaram valores de  $\langle T_B \rangle$  iguais a 54, 49 e 37 K para as amostras MAP, MAPP e MAPPRh, respectivamente.

Diferentes valores de coercividade ( $H_c$ ), observados a 5 K (ver Fig. 5.9 (b) e Tabela I), podem ser explicados levando em consideração o fato de que a coercividade é muito sensível à variação de tamanho de NPMs [133]. Os tamanhos magnéticos médios ( $\langle D \rangle_{mag}$ ) das amostras MAP e MAPP, maiores do que o tamanho magnético médio da amostra MAPPRh, é uma indicação clara de interação dipolo-dipolo magnético mais forte nas amostras MAP e MAPP, quando comparado a amostra MAPPRh. Portanto, valores mais baixos de  $H_c$  estimados para as amostras MAP e MAPP sugerem que a forte interação Interpartículas deve favorecer a rotação de spin incoerente, levando a campos coercitivos baixos. Assim, o maior valor de  $H_c$ , conforme determinado para a amostra MAPPRh, deve refletir uma reversão coerente entre NPMs não interativas.

Tabela I. Parâmetros obtidos das medidas magnéticas das amostras MAP, MAPP e MAPPRh (II).  $M_s$ : magnetização de saturação,  $H_c$ : coercividade,  $M_r$ : Magnetização remanescente,  $\langle D \rangle_{mag}$  = tamanho magnético médio,  $\langle T_B \rangle$ : temperatura média de bloqueio.  $K_{eff}$ : anisotropia magnética efetiva.

Amostra	Temperature (K)	$M_s$ (emu/g)	$H_c$ (Oe)	$M_r$ (emu/g)	$\langle D \rangle_{mag}$ (nm)	$\langle T_B \rangle$ (K)	$K_{eff}$ (J/m <sup>3</sup> )
MAP	5	93	135	18	16.5	54	15 x10 <sup>3</sup>
	300	82	0	0			-
MAPP	5	71	130	12	16.1	49	16 x10 <sup>3</sup>
	300	60	0	0			-
MAPPRh	5	65	290	12	9.8	37	35 x10 <sup>3</sup>
	300	52	0	0			-

A constante de anisotropia magnética efetiva ( $K_{eff}$ ) é um parâmetro chave para entender a resposta magnética de NPMs ao campo magnético aplicado externamente. Na verdade, ( $K_{eff}$ ) pode ser estimado a partir do valor de  $H_c$  determinado em 5 K. Assumindo um conjunto de NPMs orientadas aleatoriamente a uma temperatura finita, o campo

coercitivo é dado por:  $\mu_0 H_c = 0.96(K_{eff}/M_s) [1 - T/\langle T_B \rangle]^{0.77}$  [134],[135]. Os valores calculados de  $K_{eff}$  estão listados na Tabela I. Conforme observado, a amostra MAPPRh com menor tamanho magnético apresenta maior constante de anisotropia quando comparada às amostras MAP e MAPP. Como mencionado acima, na amostra MAPPRh as NPMs se comportam de forma não interagentes, enquanto nas amostras MAP e MAPP as NPMs interagem fortemente. Esses resultados indicam que a interação partícula-partícula afeta a anisotropia magnética conduzindo a valores de  $K_{eff}$  mais baixos em comparação com o sistema não interagentes, como a amostra MAPPRh. Vale ressaltar que, em um estudo recente, foi relatado que a forma das partículas pode afetar o valor da constante de anisotropia efetiva [136]. Embora tenhamos encontrado uma correlação entre interação magnética e anisotropia efetiva, ainda é necessário saber o papel exato desempenhado pelas partículas em interação e sua relação com o mecanismo de reversão magnética.

## 5.2 - Testes Biológicos

### 5.2.1 - Perfil de internalização celular pelo método de microscopia de fluorescência

Para o estudo da internalização dos sistemas nanoparticulados,  $5 \times 10^4$  células 4T1 e MCF7 foram plaqueadas em 24 poços. Após 24 horas, para adesão das células o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados os sistemas MAPP e MAPPRh e encubadas por 24 horas, de acordo com os procedimentos descritos na Seção 4.3.2. Para estudar o efeito do caroço de magnetita nos ensaios biológicos, um sistema contendo somente nanopartículas de PAMAM@PEG associadas com complexo de DiRh(II) (sem magnetita - PPDiRh(II) ) também foi testado. As imagens obtidas com microscopia confocal destes ensaios são mostrados na Fig. 5.11 (a) e (b) para as células 4T1 e MCF7, respectivamente. Nos painéis (i – iv) são mostrados as imagens obtidas para os ensaios com as células controle (i), MAPP (ii), MAPPRh (iii) e PPDiRh(II) (iv). Os ensaios mostraram que para ambas as linhagens de células analisadas a internalização (marcação em verde) dos sistemas MAPPRh e PPDiRh(II) foi muito superior ao observado para o sistema MAPP. Este resultado pode estar relacionado ao caráter de não opsonização do PEG, tornando as nanopartículas de MAPP mais furtivas que as de MAPPRh e PPDiRh(II).

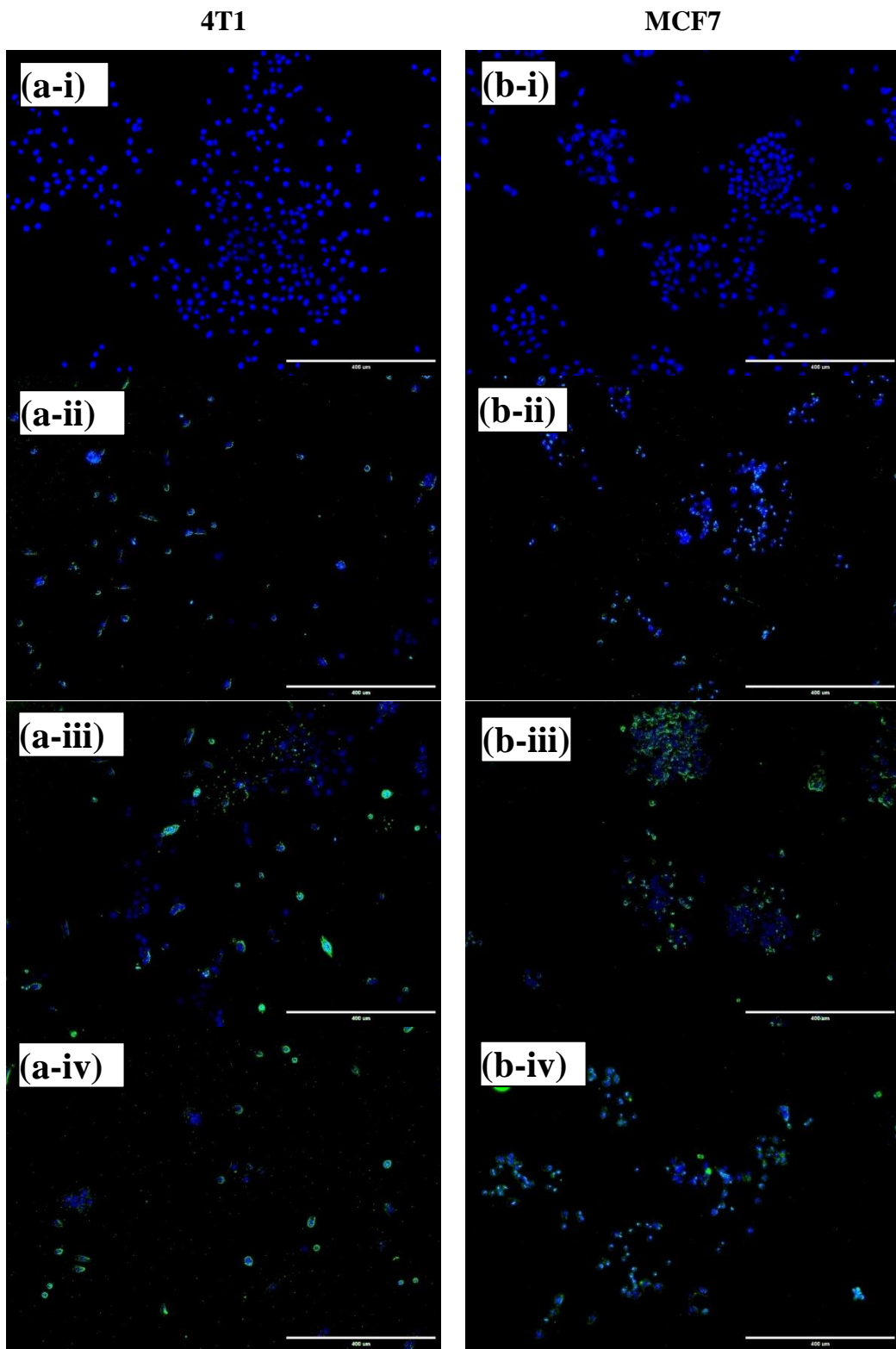


Fig. 5.11 - Análise de colocalização dos sistemas NPMs em células 4T1 (a) e MCF7 (b) para as células: controle (i) e após exposição aos sistemas MAPP (ii), MAPPRh (iii) e PPDiRh(II) (iv). A marcação em verde representa o fluoróforo contido no sistema de NPMs e azul refere-se o núcleo marcado com DAPI.

### 5.2.2 - Citotoxicidade dos sistemas DiRh(II) livre, MAPP, MAPPRh e PPDiRh.

A citotoxicidade dos sistemas nanoparticulado MAPP, MAPPRh e PPDiRh e do complexo DiRh(II) livre contra células 4T1 e MCF7 foi avaliada pelo ensaio MTT (ver seção 4.3.3). As Figuras 5.12 (a) e (b) mostram a viabilidade celular das células 4T1 e MCF7, respectivamente. Ambos os conjuntos de células foram tratadas com os sistemas MAPPRh e PPDiRh com concentrações variado de 0 - 50  $\mu\text{M}$  – referente ao DiRh(II). Para comparação, o complexo de DiRh(II) livre bem como o sistema nanoparticulado MAPP (ausência de DiRh(II)) também foram testados. Após 24 horas de incubação, as células foram lavadas e sua viabilidade celular foi determinada a fim de obter as concentrações citotóxicas que ocasionaram 50% de mortes das células (IC50). Os resultados obtidos são apresentados na Fig. 5.12, em (a) para as células 4T1 e (b) para as células MCF7. Da Fig. 5.12 é possível notar que, no intervalo de concentração estudado, não houve morte celular com intensidades estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), para ambos os conjuntos de células, quando expostas aos sistemas DiRh(II) livre (círculos pretos) e MAPP (círculos vermelhos). Contudo, quando as células foram expostas aos sistemas MAPPRh (círculos verdes) e PPDiRh (círculos laranjas), foram observadas diminuições significativas na viabilidade celular de maneira dependente da concentração de DiRh(ii). Este resultado confirma claramente a capacidade das nanopartículas de PAMAM carregadas com o complexo DiRh(ii), contendo ou não nanopartículas de magnetita, de matar células tumorais.

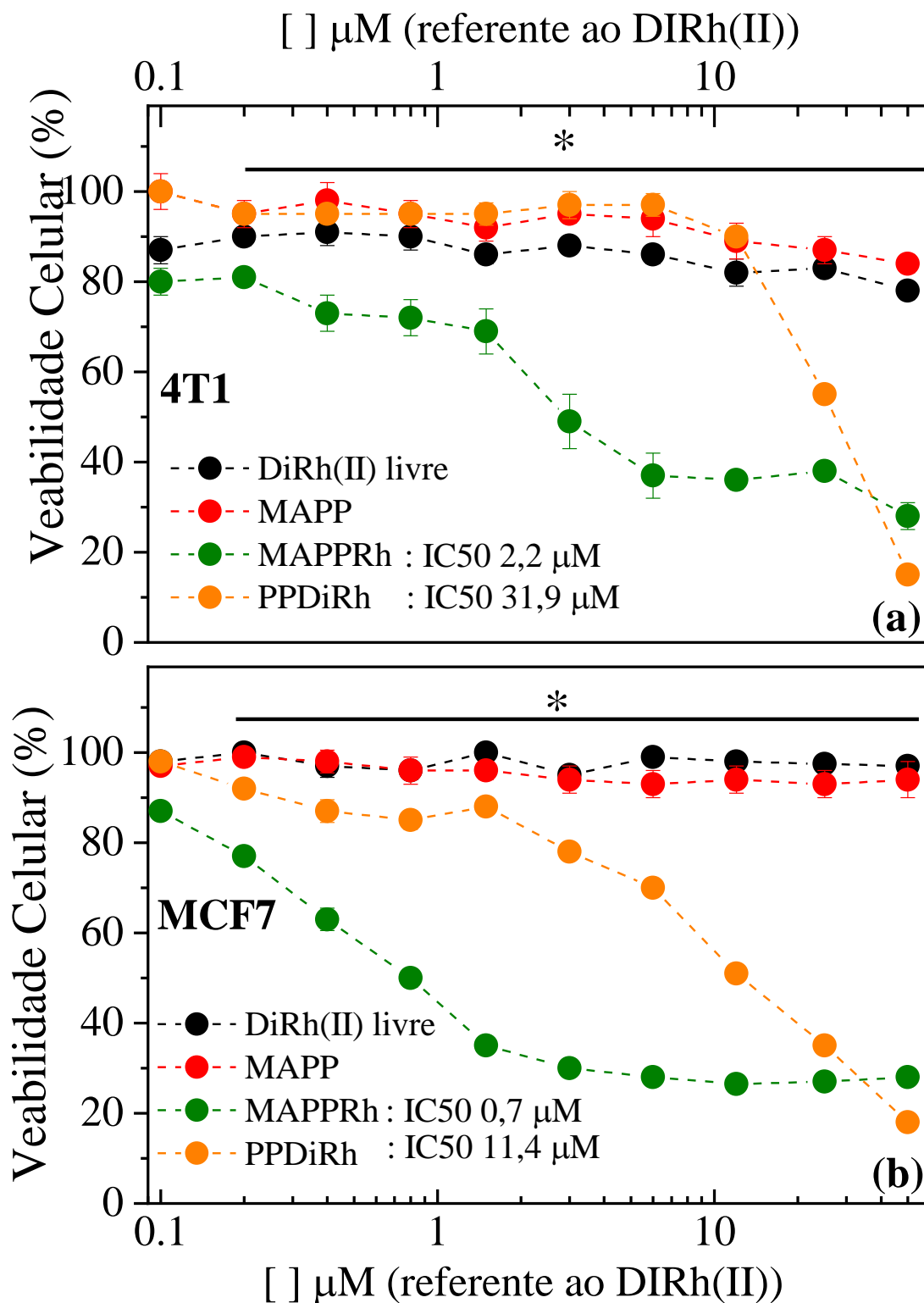


Fig. 5.12 - Viabilidade celular (a) 4T1 e (b) MCF7 24 horas após exposição a diferentes concentrações dos sistemas DiRh(II) livre, MAPP, MAPPRh e PPDiRh. O símbolo \* indica diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

É bem conhecido da literatura que os sistemas nanoparticulados podem ser projetados para ter circulação sustentada, proporcionando uma retenção aprimorada na corrente sanguínea [137], capacidade de atingir o tecido tumoral e liberar quimioterápicos de forma controlada [138]. Em decorrência dessas vantagens a utilização de sistemas nanoparticulados no tratamento de enfermidades tem proporcionado uma melhor eficácia terapêutica utilizando doses menores dos ativos farmacêuticos [139]. O uso de sistemas nanopartículas para a entrega de drogas apresentam vantagens sobre a administração convencional. Por exemplo, a quimiorresistência da terapia com cisplatina está relacionada ao reparo extensivo do DNA modificado com cisplatina no núcleo da célula, por meio do reparo por excisão de nucleotídeos (NER) [140]. A entrega de metalofármacos às mitocôndrias para atacar o genoma mitocondrial sem maquinaria NER pode levar a uma terapia racionalmente projetada para cânceres metastáticos e quimiorresistentes e pode superar os problemas associados ao tratamento convencional com cisplatina [140]. A falta de NER nas mitocôndrias e a mutação aprimorada do mtDNA no câncer agressivo dão uma forte razão para direcionar o metalofármaco dentro da matriz mitocondrial para fornecer uma opção terapêutica eficaz. Neste sentido, o passo mais importante para atacar o mtDNA requer que o fármaco seja direcionado às mitocôndrias e, melhor ainda, que permaneça no interior dela. Marrache et al [141] mostrou que a cisplatina quando carregada em nanopartículas de poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA) permitiu a entrega de cisplatina dentro das mitocôndrias de células de neuroblastoma, resultando em aproximadamente 17 vezes mais atividade do que a cisplatina livre. Além do mais, Carneiro et. al [142] verificou que para células 4T1 e MCF7, quando expostas ao citrato de rhodium (II) livre, por um período de 24 horas, apresentam valores de IC50 de 440 e 483  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Este último resultados está de acordo com o fato de que não houve intensidade de mortes



estatisticamente significativa, para ambas linhagens celulares, quanto expostas ao complexo DiRh(II) livre no intervalo de concentração aqui estudado (0 – 50  $\mu$ M).

Carneiro et. all [142] também mostrou que, quando carregadas em magnetolipossomas, 50  $\mu$ M o citrato de ródio (II) induziu uma queda de 46% da viabilidade celular das células 4T1 e de 25% nas células MCF7.

Com os resultados obtidos em relação ao efeito citotóxico dos sistemas MAPPRh e PPDiRh nas células 4T1 e MCF7, foi calculado o IC50 para ambas as linhagens celulares. Foi encontrado que a exposição das células 4T1 aos sistemas nanoestruturados MAPPRh e PPDiRh (24 horas), levaram a valores de IC50 de 2,2 e 31,9  $\mu$ M, respectivamente. Adicionalmente, os valores de IC50, encontrados para as células MCF7 foram de 0,7 e 11,4  $\mu$ M, quando expostos aos sistemas nanoestruturados MAPPRh e PPDiRh, respectivamente. Note que, embora o citrato de ródio (II) empregado no trabalho de Carneiro et. all [142] seja levemente diferente do acetato de ródio (II) empregados no presente trabalho, a redução da viabilidade celular aqui obtida foi significativamente maior.

Neste contexto, a maior eficiência dos sistemas nanoparticulados contendo DiRh(II), produzidos neste trabalho, pode estar relacionado a presença do dendrímero PAMAM e a sua maior eficiência em atingir o núcleo das células 4T1 e MCF7. Contudo, para confirmar esta hipótese mais estudos se fazem necessários.

### **5.2.3 – Via de morte celular**

Como foi verificado pelos ensaios de MTT, os tratamentos com os sistemas MAPPRh e PPDiRh foram altamente citotóxicos. Deste modo, verificar se as mortes que ocorrem nos ensaios biológicos, foram por apoptose ou necrose. Os procedimentos adotados nesta etapa podem ser encontrados na seção 4.3.4.

Os ensaios realizados, como mostrado nas Figs 13 (a) e (b), para as células 4T1 e MCF7, respectivamente, demonstrou que os danos causados pelo tratamento com os sistemas MAPPRh e PPDiRh superaram a capacidade de autorreparo das células estudadas, o que finalmente causou a morte das células. Por meio das imagens obtidas após a marcação AO/PI (Fig. 5.13), foi possível fazer uma quantificação relativa entre as células em apoptose (laranja) ou em necrose (vermelhas).

A Fig. 5.14 mostra que o tratamento com os sistemas MAPPRh e PPDiRh levam a uma maior proporção de células apoptóticas (barras laranjas) que necróticas (barras vermelhas) para as células 4T1 e MCF7 (Fig 5.14 (a) e (b), respectivamente).

Foi verificado que as células MCF7 são mais resistentes ao tratamento com os sistemas nanoparticulados do que as células 4T1. Verificou na Fig. 5.14, que 23% e 10% das células MCF7 (5 % e 8% das células 4T1) são viáveis após tratamento com os sistemas MAPPRh e PPDiRh, respectivamente. Um comportamento semelhante ocorre para o teor de células necróticas. Neste caso, 18% (MAPPRh) e 8% (PPDiRh) das células MCF7 sofreram morte por necrose, enquanto somente 4% (MAPPRh) e 8% (PPDiRh) das células 4T1 morreram por esta via. Vale ressaltar que, quando tratadas com o sistema MAPPRh, 91% das células 4T1 e 59% das células MCF7 sofreram apoptose. Por outro lado, quando tratadas com o sistema PPDiRh, a teor de células que sofre apoptose são de 84% e 82% para as células 4T1 e MCF7, respectivamente. Apresentando assim, maiores proporções significativas ( $p < 0,001$ ) de apoptose quando comparadas com células em necrose

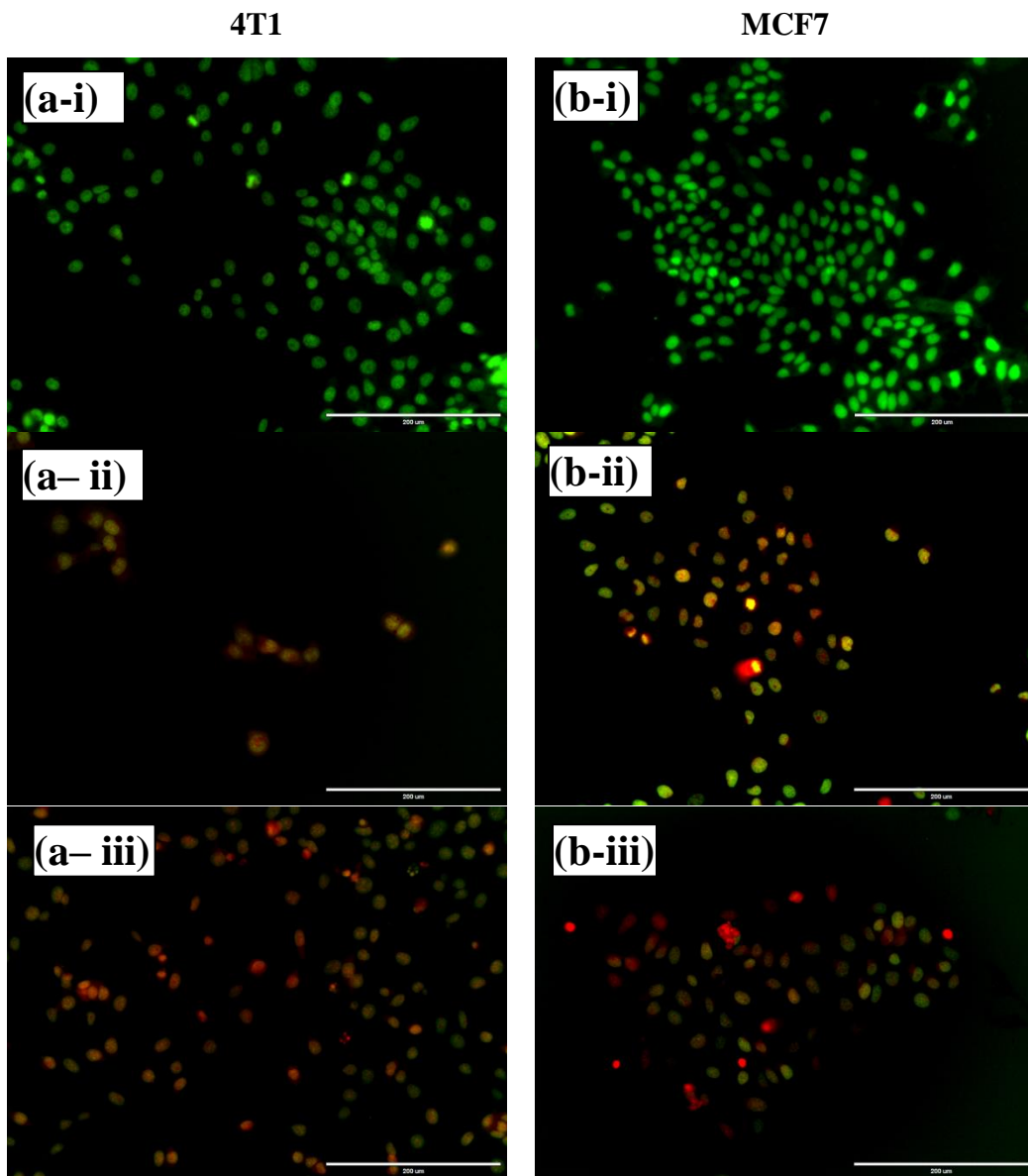


Fig. 5.13 – Marcação pelo método AO/PI das células (a) 4T1 (b) MCF7 após 24 horas da aplicação dos diferentes sistemas nanoparticulados: controle (i) e após exposição aos sistemas MAPPRh (ii) e PPDiRh (ii). A marcação em verde representa células viáveis, amarelo/laranja células em processo apoptótico e células vermelhas representa necrose

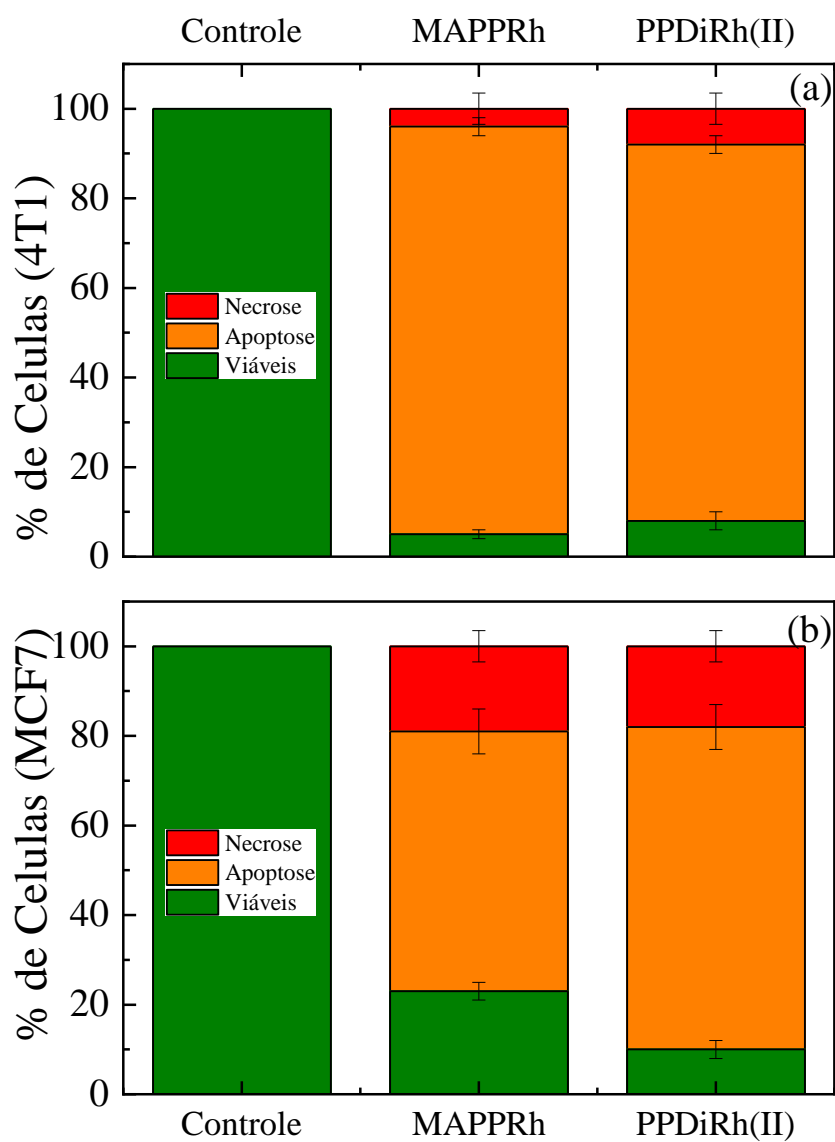


Fig 5.14 – Quantificação relativa do número de células (a) 4T1 e (b) MCF7 que, após tratamento com os sistemas MAPPRh e PPDiRh(II), são viáveis (barras verde) e sofreram morte por apoptose (barras laranjas), necrose (barras vermelhas).

## Capítulo 6

### 6.1 - Conclusões

Neste estudo, um novo nanocarreador magnético baseado no complexo de tetraacetato de DiRódio(II) (DiRh(II)) carregado em nanopartículas de magnetita revestidas com dendrímeros PAMAM foi sintetizado com sucesso. A caracterização estrutural indica a formação de nanopartículas de magnetita com tamanho médio de ~ 9 nm e nenhuma alteração nas propriedades estruturais foi determinada após os revestimentos PAMAM e PAMAM@DiRh(II). Mudanças nas características vibracionais da amostra MAPPRh, determinadas a partir dos espectros FTIR e Raman, sugerem fortemente que os íons Rh(II) interagem com pares de elétrons livres de átomos de nitrogênio na amida-II e aminas primárias de porções terminadas na superfície do dendrímero PAMAM. Esse resultado é consistente com os resultados da espectroscopia UV-Vis que revelam um desvio para o azul da banda relacionada à transição  $t_0 \pi^* (\text{Rh} - \text{Rh}) \rightarrow \sigma^* (\text{Rh} - \text{Rh})$  (de 585 nm para 490 nm), sugerindo que a energia do orbital  $\pi^* (\text{Rh} - \text{Rh})$  é reduzida devido à interação dos íons Rh(II) com porções terminais da superfície do dendrímero PAMAM. As evidências da interação dos íons Rh(II) com grupos terminados em PAMAM é confirmada pelo surgimento de uma banda em 283 nm associada à transição eletrônica  $\sigma (\text{Rh} - \text{L}) \rightarrow \sigma^* (\text{Rh} - \text{Rh})$ . Medida de magnetização demonstram que a presença de revestimento PAMAM@DiRh(II) em nanopartículas de magnetita levam a mudanças significativas no comportamento magnético de nanopartículas de magnetita revestidas com ATPS ou ATPS@PAMAM. Verifica-se que a presença de DiRh(II) é responsável pelo forte enfraquecimento da interação dipolo-dipolo magnético.

Ensaio *in vitro*, usando o método MTT, realizados em células de carcinoma mamário murino (4T1) e adenocarcinoma mamário humano (MCF7), mostraram que os

sistemas nanoestruturados MAPPRh e PPDiRh(II) apresentam elevada atividade citotoxicidade em ambas as linhagens celulares, sendo O IC50 observado para o sistema MAPPRh 15 vezes menor que o observado para o sistema PPDiRh(II). Em contrapartida, foi encontrado que o sistema MAPP, assim como o complexo de DiRh(II) livre, não apresentaram citotoxicidade estatisticamente significativa no intervalo de concentração estudado. Os estudos do perfil de internalização dos sistemas MAPP, MAPPRh e PPDiRh em células 4T1 e MCF7 mostraram que para ambas as linhagens celulares a internalização dos sistemas MAPPRh e PPDiRh(II) foi muito superior ao observado para o sistema MAPP. Este resultado pode estar relacionado ao caráter de não opsonização do PEG, tornando as nanopartículas de MAPP mais furtivas que as de MAPPRh e PPDiRh(II). Por fim, foi identificado a apoptose como o principal mecanismo de morte celular após tratamento com os sistemas MAPPRh e PPDiRh(II). Este resultado foi mais pronunciado para a células 4T1 quando comparado com as células MCF7. Foi observado que, quando tratadas com o sistema MAPPRh, 18% das células MCF7 e 4% das células 4T1 morrem por necrose. Por outro lado, não foi verificada diferenças estatisticamente significativas do teor de necrose nas células tratadas com o sistema PPDiRh(II).

Portanto, os resultados aqui apresentados sugerem que sistemas nanoparticulados a base de dendrímeros PAMAM carregados com complexo de acetato de DiRódio (II) devem ser considerados uma plataforma adequada e eficaz para sistemas de liberação de drogas que operam mais especificamente em células tumorais.

## 6.2 - Perspectivas de trabalhos futuros

- Produzir sistemas a nanoestruturado MAPPRh e PPDiRh(II) funcionalizados com anticorpos monoclonais de modo a aumentar suas especificidade.
- Investigar o perfil de liberação do complexo DiRh(II), em tampão com pH levemente ácido e em meio de cultura, tendo em vista sua aplicação biológica.
- Investigar o perfil de incorporação dos sistemas nanoestruturado MAPPRh e PPDiRh(II) e identificar a colocalização subcelular para as organelas lisossomos, retículo endoplasmático mitocôndrias e núcleo.
- Testar a eficácia dos sistemas a nanoestruturado MAPPRh e PPDiRh(II) em sistemas *in vivo*.

## Bibliografia

- [1] S. Janssens, A. Tinel, The PIDDosome, DNA-damage-induced apoptosis and beyond, *Cell Death Differ.* 19 (2012) 13–20. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.162>.
- [2] Y. Ma, D. Lin, W. Sun, T. Xiao, J. Yuan, N. Han, S. Guo, X. Feng, K. Su, Y. Mao, S. Cheng, Y. Gao, Expression of targeting protein for Xklp2 associated with both malignant transformation of respiratory epithelium and progression of squamous cell lung cancer, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 1121–1127. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1766>.
- [3] X. He, B. Li, Y. Shao, N. Zhao, Y. Hsu, Z. Zhang, L. Zhu, Cell fusion between gastric epithelial cells and mesenchymal stem cells results in epithelial-to-mesenchymal transition and malignant transformation, *BMC Cancer.* 15 (2015) 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1027-1>.
- [4] L. Böckelmann, C. Starzonek, A.C. Niehoff, U. Karst, J. Thomale, H. Schlüter, C. Bokemeyer, A. Aigner, U. Schumacher, Detection of doxorubicin, cisplatin and therapeutic antibodies in formalin-fixed paraffin-embedded human cancer cells, *Histochem. Cell Biol.* 153 (2020) 367–377. <https://doi.org/10.1007/s00418-020-01857-x>.
- [5] K. Wu, K. Schliep, X. Zhang, J. Liu, B. Ma, J.P. Wang, Characterizing Physical Properties of Superparamagnetic Nanoparticles in Liquid Phase Using Brownian Relaxation, *Small.* 13 (2017) 1–7. <https://doi.org/10.1002/smll.201604135>.
- [6] M.C. da Paz, M. de F.M. Almeida Santos, C.M.B. Santos, S.W. da Silva, L.B. de Souza, E.C.D. Lima, R.C. Silva, C.M. Lucci, P.C. Morais, R.B. Azevedo, Z.G.M. Lacava, Anti-CEA loaded maghemite nanoparticles as a theragnostic device for colorectal cancer, *Int. J. Nanomedicine.* 7 (2012) 5271–5282.



- <https://doi.org/10.2147/IJN.S32139>.
- [7] X. Jin, Q. Ye, C.W. Wang, Y. Wu, K. Ma, S. Yu, N. Wei, H. Gao, Magnetic Nanoplatfoms for Covalent Protein Immobilization Based on Spy Chemistry, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 13 (2021) 44147–44156.  
<https://doi.org/10.1021/acsami.1c14670>.
- [8] J. Zhong, E.L. Rösch, T. Viereck, M. Schilling, F. Ludwig, Toward Rapid and Sensitive Detection of SARS-CoV-2 with Functionalized Magnetic Nanoparticles, *ACS Sensors*. 6 (2021) 976–984. <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c02160>.
- [9] C.M.B. Santos, S.W. Da Silva, L.R. Guilherme, P.C. Morais, SERRS study of molecular arrangement of amphotericin b adsorbed onto iron oxide nanoparticles precoated with a bilayer of lauric acid, *J. Phys. Chem. C*. 115 (2011) 20442–20448. <https://doi.org/10.1021/jp206434j>.
- [10] Y.E. Augusto-Jimenez, M. González-Montoya, D. Naranjo-Feliciano, D. Uribe-Ramírez, E. Cristiani-Urbina, C. Díaz-águila, H. Yee-Madeira, R. Mora-Escobedo, Antioxidant activity of bioactive peptide fractions from germinated soybeans conjugated to Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles by the ugi multicomponent reaction, *Molecules*. 26 (2021) 5726. <https://doi.org/10.3390/molecules26195726>.
- [11] A. Kulpa-Koterwa, T. Ossowski, P. Niedziałkowski, Functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as glassy carbon electrode modifiers for heavy metal ions detection—A mini review, *Materials (Basel)*. 14 (2021) 7725.  
<https://doi.org/10.3390/ma14247725>.
- [12] Q. Hu, J. Yao, X. Wang, Y. Wang, X. Fu, J. Ma, H. Lin, J. Xu, L. Shen, X. Yu, Combinational Chemoimmunotherapy for Breast Cancer by Codelivery of Doxorubicin and PD-L1 siRNA Using a PAMAM-Incorporated Liposomal Nanoplatfom, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 14 (2022) 8782–8792.

- <https://doi.org/10.1021/acsami.1c21775>.
- [13] M. El-Sayed, C.A. Rhodes, M. Ginski, H. Ghandehari, Transport mechanism(s) of poly (amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers, *Int. J. Pharm.* 265 (2003) 151–157. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(03\)00391-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(03)00391-0).
- [14] D. Luo, K. Haverstick, N. Belcheva, E. Han, W.M. Saltzman, Poly(ethylene glycol)-conjugated PAMAM dendrimer for biocompatible, high-efficiency DNA delivery, *Macromolecules.* 35 (2002) 3456–3462. <https://doi.org/10.1021/ma0106346>.
- [15] M. Frasconi, Z. Liu, J. Lei, Y. Wu, E. Strelakova, D. Malin, M.W. Ambrogio, X. Chen, Y.Y. Botros, V.L. Cryns, J.P. Sauvage, J. Fraser Stoddart, Photoexpulsion of surface-grafted ruthenium complexes and subsequent release of cytotoxic cargos to cancer cells from mesoporous silica nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 11603–11613. <https://doi.org/10.1021/ja405058y>.
- [16] Y. Borodko, C.M. Thompson, W. Huang, H.B. Yildiz, H. Frei, G.A. Somorjai, Spectroscopic study of platinum and rhodium dendrimer (PAMAM G4OH) compounds: Structure and stability, *J. Phys. Chem. C.* 115 (2011) 4757–4767. <https://doi.org/10.1021/jp1116454>.
- [17] C.P. Popolin, J.P.B. Reis, A.B. Becceneri, A.E. Graminha, M.A.P. Almeida, R.S. Corrêa, L.A. Colina-Vegas, J. Ellena, A.A. Batista, M.R. Cominetti, Cytotoxicity and anti-tumor effects of new ruthenium complexes on triple negative breast cancer cells, *PLoS One.* 12 (2017) 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183275>.
- [18] A. Sharma S, S. P, N. Roy, P. Paira, Advances in novel iridium (III) based complexes for anticancer applications: A review, *Inorganica Chim. Acta.* 513 (2020) 119925. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119925>.

- [19] T. Nabiyeva, C. Marschner, B. Blom, Synthesis, structure and anti-cancer activity of osmium complexes bearing  $\pi$ -bound arene substituents and phosphane Co-Ligands: A review, *Eur. J. Med. Chem.* 201 (2020) 112483.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112483>.
- [20] E.B. Bauer, A.A. Haase, R.M. Reich, D.C. Crans, F.E. Kühn, Organometallic and coordination rhenium compounds and their potential in cancer therapy, *Coord. Chem. Rev.* 393 (2019) 79–117. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.04.014>.
- [21] A. Enriquez Garcia, B. Lai, S.G. Gopinathan, H.H. Harris, C.S. Shemanko, F. Jalilehvand, Nuclear localization of dirhodium(II) complexes in breast cancer cells by X-ray fluorescence microscopy, *Chem. Commun.* 55 (2019) 8223–8226.  
<https://doi.org/10.1039/c9cc00521h>.
- [22] G. Ferraro, A. Pratesi, L. Messori, A. Merlino, Protein interactions of dirhodium tetraacetate: a structural study, *Dalt. Trans.* 49 (2020) 2412–2416.  
<https://doi.org/10.1039/c9dt04819g>.
- [23] M.O. da Silva, M.L.B. Carneiro, J.L.N. Siqueira, S.N. Bão, A.R. de Souza, Development of a Promising Antitumor Compound Based on Rhodium(II) Succinate Associated with Iron Oxide Nanoparticles Coated with Lauric Acid/Albumin Hybrid: Synthesis, Colloidal Stability and Cytotoxic Effect in Breast Carcinoma Cells, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 18 (2017) 3832–3843.  
<https://doi.org/10.1166/jnn.2018.15021>.
- [24] N. Katsaros, A. Anagnostopoulou, Rhodium and its compounds as potential agents in cancer treatment, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42 (2002) 297–308.  
[https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00222-0](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00222-0).
- [25] T.G. Spring, J.L. Bear, The Interaction of Rhodium(II) Carboxylates with Enzymes, *Cancer Res.* (1976).

- [26] H.T. Chifotides, K.R. Dunbar, Interactions of metal - Metal-bonded antitumor active complexes with DNA fragments and DNA, *Acc. Chem. Res.* 38 (2005) 146–156. <https://doi.org/10.1021/ar0302078>.
- [27] J.M. Cullen, M. Breen, An Overview of Molecular Cancer Pathogenesis, Prognosis, and Diagnosis, *Tumors Domest. Anim.* (2016) 1–26. <https://doi.org/10.1002/9781119181200.ch1>.
- [28] F. Liu, Z. Xia, M. Zhang, J. Ding, Y. Feng, J. Wu, Y. Dong, W. Gao, Z. Han, Y. Liu, Y. Yao, D. Li, SMARCAD1 promotes pancreatic cancer cell growth and metastasis through Wnt/ $\beta$ -catenin-mediated EMT, *Int. J. Biol. Sci.* 15 (2019) 636–646. <https://doi.org/10.7150/ijbs.29562>.
- [29] P.A. Oliveira, A. Colaço, R. Chaves, H. Guedes-Pinto, L.F.P. De-La-Cruz, C. Lopes, Chemical carcinogenesis, *An. Acad. Bras. Cienc.* 79 (2007) 593–916. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652007000400004>.
- [30] R.A. Weiss, Viral mechanisms of carcinogenesis., *IARC Sci. Publ.* (1982) 307–316.
- [31] K.J. Pienta, E.U. Hammarlund, J.S. Brown, S.R. Amend, R.M. Axelrod, Cancer recurrence and lethality are enabled by enhanced survival and reversible cell cycle arrest of polyan euploid cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 118 (2021) 1–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.2020838118>.
- [32] *Cancer biology: molecular and genetic basis*, (2014).
- [33] American Cancer Society, *Understanding What Cancer Is: Ancient Times to Present*, (2018) 34.
- [34] Instituto Nacional de Câncer - INCA, *Câncer*, (2022). <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer/> (accessed July 29, 2022).
- [35] A.J. McLachlan, X. He, S.J. Clarke, *Clinical pharmacology of chemotherapy*

- agents in older people with cancer, *Curr. Gerontol. Geriatr. Res.* 2011 (2011).  
<https://doi.org/10.1155/2011/628670>.
- [36] S. Takada, Principles of chemotherapy safety procedures, *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 18 (2003) 73–74. <https://doi.org/10.1053/svms.2003.36618>.
- [37] L.G. Magalhaes, L.L.G. Ferreira, A.D. Andricopulo, Recent advances and perspectives in cancer drug design, *An. Acad. Bras. Cienc.* 90 (2018) 1233–1250.  
<https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170823>.
- [38] E.J.M. de Jong, I. Mommers, A. Fariña Sarasqueta, L.G. van der Geest, L. Heij, I.H.J.T. de Hingh, M.Y.V. Homs, V.C.G. Tjan-Heijnen, L.B.J. Valkenburg-van Iersel, J.W. Wilmink, S.M.E. Geurts, J. de Vos-Geelen, Adjuvant and first-line palliative chemotherapy regimens in patients diagnosed with periampullary cancer: a short report from a nationwide registry, *Acta Oncol. (Madr)*. 61 (2022) 591–596.  
<https://doi.org/10.1080/0284186X.2022.2053199>.
- [39] I.W. Dimery, S.S. Legha, M. Shirinian, Waun Ki Hong, Fluorouracil, doxorubicin, cyclophosphamide, and cisplatin combination chemotherapy in advanced or recurrent salivary gland carcinoma, *J. Clin. Oncol.* 8 (1990) 1056–1062.  
<https://doi.org/10.1200/JCO.1990.8.6.1056>.
- [40] W.Q. Li, Z. Wang, S. Hao, H. He, Y. Wan, C. Zhu, L.P. Sun, G. Cheng, S.Y. Zheng, Mitochondria-Targeting Polydopamine Nanoparticles to Deliver Doxorubicin for Overcoming Drug Resistance, *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 9 (2017) 16793–16802. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b01540>.
- [41] C.X. Zhang, S.J. Lippard, New metal complexes as potential therapeutics, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7 (2003) 481–489. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(03\)00081-4](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(03)00081-4).
- [42] H. Nogueira-barbosa, V.F. Muglia, *En\_a13V41N4*, 41 (2008) 263–267.

- [43] R.D. Teo, J.Y. Hwang, J. Termini, Z. Gross, H.B. Gray, Fighting Cancer with Corroles, *Chem. Rev.* 117 (2017) 2711–2729.  
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00400>.
- [44] A.E. Burgos, C.K.Y.A. Okio, R.D. Sinisterra, Preparação do composto de associação entre citrato de ródio(II) e  $\beta$ -ciclodextrina, *Quim. Nova.* 35 (2012) 762–765. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000400020>.
- [45] E.B. Boyar, S.D. Robinson, Rhodium(I)<sub>2</sub> (Ii) Carboxylato Complexes., *Platin. Met. Rev.* 26 (1982) 65–69.
- [46] F.A. Cotton, E.A. Hillard, C.A. Murillo, The first dirhodium tetracarboxylate molecule without axial ligation: New insight into the electronic structures of molecules with importance in catalysis and other reactions, *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 5658–5660. <https://doi.org/10.1021/ja025760j>.
- [47] C. Kittel, *Introduction to Solid state physics*, Eighth Edi, 2005.
- [48] W.D. CALLISTER JR, *Materials science and engineering*, Seventh Ed, New York, 2007.
- [49] A.R. WEST, *Solid State Chemistry and its Applications* Second Edition, 2014.
- [50] J. William D. Callister, D.G. Rethwisc, *Materials Science and Eng.* 9Ed, Mater. Sci. Eng. A. (2007) 1–939.
- [51] R.C. O’HANDLEY, *MODERN MAGNETIC MATERIALS Principles and Applications*, 2000. <https://doi.org/10.1088/0031-9112/13/4/003>.
- [52] A.S. Teja, P.Y. Koh, Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* 55 (2009) 22–45.  
<https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2008.08.003>.
- [53] Book reviews 1189, (1991) 26991–26991.
- [54] A. Hajalilou, S.A. Mazlan, A review on preparation techniques for synthesis of

- nanocrystalline soft magnetic ferrites and investigation on the effects of microstructure features on magnetic properties, *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* 122 (2016) 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00339-016-0217-2>.
- [55] H.L. Andersen, M. Christensen, In situ powder X-ray diffraction study of magnetic CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanocrystallite synthesis, *Nanoscale.* 7 (2015) 3481–3490. <https://doi.org/10.1039/c4nr06937d>.
- [56] K.Y. Cheong, S. Kong, Synthesis and Characterization of Magnetite Nanoparticles by Chemical Co-Precipitation, *Borneo J. Sci. Technol.* (2019) 2–7. <https://doi.org/10.35370/bjost.2019.1.2-04>.
- [57] S. Liu, B. Yu, S. Wang, Y. Shen, H. Cong, Preparation, surface functionalization and application of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles, *Adv. Colloid Interface Sci.* 281 (2020) 102165. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102165>.
- [58] S. Wu, A. Sun, F. Zhai, J. Wang, W. Xu, Q. Zhang, A.A. Volinsky, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles synthesis from tailings by ultrasonic chemical co-precipitation, *Mater. Lett.* 65 (2011) 1882–1884. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.03.065>.
- [59] M. Anbarasu, M. Anandan, E. Chinnasamy, V. Gopinath, K. Balamurugan, Synthesis and characterization of polyethylene glycol (PEG) coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles by chemical co-precipitation method for biomedical applications, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 135 (2015) 536–539. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.07.059>.
- [60] M. Unni, A.M. Uhl, S. Savliwala, B.H. Savitzky, R. Dhavalikar, N. Garraud, D.P. Arnold, L.F. Kourkoutis, J.S. Andrew, C. Rinaldi, Thermal Decomposition Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles with Diminished Magnetic Dead Layer by Controlled Addition of Oxygen, *ACS Nano.* 11 (2017) 2284–2303.

- <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b00609>.
- [61] L. Liz, M.A. López Quintela, J. Mira, J. Rivas, Preparation of colloidal Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ultrafine particles in microemulsions, *J. Mater. Sci.* 29 (1994) 3797–3801.  
<https://doi.org/10.1007/BF00357351>.
- [62] S. Veintemillas-Verdaguer, M.P. Morales, C.J. Serna, Continuous production of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ultrafine powders by laser pyrolysis, *Mater. Lett.* 35 (1998) 227–231.  
[https://doi.org/10.1016/S0167-577X\(97\)00251-6](https://doi.org/10.1016/S0167-577X(97)00251-6).
- [63] F. Monte, M.P. Morales, D. Levy, A. Fernandez, M. Ocan, Formation of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Isolated Nanoparticles in a Silica Matrix, *Langmuir.* 13 (1997) 3627–3634.
- [64] I.S. Smolkova, N.E. Kazantseva, H. Parmar, V. Babayan, P. Smolka, P. Saha, Correlation between coprecipitation reaction course and magneto-structural properties of iron oxide nanoparticles, *Mater. Chem. Phys.* 155 (2015) 178–190.  
<https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2015.02.022>.
- [65] M. Jafari Eskandari, I. Hasanzadeh, Size-controlled synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles via an alternating magnetic field and ultrasonic-assisted chemical coprecipitation, *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* 266 (2021) 115050. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2021.115050>.
- [66] P.L. Hariani, M. Faizal, R. Ridwan, M. Marsi, D. Setiabudidaya, Synthesis and Properties of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles by Co-precipitation Method to Removal Procion Dye, *Int. J. Environ. Sci. Dev.* 4 (2013) 336–340.  
<https://doi.org/10.7763/ijesd.2013.v4.366>.
- [67] R.K. Katayoon Kalantari, Mansor Bin Ahmad, Kamyar Shameli, Synthesis of talc/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanocomposites using chemical coprecipitation method  
Synthesis of talc /Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanocomposites using chemical coprecipitation method, 8 (2013) 1817–1823. <https://doi.org/10.2147/IJN.S43693>.



- [68] S.K. Suh, K. Yuet, D.K. Hwang, K.W. Bong, P.S. Doyle, T.A. Hatton, Synthesis of nonspherical superparamagnetic particles: In situ coprecipitation of magnetic nanoparticles in microgels prepared by stop-flow lithography, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 7337–7343. <https://doi.org/10.1021/ja209245v>.
- [69] H. Meng, Z. Zhang, F. Zhao, T. Qiu, J. Yang, Orthogonal optimization design for preparation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles via chemical coprecipitation, *Appl. Surf. Sci.* 280 (2013) 679–685. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.05.041>.
- [70] M.S.A. Darwish, H. Kim, H. Lee, C. Ryu, J.Y. Lee, J. Yoon, Synthesis of magnetic ferrite nanoparticles with high hyperthermia performance via a controlled co-precipitation method, *Nanomaterials*. 9 (2019). <https://doi.org/10.3390/nano9081176>.
- [71] A.Y. Sari, A.S. Eko, K. Candra, D.P. Hasibuan, M. Ginting, P. Sebayang, P. Simamora, Synthesis, Properties and Application of Glucose Coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles Prepared by Co-precipitation Method, *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 214 (2017). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/214/1/012021>.
- [72] K. Petcharoen, A. Sirivat, Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method, *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* 177 (2012) 421–427. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2012.01.003>.
- [73] Q.M. Kainz, A. Schätz, A. Zöpfl, W.J. Stark, O. Reiser, Combined covalent and noncovalent functionalization of nanomagnetic carbon surfaces with dendrimers and BODIPY fluorescent dye, *Chem. Mater.* 23 (2011) 3606–3613. <https://doi.org/10.1021/cm200705d>.
- [74] E.D. Fussell, A. Darko, Eric D. Fussell and Ampofo Darko \*, (2021) 1–12.
- [75] G.G. Christoph, Y.B. Koh, Metal-Metal Bonding in Dirhodium Tetracarboxylates.

- Trans Influence and Dependence of the Rh-Rh Bond Distance upon the Nature of the Axial Ligands, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 1422–1434.  
<https://doi.org/10.1021/ja00500a011>.
- [76] A.E. Burgos, R.D. Sinisterra, Preparación y caracterización de compuestos de asociación entre el acetato, propionato y butirato de rodio(II) con  $\beta$ -ciclodextrina, *Rev. Colomb. Quim.* 39 (2010) 427–445.
- [77] A.E. Burr, Digital Commons @ Colby Double stranded DNA-binding studies of potential Rhodium ( II ) antitumor complexes Double Stranded DNA-Binding Studies of Potential Rhodium ( II ) Antitumor Complexes Amity Elizabeth Burr Colby College Chemistry Department Watervi, (2003).
- [78] B. Devadas, A.P. Periasamy, K. Bouzek, A review on poly(amidoamine) dendrimer encapsulated nanoparticles synthesis and usage in energy conversion and storage applications, *Coord. Chem. Rev.* 444 (2021) 214062.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214062>.
- [79] B.K. Nanjwade, H.M. Bechra, G.K. Derkar, F. V. Manvi, V.K. Nanjwade, Dendrimers: Emerging polymers for drug-delivery systems, *Eur. J. Pharm. Sci.* 38 (2009) 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2009.07.008>.
- [80] K. Karolczak, S. Rozalska, M. Wieczorek, M. Labieniec-Watala, C. Watala, Poly(amido)amine dendrimers generation 4.0 (PAMAM G4) reduce blood hyperglycaemia and restore impaired blood-brain barrier permeability in streptozotocin diabetes in rats, *Int. J. Pharm.* 436 (2012) 508–518.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.06.033>.
- [81] O.R. Members, Group, Stony Brook University, 5054 (2005).
- [82] S. Svenson, D.A. Tomalia, Dendrimers in biomedical applications - Reflections on the field, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 2106–2129.

- <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.09.018>.
- [83] R. Esfand, D.A. Tomalia, Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: From biomimicry to drug delivery and biomedical applications, *Drug Discov. Today*. 6 (2001) 427–436. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(01\)01757-3](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(01)01757-3).
- [84] M. Fana, J. Gallien, B. Srinageshwar, G.L. Dunbar, J. Rossignol, Pamam dendrimer nanomolecules utilized as drug delivery systems for potential treatment of glioblastoma: A systematic review, *Int. J. Nanomedicine*. 15 (2020) 2789–2808. <https://doi.org/10.2147/IJN.S243155>.
- [85] F.D.E. Ci, N. Farmac, U.D.E. Ribeir, Nanodispersões de fase líquido-cristalina como carreadoras de siRNA no tratamento tópico da psoríase : Avaliação em modelos in vitro e in vivo Nanodispersões de fase líquido-cristalina como carreadoras de siRNA no tratamento tópico da psoríase : Avaliação, (2016).
- [86] C. De Medicamentos, Transporte de Fármacos, (2012) 22–47.
- [87] H. Yang, S.T. Lopina, L.P. DiPersio, S.P. Schmidt, Stealth dendrimers for drug delivery: Correlation between PEGylation, cytocompatibility, and drug payload, *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 19 (2008) 1991–1997. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3278-0>.
- [88] O.C. Morúa, M.J.B. Cardoso, H.N. da Silva, R.G. Carrodeguas, M.A. Rodríguez, M.V.L. Fook, Synthesis of brushite/polyethylene glycol cement for filler in bone tissue injuries, *Ceramica*. 67 (2021) 289–294. <https://doi.org/10.1590/0366-69132021673833054>.
- [89] S. Zhu, M. Hong, L. Zhang, G. Tang, Y. Jiang, Y. Pei, PEGylated PAMAM dendrimer-doxorubicin conjugates: In vitro evaluation and in vivo tumor accumulation, *Pharm. Res*. 27 (2010) 161–174. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9992-1>.

- [90] V.M. Thanh, T.H. Nguyen, T.V. Tran, U.T.P. Ngoc, M.N. Ho, T.T. Nguyen, Y.N.T. Chau, V.T. Le, N.Q. Tran, C.K. Nguyen, D.H. Nguyen, Low systemic toxicity nanocarriers fabricated from heparin-mPEG and PAMAM dendrimers for controlled drug release, *Mater. Sci. Eng. C*. 82 (2018) 291–298.  
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.07.051>.
- [91] T.U. Ly, N.Q. Tran, T.K.D. Hoang, K.N. Phan, H.N. Truong, C.K. Nguyen, Pegylated dendrimer and its effect in fluorouracil loading and release for enhancing antitumor activity, *J. Biomed. Nanotechnol.* 9 (2013) 213–220.  
<https://doi.org/10.1166/jbn.2013.1479>.
- [92] M.T. Vu, L.G. Bach, D.C. Nguyen, M.N. Ho, N.H. Nguyen, N.Q. Tran, D.H. Nguyen, C.K. Nguyen, T.T.H. Thi, Modified carboxyl-terminated PAMAM dendrimers as great cytocompatible nano-based drug delivery system, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20082016>.
- [93] T. Wang, W.L. Yang, Y. Hong, Y.L. Hou, Magnetic nanoparticles grafted with amino-riched dendrimer as magnetic flocculant for efficient harvesting of oleaginous microalgae, *Chem. Eng. J.* 297 (2016) 304–314.  
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.03.038>.
- [94] A. Pourjavadi, S.H. Hosseini, M. Alizadeh, C. Bennett, Magnetic pH-responsive nanocarrier with long spacer length and high colloidal stability for controlled delivery of doxorubicin, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 116 (2014) 49–54.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.12.048>.
- [95] H.D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, M. Brennan, A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma<sup>1,2</sup>, *J. Natl. Cancer Inst.* 51 (1973) 1409–1416. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1409>.
- [96] D.C. Reis, M.A. Rodrigues, S.G.B. Pinto, A.C.A. e. Silva, G. V. Moreira, L.C.

- Campos, P.P. Campos, S.L. Fialho, M.T.P. Lopes, D.A. Gomes, R.C. Russo, E. Ferreira, G.D. Cassali, Evaluation of the immunomodulatory activity of thalidomide on tumor-associated macrophages in the 4T1 murine metastatic breast cancer model, *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 73 (2021) 1334–1345.  
<https://doi.org/10.1590/1678-4162-12125>.
- [97] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [98] X. Zeng, Y. Zhang, A.M. Nyström, Endocytic uptake and intracellular trafficking of bis-MPA-based hyperbranched copolymer micelles in breast cancer cells, *Biomacromolecules.* 13 (2012) 3814–3822. <https://doi.org/10.1021/bm301281k>.
- [99] S. Kasibhatla, G.P. Amarante-Mendes, D. Finucane, T. Brunner, E. Bossy-Wetzel, D.R. Green, Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis, *Cold Spring Harb. Protoc.* 2006 (2006) pdb.prot4493.  
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot4493>.
- [100] M.C. RODRIGUES, Indução de morte celular imunogênica por terapia fotodinâmica mediada por cloreto de alumínio-ftalocianina incorporado a nanoemulsão em células de câncer de mama murino, Universidade de Brasília, 2018.
- [101] Malvern Instruments: Worcestershire, Manual, Zetasizer Nano Series User, (2005).
- [102] B.D. Cullity, *Elements of X-ray Diffraction*, 2nd Ed, Addison- Wesley Mass, 1978.
- [103] P.C.L. Guimarães, J.R. da Silva, R.B. de Azevedo, P.C. Morais, S.W. da Silva, Fabrication and characterization of glycine-loaded PEG nanoparticles for drug delivering: A comprehensive SERS study, *Appl. Surf. Sci.* 450 (2018) 396–403.

- <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.04.211>.
- [104] J.W. Trexler Jr, A.F. Schreiner, F.A. Cotton, Electronic excitation MO assignment of rhodium carboxylato complexes,  $\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CR})_4(\text{Lax})_2$ , using MCD experiment and theory, *Inorg. Chem.* 27 (1988) 3265–3267.
- [105] S.P. Devi, R.K.H. Singh, W. Sujata, D.D. Joshi, Synthesis, DNA binding and antimicrobial studies on rhodium(II) complexes of dicyandiamide, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 39 (2020) 923–942.  
<https://doi.org/10.1080/15257770.2020.1722164>.
- [106] L. Dubicki, R.L. Martin, The Metal-Metal Bond in Binuclear Rhodium(II) Acetate Monohydrate<sup>1</sup>, *Inorg. Chem.* 9 (1970) 673–675.  
<https://doi.org/10.1021/ic50085a049>.
- [107] G. Wang, Y. Ma, Y. Tong, X. Dong, Synthesis, characterization and magnetorheological study of 3-aminopropyltriethoxysilane-modified  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles, *Smart Mater. Struct.* 25 (2016) 0. <https://doi.org/10.1088/0964-1726/25/3/035028>.
- [108] F.Y. Zhao, Y.L. Li, L.H. Li, Preparation and characterization of magnetite nanoparticles, *Appl. Mech. Mater.* 618 (2014) 24–27.  
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.618.24>.
- [109] M. Mouallem-Bahout, S. Bertrand, O. Peña, Synthesis and characterization of  $\text{Zn}_{1-x}\text{Ni}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$  spinels prepared by a citrate precursor, *J. Solid State Chem.* 178 (2005) 1080–1086. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2005.01.009>.
- [110] E.G. Palacios, A.J. Monhemius, Infrared spectroscopy of metal carboxylates: I. Determination of free acid in solution, *Hydrometallurgy.* 62 (2001) 135–143.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(01\)00187-6](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(01)00187-6).
- [111] R.J.H. Clark, A.J. Hempleman, Infrared and Raman Spectroscopy of the

- Dirhodium Tetraacetate Complexes  $\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4$ ,  $\text{Rh}_2(\text{180}_2\text{CCH}_3)_4$ ,  $\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CCD}_3)_4$  and  $\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2$ , 61 (1988) 313–329.
- [112] A. Narmani, K. Yavari, J. Mohammadnejad, Imaging, biodistribution and in vitro study of smart  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -PAMAM G4 dendrimer as novel nano-complex, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 159 (2017) 232–240.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.089>.
- [113] D.S. Deutsch, A. Siani, P.T. Fanson, H. Hirata, S. Matsumoto, C.T. Williams, M.D. Amiridis, FT-IR investigation of the thermal decomposition of poly(amidoamine) dendrimers and dendrimer-metal nanocomposites supported on  $\text{Al}_2\text{O}_3$  and  $\text{ZrO}_2$ , *J. Phys. Chem. C*. 111 (2007) 4246–4255.  
<https://doi.org/10.1021/jp065853d>.
- [114] S.W. Da Silva, T.F.O. Melo, M.A.G. Soler, E.C.D. Lima, M.F. Da Silva, P.C. Morais, Stability of Citrate-Coated Magnetite and Cobalt-Ferrite Nanoparticles Under Laser Irradiation: A Raman Spectroscopy Investigation, *IEEE Trans. Magn.* 39 (2003) 2645–2647. <https://doi.org/10.1109/TMAG.2003.815540>.
- [115] R.J.H. Clark, A.J. Hempleman, Infrared, Raman and pre-resonance Raman spectroscopy of  $\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{S}(\text{CH}_2\text{Ph})_2)_2$ , *J. Mol. Struct.* 197 (1989) 105–112.
- [116] R.J.H. Clark, A.J. Hempleman, Infrared, raman, resonance raman, and excitation profile studies of  $\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4\text{L}_2$  ( $\text{L} = \text{AsPh}_3, \text{SbPh}_3$ ), *Inorg. Chem.* 28 (1989) 92–96. <https://doi.org/10.1021/ic00300a021>.
- [117] R.J.H. Clark, A.J. Hempleman,  $\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{PPh}_3)_2$ , (1988) 2225–2229.
- [118] K. Shin, Kyeong-Sook Shin, Robin J. H. Clark, and Jeffrey I. Zink, (1989) 4244–4250.
- [119] R.J.H. Clark, A.J. Hempleman, H.M. Dawes, M.B. Hursthouse, C.D. Flint,

- Dirhodium(II,II) tetra-acetate complexes with axially co-ordinated triphenylstibine, triphenylarsine, and dibenzyl sulphide ligands. The syntheses, properties, and X-ray crystal structures of  $[\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CMe})_4(\text{SbPh}_3)_2]$ ,  $[\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CMe})_4(\text{AsPh}_3)_2]$ , and..., *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* (1985) 1775–1780. <https://doi.org/10.1039/DT9850001775>.
- [120] F.A. Cotton, Y. Kim, J. Lu,  $[\text{Rh}_2(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4(\text{TCNE})]$ , polymers: isomers with either 1,1- or trans-1,2- TCNE bridges, *Inorganica Chim. Acta.* 221 (1994) 1–4.
- [121] J. Hu, Y. Cheng, Y. Ma, Q. Wu, T. Xu, Host-guest chemistry and physicochemical properties of the dendrimer-mycophenolic acid complex, *J. Phys. Chem. B.* 113 (2009) 64–74. <https://doi.org/10.1021/jp8078919>.
- [122] A. Zaghmi, A.A. Greschner, E. Mendez-Villuendas, J.Y. Liu, H.W. de Haan, M.A. Gauthier, Determination of the degree of PEGylation of protein bioconjugates using data from proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Data Br.* 25 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104037>.
- [123] V.A. Jiménez, K. Marrugo, C.H. Campos, J.B. Alderete, C.C. Torres, Copper metallic nanoparticles capped with PEGylated PAMAM-G3 dendrimers for the catalytic reduction of low solubility nitroarenes of pharmaceutical interest, *Catal. Today.* 372 (2021) 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.11.011>.
- [124] M.V. Gomez, J. Guerra, A.H. Velders, R.M. Crooks, NMR characterization of fourth-generation PAMAM dendrimers in the presence and absence of palladium dendrimer-encapsulated nanoparticles (*Journal of the American Chemical Society* (2009) 131, (341-350)), *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 15564. <https://doi.org/10.1021/ja907940x>.
- [125] R. Głaszczka, J. Jaźwiński, Complexation of selenomethionine and its derivatives with some dimeric rhodium(II) tetracarboxylates:  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic



- resonance spectroscopy, *J. Mol. Struct.* 1198 (2019) 126908.  
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.126908>.
- [126] C. Kojima, K. Kono, K. Maruyama, T. Takagishi, Synthesis of polyamidoamine dendrimers having poly(ethylene glycol) grafts and their ability to encapsulate anticancer drugs, *Bioconjug. Chem.* 11 (2000) 910–917.  
<https://doi.org/10.1021/bc0000583>.
- [127] V.A. Jiménez, K. Marrugo, C.H. Campos, J.B. Alderete, C.C. Torres, Copper metallic nanoparticles capped with PEGylated PAMAM-G3 dendrimers for the catalytic reduction of low solubility nitroarenes of pharmaceutical interest, *Catal. Today.* 372 (2021) 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.11.011>.
- [128] J.S. Choi, K. Nam, J.Y. Park, J. Bin Kim, J.K. Lee, J.S. Park, Enhanced transfection efficiency of PAMAM dendrimer by surface modification with l-arginine, *J. Control. Release.* 99 (2004) 445–456.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.07.027>.
- [129] A.F. Ciftja, A. Hartono, H.F. Svendsen, Carbamate formation in aqueous - Diamine - CO<sub>2</sub> systems, *Energy Procedia.* 37 (2013) 1605–1612.  
<https://doi.org/10.1016/j.egypro.2013.06.036>.
- [130] M. Ahmadzadeh, C. Romero, J. McCloy, Magnetic analysis of commercial hematite, magnetite, and their mixtures, *AIP Adv.* 8 (2018) 056807.  
<https://doi.org/10.1063/1.5006474>.
- [131] E. Ferrari, F. da Silva, M. Knobel, Influence of the distribution of magnetic moments on the magnetization and magnetoresistance in granular alloys, *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* 56 (1997) 6086–6093.  
<https://doi.org/10.1103/PhysRevB.56.6086>.
- [132] I.J. Bruvera, P. Mendoza Zélis, M. Pilar Calatayud, G.F. Goya, F.H. Sánchez,

- Determination of the blocking temperature of magnetic nanoparticles: The good, the bad, and the ugly, *J. Appl. Phys.* 118 (2015) 184304.  
<https://doi.org/10.1063/1.4935484>.
- [133] J.S. Lee, J.M. Cha, H.Y. Yoon, J.K. Lee, Y.K. Kim, Magnetic multi-granule nanoclusters: A model system that exhibits universal size effect of magnetic coercivity, *Sci. Rep.* 5 (2015) 12135. <https://doi.org/10.1038/srep12135>.
- [134] A. Boni, A.M. Basini, L. Capolupo, C. Innocenti, M. Corti, M. Cobianchi, F. Orsini, A. Guerrini, C. Sangregorio, A. Lascialfari, Optimized PAMAM coated magnetic nanoparticles for simultaneous hyperthermic treatment and contrast enhanced MRI diagnosis, *RSC Adv.* 7 (2017) 44104–44111.  
<https://doi.org/10.1039/c7ra07589h>.
- [135] M. Cobianchi, A. Guerrini, M. Avolio, C. Innocenti, M. Corti, P. Arosio, F. Orsini, C. Sangregorio, A. Lascialfari, Experimental determination of the frequency and field dependence of Specific Loss Power in Magnetic Fluid Hyperthermia, *J. Magn. Magn. Mater.* 444 (2017) 154–160.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2017.08.014>.
- [136] H. Mamiya, H. Fukumoto, J.L. Cuya Huaman, K. Suzuki, H. Miyamura, J. Balachandran, Estimation of Magnetic Anisotropy of Individual Magnetite Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia, *ACS Nano.* 14 (2020) 8421–8432.  
<https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02521>.
- [137] O.C. Farokhzad, R. Langer, Impact of nanotechnology on drug delivery, *ACS Nano.* 3 (2009) 16–20. <https://doi.org/10.1021/nn900002m>.
- [138] R.A. Jain, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices, *Biomaterials.* 21 (2000) 2475–2490.  
[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00115-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00115-0).

- [139] J. Sun, Z. Yang, L. Teng, Nanotechnology and Microtechnology in Drug Delivery Systems, Dose-Response. 18 (2020) 1–2.  
<https://doi.org/10.1177/1559325820907810>.
- [140] G. Damia, L. Imperatori, M. Stefanini, M. D’Inacai, Sensitivity of CHO mutant cell lines with specific defects in nucleotide excision repair to different anti-cancer agents, *Int. J. Cancer*. 66 (1996) 779–783. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19960611\)66:6<779::AID-IJC12>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19960611)66:6<779::AID-IJC12>3.0.CO;2-Z).
- [141] S. Marrache, R.K. Pathak, S. Dhar, Detouring of cisplatin to access mitochondrial genome for overcoming resistance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 10444–10449. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405244111>.
- [142] M.L.B. Carneiro, E.S. Nunes, R.C.A. Peixoto, R.G.S. Oliveira, L.H.M. Lourenço, I.C.R. da Silva, A.R. Simioni, A.C. Tedesco, A.R. de Souza, Z.G.M. Lacava, S.N. Bão, Free Rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate magnetic carriers as potential strategies for breast cancer therapy, *J. Nanobiotechnology*. 9 (2011) 1–17. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-11>.