



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado e Doutorado

Síntese e caracterização de nanopartículas de Au modificadas para contraste multifuncional

Osmar Ignacio Ayala Cáceres

Orientador: Marco Utrera Martines

Co-orientadora: Adriana Pereira Duarte

Campo Grande, 2021



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Programa de Pós-Graduação em Química – Mestrado e Doutorado

Síntese e caracterização de nanopartículas de Au modificadas para contraste multifuncional

Osmar Ignacio Ayala Cáceres

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
como um dos requisitos para obtenção
do título de Doutor em Química

Área de Concentração: Química Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Utrera Martines

Co-orientadora: Profa. Dra. Adriana Pereira Duarte

Campo Grande

2021

***“A verdadeira motivação vem de realização, desenvolvimento pessoal,
satisfação no trabalho e reconhecimento.”***

Frederick Herzberg

***Dedicado a Creuza Maria, uma grande parceira, amiga e
uma grande mulher, a minha filha Giselle, uma grande inspiração
e a minha família maravilhosa.***

AGRADECIMENTOS

A Deus pela possibilidade de desenvolvimento pessoal: material, espiritual e intelectual.

A minha família pelo carinho e apoio incondicional.

Aos Professores Doutores Adriana Pereira Duarte e Marco Antonio Utrera Martines pela orientação, paciência e sincera amizade.

A todos os professores do Instituto de Química da UFMS pelas inestimáveis contribuições para minha formação.

Aos órgãos financiadores: CNPq, CAPES e FUNDECT – MS.

A todos os colegas da pós-graduação em Química da UFMS.

A todos os colegas dos Laboratórios de Pesquisa do Instituto de Química – UFMS, principalmente aos que fazem parte do LP6.

Aos amigos do grupo QSMB por contribuir com os seus conhecimentos e fazer agradável o trabalho com seu bom humor.

RESUMO

Técnicas de diagnóstico por imagem contribuem ativamente no aumento da expectativa de vida mundial. Elas apresentam características atraentes e evoluem constantemente. No entanto, às vezes resulta necessária a utilização de agentes de contraste para uma melhor visualização das áreas afetadas por determinadas patologias. O trabalho desenvolvido apresenta nanopartículas de ouro recobertas com uma camada de sílica que contém corante fluorescente modificado e complexo DTPA-Gd³⁺ (Dietilenotriaminopentacetato de gadolínio III) ligado à superfície. As nanopartículas sintetizadas podem desempenhar o papel de contraste em duas das técnicas de diagnóstico por imagem mais utilizadas na atualidade: Tomografia Computadorizada (CT) e Imagem por Ressonância Magnética (MRI). Além do mais, a adição de corante fluorescente modificado oferece a possibilidade de monitorar a distribuição das nanopartículas por Imagem de Fluorescência (FI). Nanopartículas de ouro apresentam algumas vantagens em relação aos compostos utilizados atualmente como agentes de contraste em CT. A modificação do corante fluorescente Rodamina B por meio da reação de esterificação com N-Hidroxissuccimida (NHS) para obter Succinimidil Rodamina B (SRB) visa a obtenção de compostos com emissão em comprimentos de onda maiores a partir de compostos luminescentes mais acessíveis. O recobrimento das nanopartículas de ouro com uma camada de sílica visa fornecer: i) uma superfície apta para a ligação do complexo DTPA-Gd³⁺, complexo já em uso clínico como agente de contraste exógeno para MRI; ii) uma separação entre ouro e fluoróforo para evitar o fenômeno de supressão da luminescência e; iii) contornar problemas de biocompatibilidade. O ligante DTPA foi modificado por sililação com 3-Cloropropiltriétoxissilano (CPTES) para obter grupos OH para ligar à superfície da sílica. Foram sintetizadas nanopartículas de ouro de tamanhos entre 5-30 nm caracterizadas por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS). Rodamina B foi modificada para Succinil Rodamina B caracterizadas por Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio 1 e carbono 13 (¹H NMR e ¹³C NMR), Intensificação sem Distorção por Transferência de Polarização a 135° (DEPT 135) e Espectroscopia no Ultravioleta e Visível (UV-vis). Os resultados de diâmetro de nanopartículas recobertas obtidos por DLS sugerem a formação de uma camada de sílica de aproximadamente 3,5 nm (± 6 nm) de espessura. A modificação do ligante DTPA para obtenção de DTPA sililado (Sil-DTPA) foi caracterizada por FTIR. Testes imaginológicos por Raios X (mamografia) e por RMI sugerem que as nanopartículas sintetizadas se mostram promissoras como agentes de contraste multifuncional.

Palavras chave: *Nanopartículas de ouro. Agentes de contraste. Tomografia Computadorizada. Imagem por Ressonância Magnética. Imagem por Fluorescência.*

ABSTRACT

Diagnostic Imaging Techniques actively contribute for the increase of life expectancy worldwide. They have attractive features and constantly evolve. However, sometimes it is necessary to use contrast agents for a better visualization of the affected areas in certain pathologies. The work developed presents gold nanoparticles coated with a layer of silica that contains modified fluorescent dye and DTPA-Gd³⁺ (Diethylenetriaminepentaacetate gadolinium III) complex bonded to the surface. Synthesized nanoparticles can play the role as contrast in two of the most used diagnostic imaging techniques: Computed Tomography (CT) and Resonance Magnetic Imaging (MRI). Furthermore, the addition of modified fluorescent dye offers the possibility to monitor the nanoparticles distribution by Fluorescence Imaging (FI). Gold nanoparticles show some advantages compared to the compounds currently used as contrast agents in CT. Modification of fluorescent dye Rhodamine B (RB) by esterification reaction with N-Hydroxysuccinimide (NHS) to obtain Succinimidyl Rhodamine B (SRB) aims to obtain compounds with emission in larger wavelength from more accessible compounds. Coating of gold nanoparticles with a layer of silica aims to provide: i) a suitable surface for complex DTPA-Gd³⁺ bonding, already in clinical use as MRI exogenous contrast agent; ii) a separation between gold and fluorophore to prevent photobleaching phenomena; iii) to bypass biocompatibility issues. DTPA ligand was modified by silylation with 3-Chloropropyltriethoxysilane (CPTES) in order to get OH groups capable to bond to silica surface. Gold nanoparticles with size of 5-30 nm were synthesized and characterized by Dynamic Light Scattering (DLS). Rhodamine B was modified to obtain Succinimidyl Rhodamine B characterized by Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR), Nuclear Magnetic Resonance of Hydrogen 1 and Carbon 13 (¹H NMR e ¹³C NMR), Distortionless Enhancement by Polarization Transfer at 135° (DEPT 135) and Ultraviolet and visible Spectroscopy (UV-vis). The results of coated nanoparticles obtained by DLS suggest the formation of a layer of silica of 3,5 nm (± 6 nm) thick. Modification of DTPA ligand to obtain silylated DTPA (Syl-DTPA) was characterized by FTIR. Imaging tests by X-ray (mammography) and RMI suggest that synthesized nanoparticles are promising as multifunctional contrast agents.

Keywords: *Gold nanoparticles. Contrast agents. Computed Tomography. Magnetic Resonance Imaging. Fluorescence Imaging.*

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Expectativa de vida.....	14
1.2. Técnicas de Diagnóstico por Imagem.....	17
1.2.1. Tomografia Computadorizada.....	18
1.2.1.1. Contrastes para Tomografia Computadorizada.....	18
1.2.1.2. Desvantagens dos agentes de contraste iodados.....	19
1.2.1.3. Nanopartículas como alternativa.....	19
1.2.2. Imagem por Ressonância Magnética.....	20
1.3. Imagem por Fluorescência.....	22
1.4. Agentes de contraste multifuncionais baseados em nanomateriais de ouro.....	24
1.5. Sílica.....	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Objetivo Geral.....	28
2.2. Objetivos Específicos.....	28
3. METODOLOGIA.....	29
3.1. Síntese de nanopartículas de ouro.....	30
3.1.1. Núcleos de ouro.....	30
3.1.2. Solução de crescimento.....	31
3.1.3. Crescimento dos núcleos.....	32
3.2. Modificação do corante rodamina B.....	33
3.3. Recobrimento das nanopartículas de ouro.....	34
3.4. Modificação do ligante DTPA.....	35
3.5. Síntese de complexo Gd ³⁺ -DTPA modificado.....	37
3.6. Ancoragem do complexo Gd ³⁺ -DTPA-Sil na nanopartícula de ouro.....	38
3.7. Caracterizações.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1. Primeira Etapa: Preparação dos núcleos de ouro.....	41
4.1.1. Síntese das Nanopartículas de Ouro.....	41
4.2. Segunda Etapa: Modificação do Corante Fluorescente Rodamina B....	47
4.2.1. Espectroscopia no Infravermelho.....	47
4.2.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	48

4.2.2.1.	Espectroscopia de RMN de ^1H	48
4.2.2.2.	Espectroscopia de RMN ^{13}C e DEPT 135.....	52
4.2.2.3.	Espectroscopia UV-visível.....	55
4.3.	Terceira Etapa: Recobrimento das nanopartículas de ouro.....	56
4.4.	Quarta Etapa: Modificação do ligante DTPA.....	58
4.4.1.	Espectro no infravermelho.....	59
4.5.	Testes Imagenológicos.....	60
4.5.1.	Raios X.....	60
4.5.2.	Imagem por Ressonância Magnética Nuclear.....	61
5.	CONCLUSÕES.....	64
6.	PERSPECTIVAS.....	65
7.	REFERÊNCIAS.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Expectativa de vida no mundo em 2019.....	14
Figura 2 – Evolução da expectativa de vida 1770 – 2019.....	15
Figura 3 – Evolução da expectativa de vida no Brasil 1900 – 2019.....	16
Figura 4 - Estrutura das moléculas iodadas utilizadas como agentes de contraste CT. (A) Diatrizoato (iônico), (B) Iopromida (não iônico).....	18
Figura 5 – Coeficientes de atenuação mássico de alguns materiais em função da energia na região do raio X.....	20
Figura 6 – Agentes de contraste utilizados na Ressonância Magnética. Magnevist® à esquerda da Bayer e Dotarem® da Geubet.....	22
Figura 7 – Diagrama de Jablonski simplificado.....	23
Figura 8 – Estrutura molecular da Rodamina B.....	24
Figura 9 - Representação Esquemática da Síntese.....	30
Figura 10 - Representação Esquemática da Síntese de núcleos de ouro (Solução A).....	31
Figura 11 – Representação esquemática da preparação da Solução de Crescimento.....	32
Figura 12 – Representação esquemática do crescimento dos núcleos resultando nas soluções B, C e D.....	33
Figura 13 – Reação de modificação de Rodamina B.....	33
Figura 14 – Representação esquemática da modificação do corante.....	34
Figura 15 – Representação esquemática do recobrimento das nanopartículas.....	35
Figura 16 – Reação da modificação do ligante DTPA.....	36
Figura 17 – Representação esquemática da metodologia para a modificação do ligante.....	37
Figura 18 – Representação esquemática da síntese do complexo.....	38
Figura 19 – Representação esquemática da ancoragem do complexo na nanopartícula.....	39
Figura 20 - Mudança na cor da solução após adição de NBH4. Solução de ouro e citrato à esquerda. A mesma solução após adição do agente redutor à direita.....	42
Figura 21 - Gráfico de distribuição de nanopartículas de ouro (Solução A) feitas em triplicata por DLS. Foram realizadas 14 varreduras para cada medida da mesma solução.....	43

Figura 22 - Gráfico de distribuição de nanopartículas de ouro (Solução B) feitas em triplicata por DLS. Foram realizadas 14 varreduras para cada medida da mesma solução.....	45
Figura 23 - Gráfico de distribuição de nanopartículas de ouro (Solução C) feitas em triplicata por DLS. Foram realizadas 14 varreduras para cada medida da mesma solução.....	46
Figura 24 - Gráfico de distribuição de nanopartículas de ouro (Solução D) feitas em triplicata por DLS. Foram realizadas 14 varreduras para cada medida da mesma solução.....	46
Figura 25 – Espectro no Infravermelho de Rodamina B (RB) (acima) e de Succinimidil Rodamina B RB) (embaixo).....	47
Figura 26 - Espectros de RMN ¹ H de Rodamina B (RB) e Succinil Rodamina B (SRB) com as atribuições nas estruturas químicas de cada molécula.....	49
Figura 27 - Espectros de RMN ¹³ C e DEPT 135 Rodamina B (RB) e Succinil Rodamina B (SRB) com as atribuições nas estruturas químicas de cada molécula.....	53
Figura 28 – Espectro UV-visível de Rodamina B e Succinimidil rodamina B em acetonitrila.....	55
Figura 29 - Representação da troca sequencial no processo de recobrimento.....	57
Figura 30 - Gráfico de distribuição de tamanho de nanopartículas de ouro recobertas medidas feitas em triplicata por DLS. Foram realizadas 14 varreduras para cada medida da mesma solução.....	58
Figura 31 - Espectros no Infravermelho de DTPA (acima) e DTPA sililado (embaixo) com as principais atribuições de bandas.....	59
Figura 32 - Imagens de Raios X obtidas por mamógrafo de soluções coloidais de nanopartículas com e sem recobrimento. A- nanopartículas de 20 nm, B- nanopartículas de 30 nm e C- nanopartículas recobertas. À esquerda imagem realizada a 40 mAs, à direita 80 mAs. Ambas a 22 kV.....	60
Figura 33 - Imagens de Raios X obtidas por mamógrafo de solução coloidal de nanopartículas de ouro recobertas com sílica (A) e água (B) realizada a 28 kV e 80 mAs.....	61
Figura 34 – Imagem por Ressonância Magnética em T1 de nanopartículas de 30 nm, o branco está indicado com uma seta. Gráfico de Intensidade de branco em função da concentração de Gd ³⁺ (à direita).....	62
Figura 35 – Imagem por Ressonância Magnética em T1 de nanopartículas de 60 nm, o branco está indicado com uma seta. Gráfico de Intensidade de branco em função da concentração de Gd ³⁺ (à direita).....	63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Relação de reagentes utilizados.....	29
Tabela 2 - Proporção das soluções utilizadas.....	32
Tabela 3 - Proporção das soluções utilizadas e os diâmetros resultantes.....	44
Tabela 4 – Atribuição do espectro de RMN ¹ H de Rodamina B.....	51
Tabela 5 - Atribuição do espectro de RMN ¹ H de Succinimidil Rodamina B. Destacado os sinais presentes no espectro de SRB ausentes no espectro de RB.....	52

ABREVIATURAS

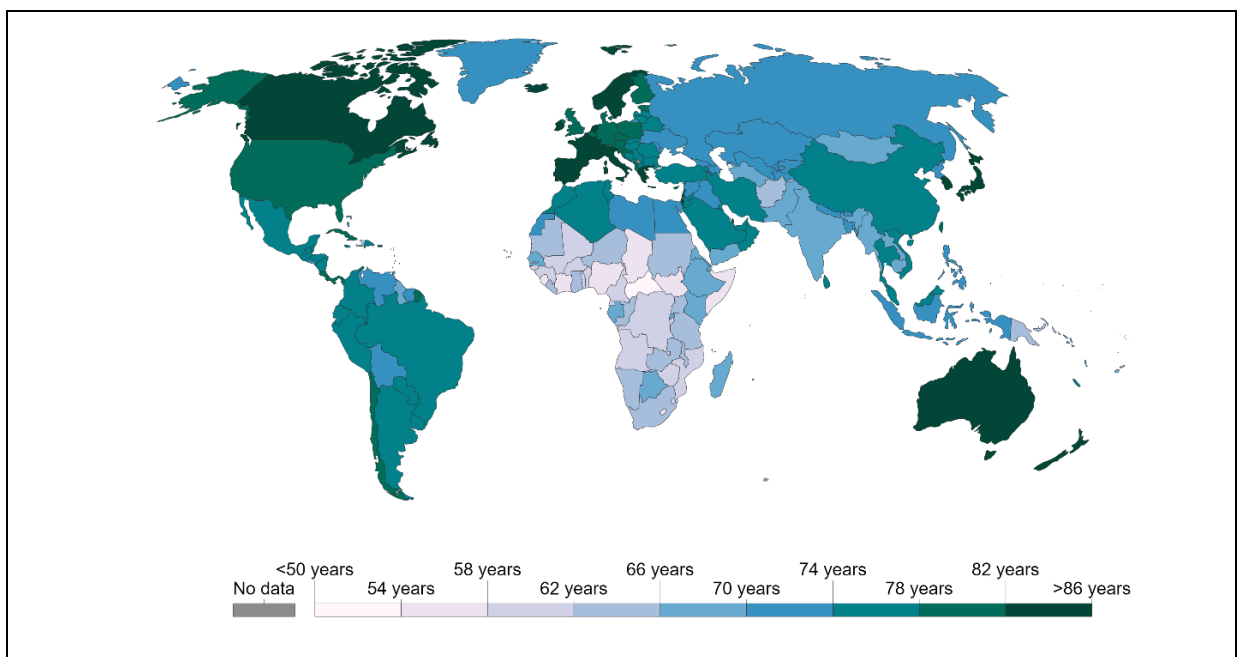
- CT – *Computed Tomography* - Tomografia Computadorizada
- MRI – *Magnetic Resonance Imaging* - Imagem de Ressonância Magnética
- FI – *Fluorescence Imaging* - Imagem por Fluorescência
- EMI Ltd – *Electric & Music Industries Limited* - Indústrias Musicais e Elétricas Limitada
- Au – *Gold* - Ouro
- I – *Iodine* - Iodo
- NMR – *Nuclear Magnetic Resonance* - Ressonância Magnética Nuclear
- Mn – *Manganese* - Manganês
- Fe – *Iron* - Ferro
- Gd – *Gadolinium* - Gadolínio
- DPTA - *Diethylenetriaminopentaacetic acid* - Ácido Dietilenotriaminopentaacético
- DOTA - *Dodecanetetraacetic acid* - Ácido Dodecanotetraacético
- DNA - *Deoxyribonucleic acid* - Ácido Desoxirribonucleico
- NADH - *Nicotinamide Adenine Dinucleotide + Hydrogen* - Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina + Hidrogênio
- SERS – *Surface Enhancement Raman Scattering* - Espalhamento Raman Intensificado por Superfície
- NHS – *N-Hydroxysuccinimide* - N-Hidroxisuccinimida
- APTES – *3-Aminopropyltriethoxysilane* - 3-Aminopropiltriétoxisilano
- CTAB – *Cetyltrimethylammonium Bromide* - Brometo de Cetiltrimetilamônio
- MPTES – *3-Mercaptopropyltriethoxysilane* - 3-Mercaptopropiltriétoxisilano
- TEOS – *Tetraethyl Orthosilicate* - Tetraetil Ortosilicato
- SRB – *Succinimidyl Rhodamine B* - Succinimidil Rhodamine B
- DCC – *N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide* - N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
- DLS – *Dynamic Light Scattering* - Espalhamento de Luz Dinâmico
- FT-IR - *Fourier Transformed Infrared* - Infravermelho por Transformada de Fourier
- DEPT 135 – *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer at 135°* - Intensificação sem Distorção por Transferência de Polarização a 135°

1. INTRODUÇÃO

1.1. Expectativa de vida

Um dos principais desafios da ciência é oferecer à humanidade longevidade acompanhada de qualidade de vida. Uma maneira de avaliar se esse objetivo está sendo conseguido é observar a expectativa de vida dos seres humanos no planeta. Constitui também uma forma de avaliar a saúde da população, pois existe uma relação direta entre a saúde e expectativa de vida. Existe ainda hoje inequidade na expectativa de vida (KIM & KIM, 2018), as últimas estimativas (2019) apontam uma diferença notável de aproximadamente 30 anos entre os países de África Central e o Japão, apenas como exemplo. Esse fato mostra que em países muito desenvolvidos a expectativa de vida é muito superior (HO & HENDI, 2018), fenômeno observável na Figura 1.

Figura 1 – Expectativa de vida no mundo em 2019



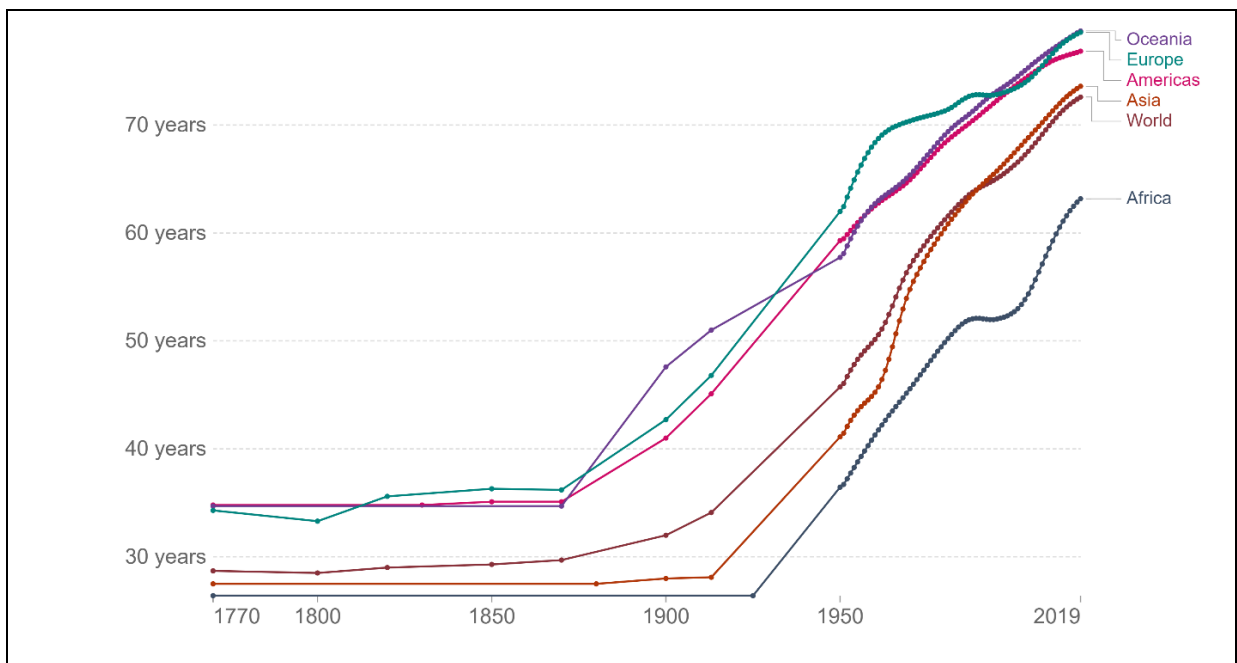
Fonte: RILEY (2005), CLIO INFRA (2015) e UN POPULATION DIVISION (2019)

Obviamente, a expectativa de vida é resultado de uma série de fatores associados que incluem fatores muito diversos como hábitos alimentares, carga genética de cada região do mundo, fatores culturais etc. No entanto, o fato de que os habitantes de países desenvolvidos vivam mais sugere que o desenvolvimento em certas áreas como a pesquisa científica desempenhe um papel de importância. Isto acontece porque nos países com mais recursos (econômicos e de material humano

capacitado) a pesquisa científica está focada em oferecer justamente qualidade de vida e um aspecto fundamental para isso é o aumento na qualidade da saúde da população (RANABHAT et al., 2018).

A distribuição da expectativa de vida nos continentes habitados (excetuando Antártida, pois é desabitada) segue a tendência já discutida, onde a maior expectativa se encontra concentrada nos continentes com a maior quantidade de países desenvolvidos. Continentes como Oceania (com expectativa de vida de 78,7 anos), Europa (78,6 anos) lideram devido ao fato anteriormente citado. Seguidos pelas Américas com 76,8 anos, continentes nos quais os países desenvolvidos que elevam a medida são Canadá, Estados Unidos, Chile, Brasil, México e Argentina. Ásia com 73,6 anos é a seguinte, ênfase em Japão e Coreia do Sul mas com o acelerado desenvolvimento da China é de se esperar que em poucos anos a diferença entre Ásia e as Américas diminua consideravelmente. Finalmente se encontra África com uma expectativa de vida de 63,2 anos deixando a expectativa de vida global em 72,6 anos (ROSER; ORTIZ-OSPINA; RITCHIE, 2013).

Figura 2 – Evolução da expectativa de vida 1770 - 2019



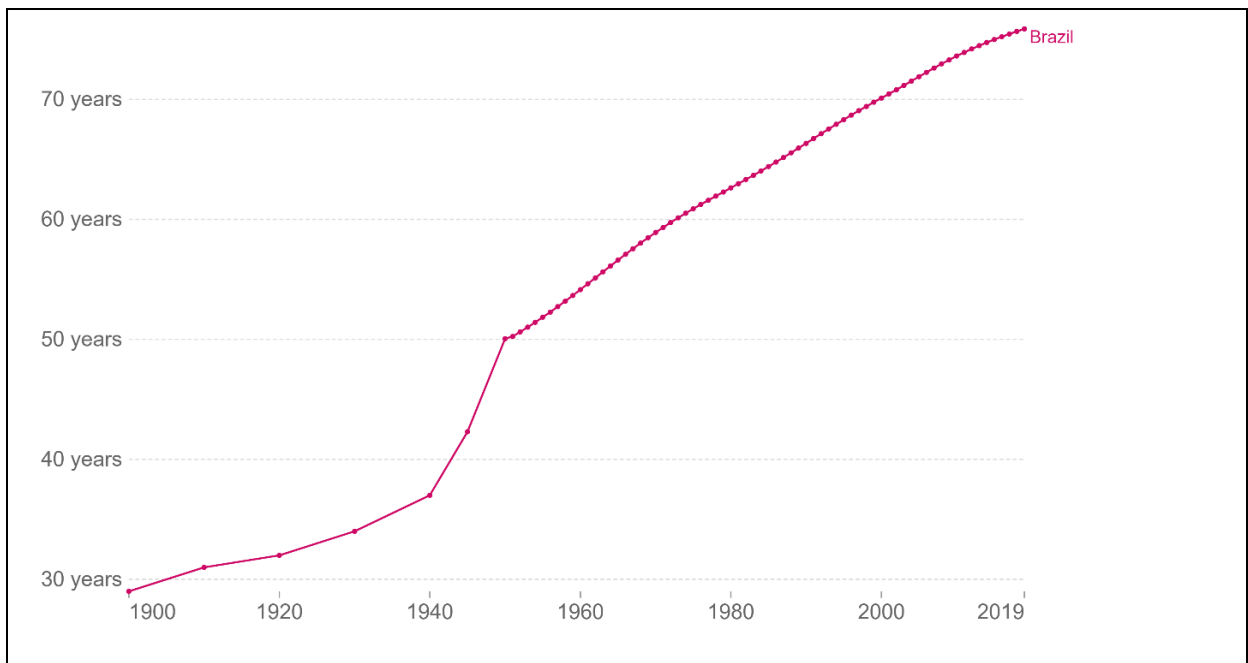
Fonte: RILEY (2005), CLIO INFRA (2015) e UN POPULATION DIVISION (2019)

Na Figura 2 é possível notar que a expectativa de vida no mundo inteiro tem aumentado consideravelmente desde os finais do século XVIII onde ela variava de 26 – 35 anos até a variação atual entre 72 – 79. Historicamente a variação tem sido

mínima, até que a humanidade conseguiu progressos importantes na área da saúde. Esta transição com o concomitante aumento notável da expectativa de vida se deu em momentos diferentes para cada região do mundo mas aconteceu em todas e a partir desses progressos a tendência de aumento tem se mantido.

Brasil, acompanhando essa tendência mundial tem aumentado a expectativa de 29 anos em 1900 para praticamente 76. A maior variação se teve na década de 1940 onde a expectativa subiu de 37 anos para 50 em 1950, uma variação de 13 anos. A partir dali, a expectativa de vida no Brasil tem aumentado constantemente até os dias de hoje, o que pode ser observado na Figura 3.

Figura 3 – Evolução da expectativa de vida no Brasil 1900 – 2019



Fonte: RILEY (2005), CLIO INFRA (2015) e UN POPULATION DIVISION (2019)

Como já foi dito, esse aumento é multifatorial, porém é inegável que os progressos na área médica, farmacêutica, química e biológica desempenham um papel de extrema importância para que essa característica aumente. Todas essas áreas do conhecimento humano se encaixam no conhecimento científico e tem como característica principal o fato de serem intimamente interligadas.

Os progressos obtidos na Farmácia além do descobrimento de novos compostos com atividade biológica encontrados na natureza também estão relacionados com os avanços nos processos de síntese química que fornecem novos compostos com atividade biológica (CAMPOS et al., 2019), modificando os naturais

para fazê-los mais eficazes ou com o auxílio de programas computacionais desenhando fármacos com atividade específica (SCHNEIDER et al., 2020; PAUL et al., 2021). Isso permite aos profissionais da saúde contar com um arsenal mais eficiente e diversificado na hora de enfrentar os quadros patológicos que afetam os indivíduos ou as populações (epidemias ou pandemias) (JAMSHIDI et al., 2020). A melhora no tratamento trazida por esses novos fármacos é importante mas a complementação com os avanços na prevenção é fundamental. No campo da prevenção, os avanços da Química nos processos de degradação de substâncias potencialmente tóxicas (fármacos, defensivos agrícolas, poluentes em geral) contribui muito (DE MARCO et al., 2019). Outro campo que tem uma contribuição alta é o campo de Diagnóstico médico, pois a detecção de patologias em estágios incipientes melhora sensivelmente o prognóstico para o paciente (LO et al., 2006; LEDDA; SENIA & RAPISARDA, 2018).

Uma característica interessante do Diagnóstico é que conta com técnicas de diagnóstico que têm avançado notavelmente, até o ponto de serem importantes tanto na prevenção, com diagnósticos cada vez mais precoces e precisos, quanto no tratamento, com a possibilidade de fazer um seguimento da evolução do paciente se utilizando dessas técnicas. Dentre essas técnicas têm se destacado as técnicas que utilizam imagens (FUCHS & SOX, 2001) geradas pela produção de certos fenômenos físicos ou físico-químicos (Raios X, Eletromagnetismo, Fluorescência), sendo classificadas como Técnicas de Diagnóstico por Imagem.

1.2. Técnicas de Diagnóstico por Imagem

As Técnicas de Diagnóstico por Imagem são as ferramentas que mais tem evoluído para o auxílio da ciência médica nos últimos anos auxiliando no diagnóstico de várias doenças tais como câncer, diabetes, e inclusive para a avaliação de tratamentos (CHOU et al., 2015; DE CLERCK et al., 2015; VAN DIJKEN et al., 2017). Dentre elas se destacam a Tomografia Computadorizada (CT), a Imagem de Ressonância Magnética (MRI) e a Imagem por Fluorescência (FI). Essas técnicas compartilham algumas características atraentes tais como: serem indolores, serem não invasivas, com necessidade de pouca ou nenhuma preparação do paciente, não danificar os tecidos investigados, possuírem alta resolução e fácil processamento das imagens (SCHWENZER et al., 2009; CARAVAN et al., 1999; LAKOWICZ, 2006)

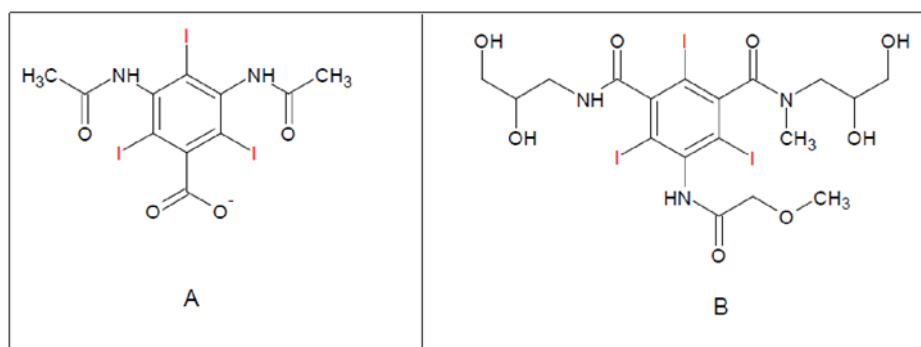
1.2.1. Tomografia Computadorizada

O escâner TC foi desenvolvido por Godfrey Hounsfield quando trabalhava na Electric and Musical Industries (EMI Ltd.) e o primeiro teste clínico utilizando um protótipo (Mark I) foi realizado em 1972 (ISHERWOOD, 2005). Essa técnica é utilizada hoje em dia rotineiramente para diagnóstico de patologias, avaliação de evolução do tratamento e ajuda na escolha do tratamento.

1.2.1.1. Contrastes para Tomografia Computadorizada

A resolução da CT é superior à apresentada pelas radiografias convencionais. No entanto, existe a dificuldade de distinguir as sutis diferenças entre tecidos moles do organismo, porque apresentam densidade eletrônica similar e conseqüentemente coeficientes de atenuação linear de raios X também similares. Devido a esse fato é necessária a administração de agentes exógenos de contraste para contornar esse inconveniente (YU & WATSON, 1999). Esses agentes de contraste exibem diferente especificidade dependendo dos tecidos, delimitando melhor o contraste entre os tecidos (KALENDER, 2006). Atualmente são utilizadas suspensões de sulfato de bário (BaSO_4) como contraste para estudos no sistema digestivo (seu uso restrito obedece à toxicidade dos íons Ba^{2+}) e como agentes injetáveis compostos aromáticos iodados solúveis em água, dois dos quais podem ser visualizados na Figura 4 (YU & WATSON, 1999; CHRISTIANSEN, 2005).

Figura 4 - Estrutura das moléculas iodadas utilizadas como agentes de contraste CT. (A) Diatrizoato (iônico), (B) Iopromida (não iônico)



Fonte: Autoria própria

1.2.1.2. *Desvantagens dos agentes de contraste iodados*

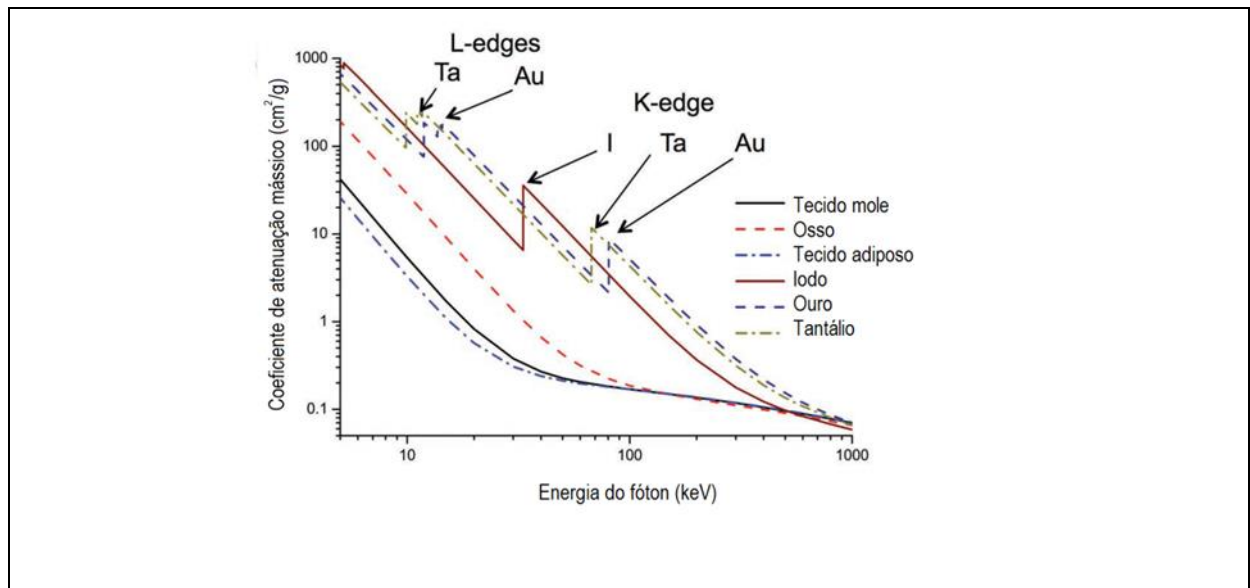
Os agentes de contraste iodados apresentam algumas desvantagens: a) tempo de circulação curto dentro do organismo vivo porque são rapidamente excretados pelos rins devido ao baixa massa molecular e, b) podem acontecer reações adversas severas devido às suas altas osmolaridade e viscosidade (WANG et al., 2007; COCHRAN, 2009).

1.2.1.3. *Nanopartículas como alternativa*

A nanotecnologia trouxe grandes avanços nesse sentido apresentando nanomateriais que se mostram adequados para aplicações biológicas. Nanopartículas estabilizadas mostram circulação sanguínea prolongada podendo acumular em tumores graças ao efeito de permeação e retenção aumentadas (PEER et al., 2007). Elas também constituem plataformas ideais para o design de agentes de contraste multifuncionais, pois é possível a modificação da sua superfície (LEE, CHOI & HYEON, 2013; LIU, AI & LU, 2012). O grande desafio para a preparação de agentes de contraste para CT é satisfazer simultaneamente os seguintes critérios: biocompatibilidade, alta qualidade contrastante, baixo custo, tamanho, tempo prolongado de circulação *in vivo*, estabilidade coloidal a longo prazo em condições fisiológicas.

Um interessante grupo de agentes de contraste nanoparticulados são os baseados em metais, por exemplo ouro (Au). O número atômico do ouro é maior do que do iodo ($^{79}\text{Au} > ^{53}\text{I}$) e por isso a atenuação de raios X é maior no ouro, situação que se pode observar na Figura 5.

Figura 5 – Coeficientes de atenuação mássico de alguns materiais em função da energia na região do raio X.



Fonte: Adaptado de LEE, CHOI & HYEON (2013)

O ouro também apresenta outras vantagens em relação ao iodo como agente de contraste para CT (HAINFELD, et al., 2006), pois o empacotamento nas nanoestruturas de ouro pode conter uma grande quantidade do agente de contraste (Au) diminuindo a concentração de agente que deve ser injetado. Além disso, o tamanho e formato das nanopartículas de ouro podem ser controlados no processo de síntese e a superfície das nanopartículas pode ser modificada por grupos funcionais.

1.2.2. Imagem por Ressonância Magnética

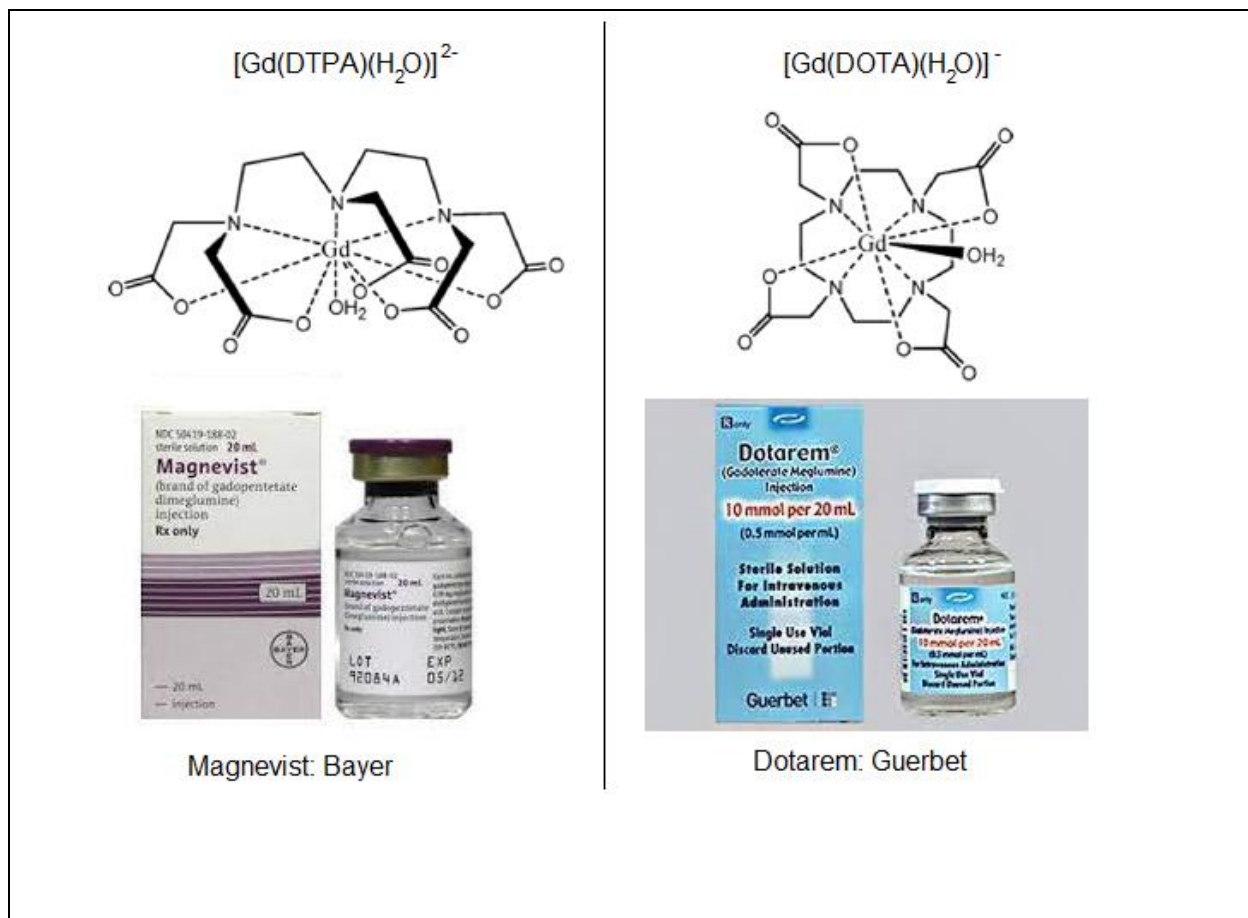
A Imagem por Ressonância Magnética (MRI), diferentemente da CT não utiliza radiações ionizantes, se baseia no fenômeno de Ressonância Magnética Nuclear (NMR), propriedade física de núcleos de determinados elementos que, na presença de um forte campo magnético externo (B_0) e excitados por uma radiofrequência específica denominada frequência de Larmor emitem outra radiofrequência que pode ser detectada e convertida em imagem (FRIEDMAN et al., 1989; DALE, BROWN & SEMELKA, 2015).

Os primeiros estudos foram efetuados em 1946 por dois grupos independentes, que estudaram esse fenômeno em sólidos e líquidos respectivamente (PURCELL, TORREY & POUND, 1946; BLOCH, HANSEN & PACKARD, 1946). Estudos feitos

entre o final da década dos 60 e o começo da década dos 70 mostravam que T_1 (tempo de relaxação 1) é maior em tecidos tumorais que em tecidos normais (DAMADIAN, 1971). Também pertencem à década de 70 as primeiras imagens publicadas produzidas utilizando a técnica (LAUTERBUR, 1973). As primeiras imagens de uma parte do corpo humano foram produzidas por Peter Mansfield em Nottingham e apresentadas em um encontro do Conselho de Pesquisa Médica (Inglaterra) em 1976.

A intensidade do sinal no MRI depende das taxas de relaxação dos prótons presentes nas moléculas de água. Diferenças entre os ambientes químicos em que as moléculas de água se encontram fornecem o contraste inerente no MRI, no entanto, às vezes esse contraste não é suficiente para distinguir o tecido normal do tecido afetado por alguma doença (CARAVAN, 2006). A administração de agentes de contraste que contêm íons metálicos paramagnéticos que afetam as taxas de relaxação das moléculas de água vizinhas aumentam o contraste inerente. Dentre os íons metálicos paramagnéticos (Mn^{2+} , Mn^{3+} , Fe^{3+} e Gd^{3+}), o último é mais frequentemente utilizado devido aos seus sete elétrons desemparelhados e o tempo prolongado de relaxação eletrônica (CARAVAN, 1999). No entanto, o íon Gd^{3+} em solução aquosa apresenta alta toxicidade e precisa de complexação com ligantes orgânicos antes de seu uso *in vivo* (KUMAR & TWEEDLE, 1993). Alguns dos complexos poliaminocarboxilados de gadolínio utilizados como agentes de contraste são observados na Figura 6.

Figura 6 – Agentes de contraste utilizados na Ressonância Magnética. Magnevist® à esquerda da Bayer e Dotarem® da Guerbet



Fonte: Compilação do autor¹

¹Montagem a partir de imagens coletadas nos sites da Bayer e da Guerbet

1.3. Imagem por Fluorescência

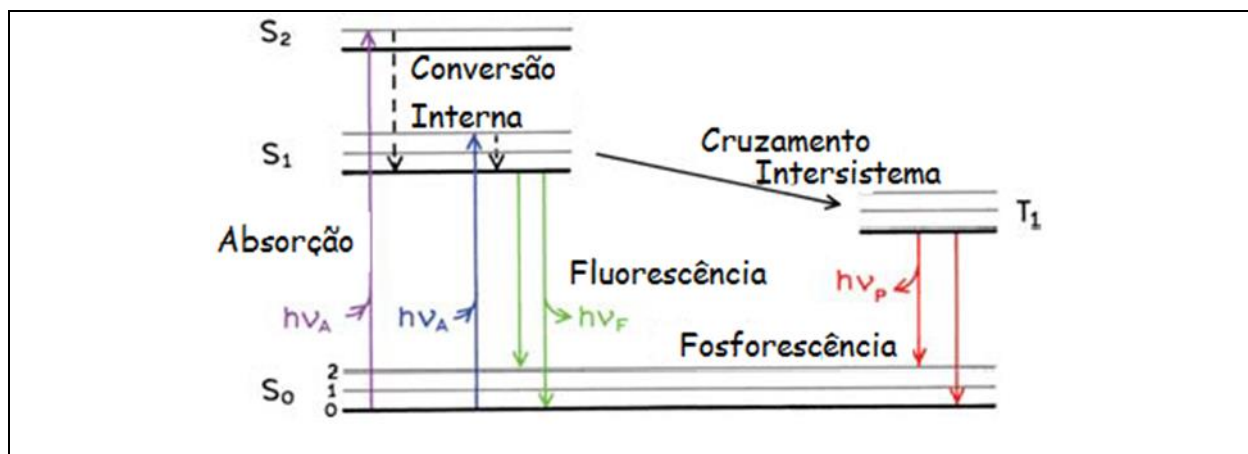
Nos últimos anos o uso da fluorescência nas ciências biológicas vem crescendo notavelmente. Apenas para citar algumas metodologias utilizadas hoje em biotecnologia baseadas no fenômeno de fluorescência: citometria de fluxo, sequenciamento de DNA, análise forense, análise genética e diagnóstico médico (MCKINNON, 2018; SMITH et al.,1986; MENZEL, 2006). Uma das áreas em que o uso da fluorescência cresceu muito é a imagem de células e moléculas.

A fluorescência é um tipo de luminescência. A luminescência é a emissão de fótons por uma substância na faixa visível, que ocorre a partir de estados eletrônicos excitados. Em compostos orgânicos a luminescência é dividida em duas categorias: fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado. Na

fluorescência, a emissão de luz parte de estados singletos excitados, o elétron no orbital excitado está pareado (spin oposto) com o elétron no orbital do estado fundamental. Conseqüentemente, a volta do elétron excitado para o estado fundamental é permitida por spin e acontece rapidamente por emissão de um fóton. O tempo de vida (τ), o tempo médio entre a excitação e o retorno ao estado fundamental, de um fluoróforo é geralmente de 10 ns (10×10^{-9} s). Na fosforescência, a emissão de luz parte de estados tripletos excitados, o elétron no estado excitado tem a orientação de spin igual ao elétron do estado fundamental, a transição eletrônica é proibida e conseqüentemente a emissão é mais lenta e o tempo de vida maior, da ordem de milissegundos a segundos (ms a s) (LAKOWICZ, 2006).

Os processos que acontecem em compostos orgânicos entre a absorção e a emissão de luz podem ser ilustrados pelo diagrama de Jablonski na figura 7 (JABLONSKI, 1935; FRACKOWIAK, 1988).

Figura 7 – Diagrama de Jablonski simplificado



Fonte: Adaptado de FRACKOWIAK (1988)

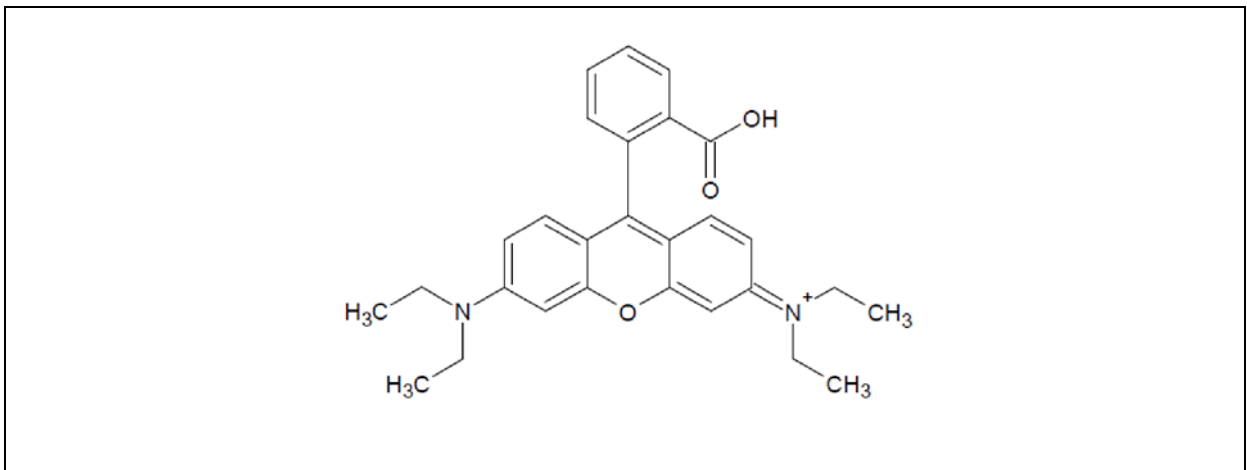
Como se pode observar na Figura 7, geralmente a energia de emissão é menor que a de absorção fazendo com que a fluorescência aconteça a maiores comprimentos de onda. Esse fenômeno foi observado por Stokes em 1852. O deslocamento do espectro de absorção e de emissão das substâncias fluorescentes é denominado de deslocamento Stokes em sua homenagem (STOKES, 1852).

As substâncias que apresentam fluorescência são denominadas fluoróforos. As substâncias fluoróforas podem ser divididas em duas grandes classes: intrínsecas e extrínsecas. Os fluoróforos intrínsecos são aqueles que ocorrem na natureza:

aminoácidos aromáticos, NADH, flavinas, clorofila. Fluoróforos extrínsecos são adicionados às amostras quando não há fluorescência ou para mudar as propriedades espectrais da amostra: dansyl, fluoresceína, rodamina, etc. O processo de adição de fluoróforos extrínsecos às amostras se denomina marcação.

Rodaminas (Figura 8) e fluoresceínas são amplamente utilizadas como marcadores extrínsecos, principalmente por dois motivos: a) diferentemente do dansyl as duas famílias citadas não são sensíveis à polaridade do solvente e b) apresentam coeficientes de extinção molar altos ($\sim 80000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Figura 8 – Estrutura molecular da Rodamina B



Fonte: Autoria própria

1.4. Agentes de contraste multifuncionais baseados em nanomateriais de ouro

O desenvolvimento de agentes de contraste multifuncionais com capacidade de fornecer simultaneamente sinais para mais de uma técnica de diagnóstico tem aumentado nos últimos anos. A obtenção de múltiplas modalidades de imagem com a utilização de apenas um agente de contraste possibilita aos profissionais médicos coletar maior quantidade e mais variadas informações e também permite uma maior adesão dos pacientes, pois diminui a quantidade de processos preparatórios (MAHAN & DOIRON, 2018).

As nanopartículas de ouro são consideradas uma plataforma atraente para o desenvolvimento de agentes de contraste multifuncionais (HAINFELD et al., 2006; POPOVTZER et al., 2008). Uma das abordagens mais utilizadas é a combinação entre as nanopartículas de ouro e complexos de gadolínio(III), aliando dessa forma a

atenuação de raios X na faixa de energia utilizada na clínica que oferece as nanopartículas de ouro e os complexos já utilizados como contraste para MRI (MAHAN & DOIRON, 2018). Vários trabalhos desenvolveram essa parceria de nanopartículas de ouro com complexos de gadolínio(III) visto que essa combinação modifica dois fatores muito importantes para o aumento do contraste em MRI: aumentando a relaxividade e aumentando a concentração de gadolínio. O aumento da relaxividade é conseguido pela desaceleração do movimento rotacional do complexo fazendo com que a frequência do campo magnético alternado diminua a valores perto da frequência de Larmor. A desaceleração é obtida via a incorporação de uma estrutura maciça, comparativamente com o complexo, como uma nanopartícula. Nanopartículas também oferecem uma grande área superficial o que permite uma concentração maior do complexo (PERRY, BOTNAR & WILTON-ELY, 2020).

Dentre essas pesquisas se encontram:

- 1) Ancoragem de nanopartículas de ouro a uma estrutura organometálica de gadolínio utilizando ácido poliacrílico (PAA) para ligar as nanopartículas à estrutura organometálica, o composto mostrou um aumento de contraste para MRI frente ao complexo utilizado atualmente Magnevist® e uma atenuação de raios X similar ao Omnipaque® (ioexol, contraste iodado não iônico) (TIAN et al., 2015);
- 2) Síntese de dendrímeros com 'clusters' de ouro, íons de gadolínio e polietilenoglicol (PEG) mostrando um aumento no contraste para CT e MRI em fígado, rins e bexiga dos ratos injetados (WEN et al., 2013);
- 3) Síntese de dendrímeros com núcleo de nanopartículas de ouro de 4,0 nm utilizando poliaminoamida de quinta geração modificada com complexo de gadolínio (III) e polietilenoglicol, mostrando um aumento no contraste de CT e MRI em tumores dos ratos injetados (CHEN et al., 2013);
- 4) Nanopartículas de ouro como núcleo encapsuladas em uma malha composta por cadeias de complexos de gadolínio (III) e DTDTPA (ditioldietilenotriaminopentacetato) ligadas por ligações dissulfeto, mostrando aumento na circulação sanguínea sem efeitos de cumulação em órgãos como pulmão, rins nos ratos injetados (ALRIC et al., 2008);

- 5) Núcleos de ouro ligados a complexo DOTA e gadolínio (III) via ditiocarbamato etc (CHABLOZ et al., 2019).

Outra combinação explorada é a de nanopartículas de ouro e substâncias fluorescentes. Uma das desvantagens dessa combinação é a foto-supressão da emissão dos fluoróforos por parte do ouro, por conta disso, a maioria dos trabalhos tentaram contornar esse inconveniente recobrimo as nanopartículas.

Entre esses trabalhos podemos citar:

- 1) Nanobastões de ouro recobertos de sílica mesoporosa contendo verde de indocianina tem mostrado aumento na fluorescência até 12 horas depois da injeção em ratos devido à liberação controlada do fluoróforo dos mesoporosa da sílica (LUO et al., 2011);
- 2) Nanobastões de ouro ligados com cianina 5 via aptâmero e polietilenoglicol, se mostrando como potencialmente útil como agente teragnóstico em câncer (GALLINA et al., 2016);
- 3) Nanopartículas de ouro funcionalizadas com rodamina modificada com ditiol para SERS (Espalhamento Raman Intensificado por Superfície) e FI (Imagem por Fluorescência) em mitocôndrias (ELING et al., 2017).

1.5. Sílica

Sílica é um termo geral que se refere a compostos de dióxido de silício (SiO_2) encontrados na natureza na forma de quartzo, areia ou na composição de rochas da crosta terrestre. Ela é utilizada na indústria na fabricação de vidros, cimento, cerâmica etc (HEANEY; PREWITT & GIBBS, 2018).

Como mencionado anteriormente, uma das abordagens utilizadas para contornar a foto-supressão na combinação de nanopartículas ou nanobastões de ouro com substâncias fluorescentes é o recobrimento com uma camada de sílica. Outra característica da sílica constitui a sua biocompatibilidade e tem sido utilizada para essa finalidade como recobrimento de nanopartículas magnéticas (ARRUEBO et al., 2006; JIA et al., 2019), biopolímeros (ALLOUCHE et al., 2006) e micelas (HUO et al., 2006; VOLSI et al., 2018) e uma variedade de materiais (BARROSO et al., 2019).

O desenvolvimento de agentes de contraste multifuncionais utilizando nanopartículas de ouro associadas a uma substância fluorescente e um complexo de gadolínio(III) pode ser útil para melhorar o diagnóstico, oferecendo maior informação para os profissionais médicos.

Apresentando nanopartículas de ouro como alternativa para contornar as desvantagens apresentadas pelos agentes iodados utilizados na atualidade. Trabalhos de síntese de nanopartículas de ouro têm sido desenvolvidos no grupo de pesquisa em combinação com fármacos (LOPES, 2017) e de síntese de nanopartículas de óxido de tântalo para utilização como agente teragnóstico (MEZACASA, 2020).

A utilização de sílica como material de recobrimento, que além de conferir biocompatibilidade, pode diminuir o efeito de foto-supressão da emissão fluorescente exibida pelo ouro. Todavia, devido a possibilidade de modificar a superfície da sílica permite a ligação do complexo de gadolínio(III).

Dessa maneira pode se obter um agente de contraste para três técnicas por imagem: Tomografia Computadorizada, Ressonância Magnética e Fluorescência (CT, RMI e FI). Um agente multifuncional com essas características pode ser útil para a medicina, pois permite a coleta simultânea de imagens oferecendo mais informação de diferentes técnicas. A modificação de substâncias fluorescentes mais acessíveis (Rodamina B) para deslocar a sua emissão para comprimentos de onda maiores pode se mostrar interessante buscando alternativas economicamente mais convenientes, pois pode servir como modelo para a modificação de outros fluoróforos.

Estudando as pesquisas que desenvolveram nanopartículas bifuncionais podemos supor que o desenvolvimento de um agente de contraste trifuncional nanoparticulado para diagnóstico por imagem pode ser útil.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolvimento de nanopartículas multifuncionais para aplicação como contraste em técnicas de diagnóstico por imagem.

2.2. Objetivos Específicos

1. Síntese de nanopartículas de ouro.
2. Recobrimento das nanopartículas de ouro com sílica densa.
3. Inclusão de SRB (Succinil Rodamina B) dentro da camada de sílica densa
4. Modificação do ligante DTPA
5. Síntese do complexo DTPA-Gd
6. Ligação do complexo modificado à superfície recoberta da nanopartícula
7. Caracterização por técnicas adequadas em cada uma das etapas de síntese

3. METODOLOGIA

Os reagentes utilizados estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 – Relação de reagentes utilizados

Reagente	Fórmula	Pureza (%)	Marca
Tetracloroaurato de hidrogênio	$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	≥99,9	Sigma-Aldrich
Citrato trissódico	$\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	≥99,0	Sigma-Aldrich
Borohidreto de sódio	NaBH_4	≥98,0	Sigma-Aldrich
Brometo de cetiltrimetilamônio	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{Br})(\text{CH}_3)_3$	≥98,0	Sigma-Aldrich
L-Ácido ascórbico	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	≥98,0	Sigma-Aldrich
L-Arginina	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$	98,5	Vetec
Ciclohexano	C_6H_{12}	99,8	Vetec
3-Mercaptopropiltrióxissilano	$\text{HS}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_3$	≥80,0	Sigma-Aldrich
Tetraetilortossilicato	$\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$	98,0	Sigma-Aldrich
Rodamina B	$\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_3$	≥97,0	Fluka
N-hidroxissuccinimida	$\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$	98,0	Sigma-Aldrich
N,N'-diciclohexilcarbodiimida	$\text{C}(\text{NC}_6\text{H}_{11})_2$	99,0	Sigma-Aldrich
Acetonitrila	CH_3CN	99,5	Vetec
Ácido dietilenotriaminopentaacético	$[(\text{HOOCCH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2]_2\text{NCH}_2\text{COOH}$	≥99,0	Sigma-Aldrich
3-Cloropropiltrióxissilano	$\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_3$	≥97,0	Sigma-Aldrich
Tolueno anidro	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$	99,8	Sigma-Aldrich
Hidreto de sódio	NaH	95,0	Sigma-Aldrich
Etanol anidro	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	99,8	Dinâmica
Nitrato de gadolínio	$\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	99,9	Sigma-Aldrich
Pentano	C_5H_{12}	99,9	Vetec
Dietil éter	$(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}$	99,0	Vetec

Fonte: Autoria própria

Para uma melhor compreensão da metodologia adotada, uma representação esquemática é mostrada na Figura 9. O trabalho foi dividido em 6 etapas: 1) síntese de nanopartículas de ouro, 2) modificação do corante luminescente, 3) recobrimento das nanopartículas com sílica contendo corante, 4) modificação do ligante, 5) síntese de complexo ligante-gadolínio, 6) ancoragem do complexo à superfície da nanopartícula recoberta. No esquema não aparece a modificação do ligante e a ancoragem aparece no esquema completo à esquerda.

Figura 9 - Representação Esquemática da Síntese



Fonte: Autoria própria

3.1. Síntese de nanopartículas de ouro

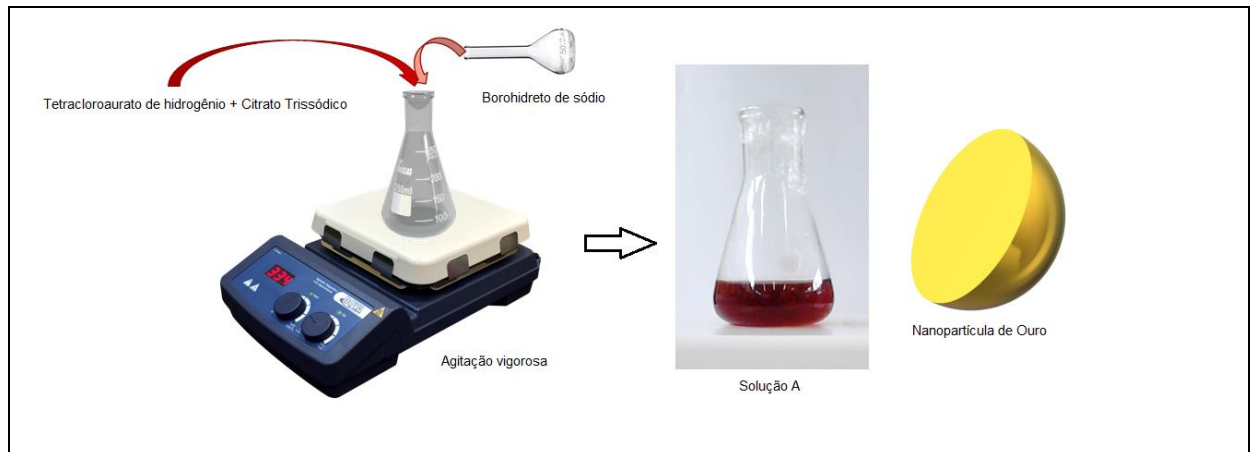


Para a síntese de nanopartículas de ouro foi utilizada a metodologia de crescimento de núcleos (sementes) de ouro (JANA, GEARHEART & MURPHY, 2001). Nesta abordagem primeiro foi preparada uma solução de núcleos de ouro e uma solução de crescimento, que foram misturadas em diferentes proporções para se obter nanopartículas com diâmetros maiores.

3.1.1. Núcleos de ouro

Foram preparados 20,0 mL de uma solução aquosa de tetracloroaurato de hidrogênio ($\text{H}[\text{AuCl}_4]$) $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e citrato trissódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ sob agitação magnética vigorosa em um Erlenmeyer. A seguir, foram adicionados 0,6 mL de solução aquosa de borohidreto de sódio (NaBH_4) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. A solução de borohidreto de sódio foi de preparação recente e em banho de gelo. Imediatamente após a adição da solução de borohidreto de sódio, a solução se tornou de cor avermelhada, indicando a formação de nanopartículas de ouro. Essa solução de núcleos de ouro foi denominada de solução A. Na Figura 10 pode se observar a representação esquemática.

Figura 10 - Representação Esquemática da Síntese de núcleos de ouro (Solução A)

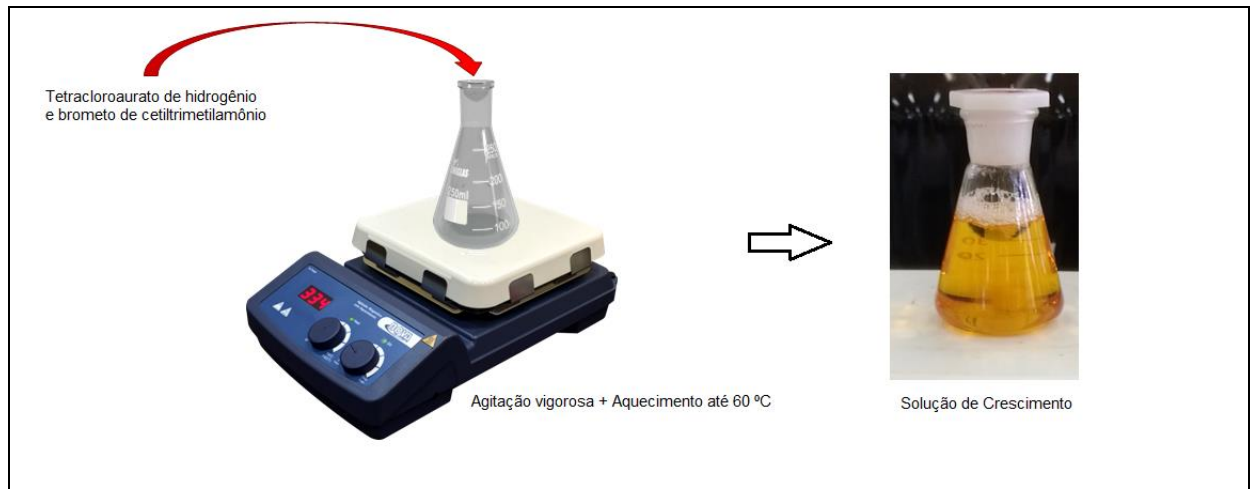


Fonte: Autoria própria

3.1.2. Solução de crescimento

Foram preparados 30,0 mL de uma solução aquosa de tetracloroaurato de hidrogênio $2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ sob agitação magnética vigorosa. A seguir, foram adicionados 0,87 g de brometo de cetiltrimetilamônio ($\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{BrN}$) (CTAB). A solução foi aquecida lentamente a partir da temperatura ambiente numa razão de $1 \text{ }^\circ\text{C}$ por minuto até que a solução adquirisse uma coloração laranja, o que aconteceu aproximadamente à temperatura de $60 \text{ }^\circ\text{C}$. A solução foi deixada arrefecer a temperatura ambiente. O processo pode ser observado na Figura 11.

Figura 11 – Representação esquemática da preparação da Solução de Crescimento



Fonte: Autoria própria

3.1.3. Crescimento dos núcleos

Para o crescimento dos núcleos foram utilizados os volumes de soluções indicados na tabela 2.

Tabela 2 - Proporção das soluções utilizadas

Solução	Volume Solução de Crescimento (mL)	Volume Solução A (mL)	Volume Solução B (mL)	Volume Solução ácido ascórbico (mL)
B	7,5	2,5	--	0,05
C	9,0	1,0	--	0,05
D	9,0	--	1,0	0,05

Fonte: Autoria própria

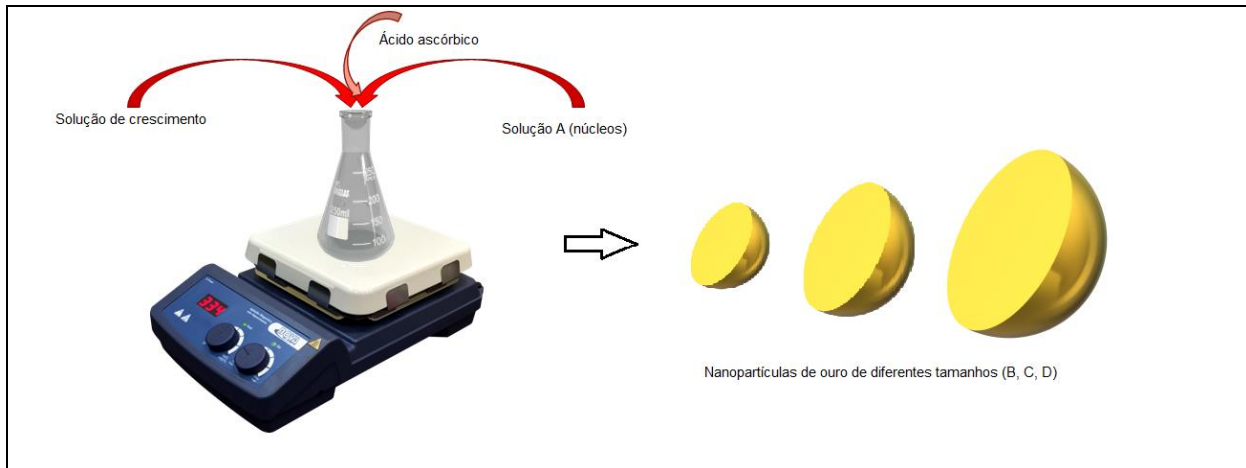
Em um Erlenmeyer, sob agitação magnética vigorosa, foram adicionados 7,5 mL de solução de crescimento e 0,05 mL de ácido ascórbico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ recém preparado. A seguir, foram adicionados 2,5 mL de solução de núcleos (A). Essa solução foi denominada solução B.

Em um Erlenmeyer, sob agitação magnética vigorosa, foram adicionados 9,0 mL de solução de crescimento e 0,05 mL de ácido ascórbico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ recém preparado. A seguir, foram adicionados 1,0 mL de solução de núcleos (A). Essa solução foi denominada solução C.

Em um Erlenmeyer, sob agitação magnética vigorosa, foram adicionados 9,0 mL de solução de crescimento e 0,05 mL de ácido ascórbico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ recém

preparada. A seguir, foram adicionados 1,0 mL de solução de núcleos (C). Essa solução foi denominada solução D. Na Figura 12 é possível observar a representação gráfica dos processos.

Figura 12 – Representação esquemática do crescimento dos núcleos resultando nas soluções B, C e D

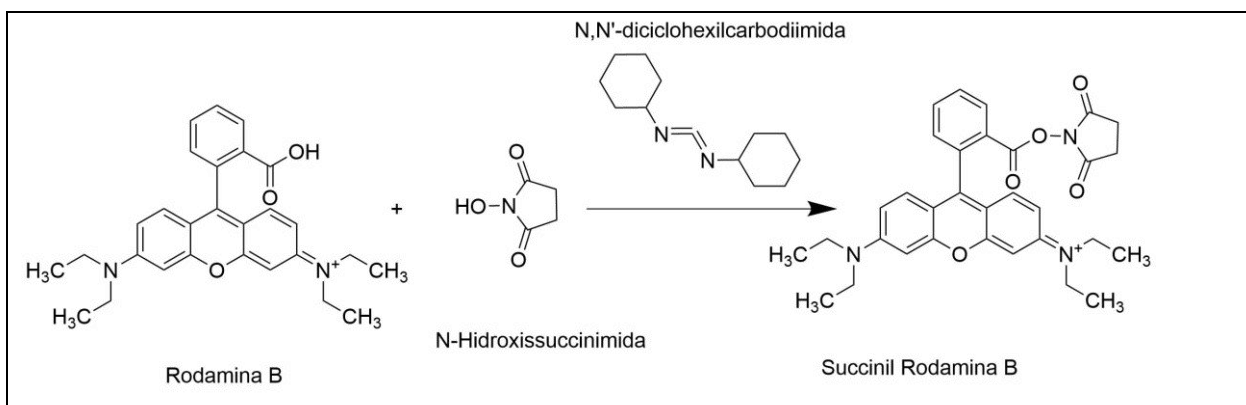


Fonte: Autoria própria

3.2. Modificação do corante rodamina B

Para a modificação do corante fluorescente rodamina B foi utilizada a reação de esterificação com N-Hidroxissuccinimida (NHS) (MENG et al., 2007). Reação mostrada na Figura 13.

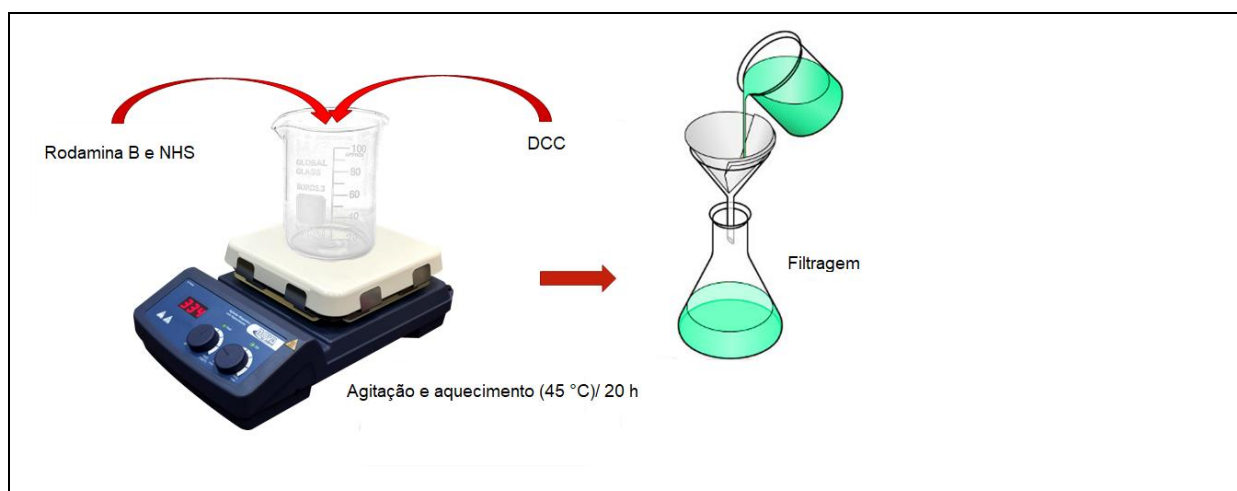
Figura 13 – Reação de modificação de Rodamina B



Fonte: Autoria própria

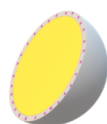
Em um frasco Erlenmeyer, dissolveram-se 2,4 g de rodamina B (RB) e 0,6 g de N-hidroxissuccinimida (NHS) em 100,0 mL de acetonitrila. Em outro frasco Erlenmeyer, dissolveram-se também 1,2 g de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) em 50,0 mL de acetonitrila. A solução de DCC foi lentamente adicionada à solução de RB e NHS, sob agitação magnética e aquecimento de 45 °C. Manteve-se a agitação e o aquecimento a 45 °C por 1 hora. A solução reacional foi mantida sob agitação e a temperatura ambiente por 20 horas. Passado esse período a solução foi filtrada e depois deixada para evaporação do solvente e obtenção de cristais verde escuro de Succinimidil Rodamina B (SRB). O processo se encontra esquematizado na Figura 14.

Figura 14 – Representação esquemática da modificação do corante



Fonte: Autoria própria

3.3. Recobrimento das nanopartículas de ouro

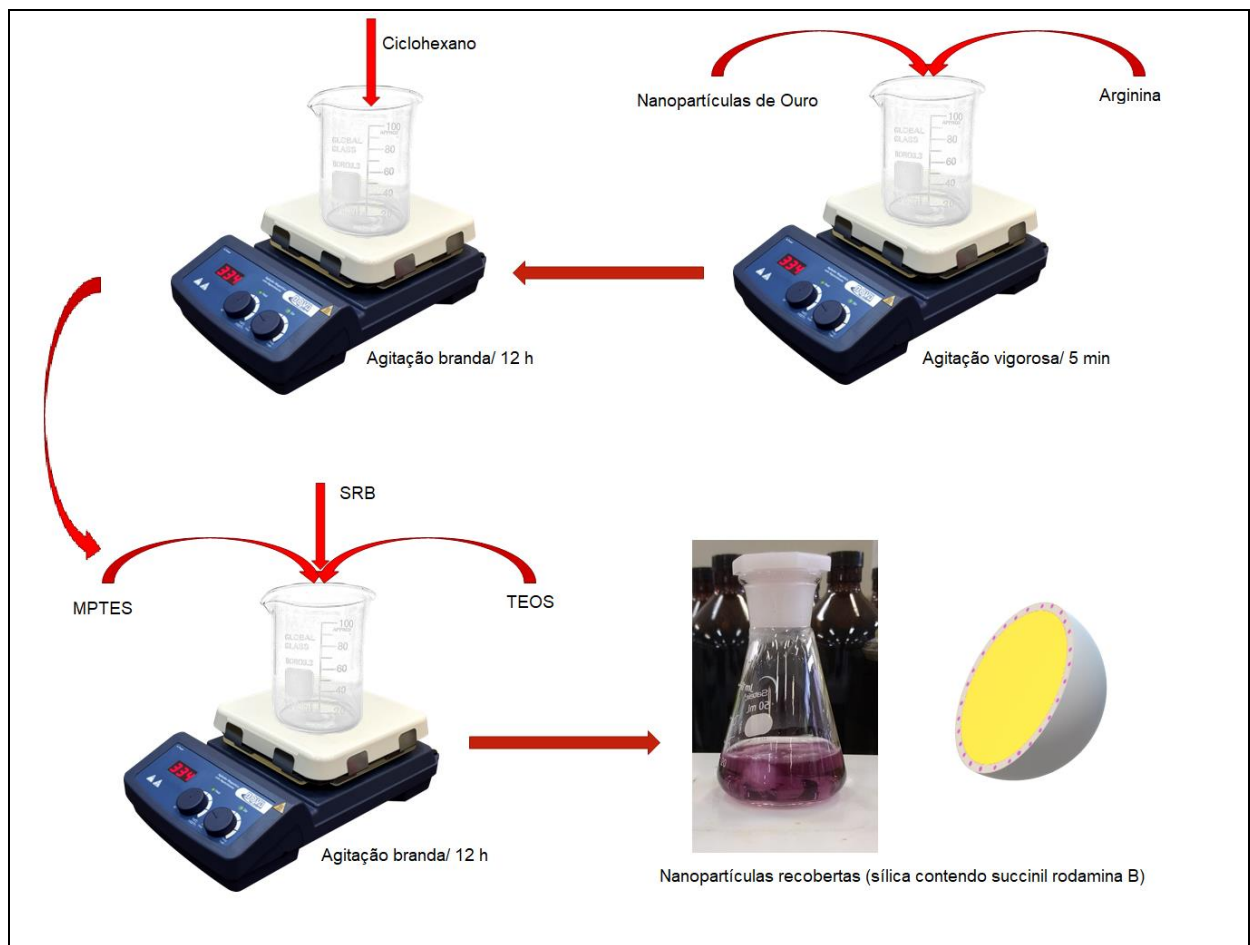


O recobrimento das nanopartículas de ouro com diferentes diâmetros adaptou-se da metodologia de troca sequencial de ligantes (SCHULZENDORF et al., 2011).

Em 4 frascos Erlenmeyer contendo 20,0 mL das soluções A, B, C e D; sob agitação magnética vigorosa foram adicionados 0,5 mL de solução aquosa de L-arginina ($C_6H_{14}N_4O_2$) $2,7 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Após 5 minutos a agitação foi diminuída para agitação branda e foram adicionados lentamente 5,0 mL de ciclohexano. Sob essas

condições foi observada a formação de duas fases: superior (orgânica) e inferior (aquosa). Foram adicionados 6,2 μL de 3-mercaptopropiltrióxissilano (3-MPTES) gota a gota na fase superior. A solução bifásica foi mantida sob agitação branda por 12 h. Transcorrido esse período, foram adicionados 6,2 μL de tetraetilortossilicato (TEOS) e $6,4 \times 10^{-4}$ g de Succinimidil Rodamina B (SRB), a agitação branda foi mantida por 12 h. A metodologia utilizada se encontra esquematizada na Figura 15.

Figura 15 – Representação esquemática do recobrimento das nanopartículas

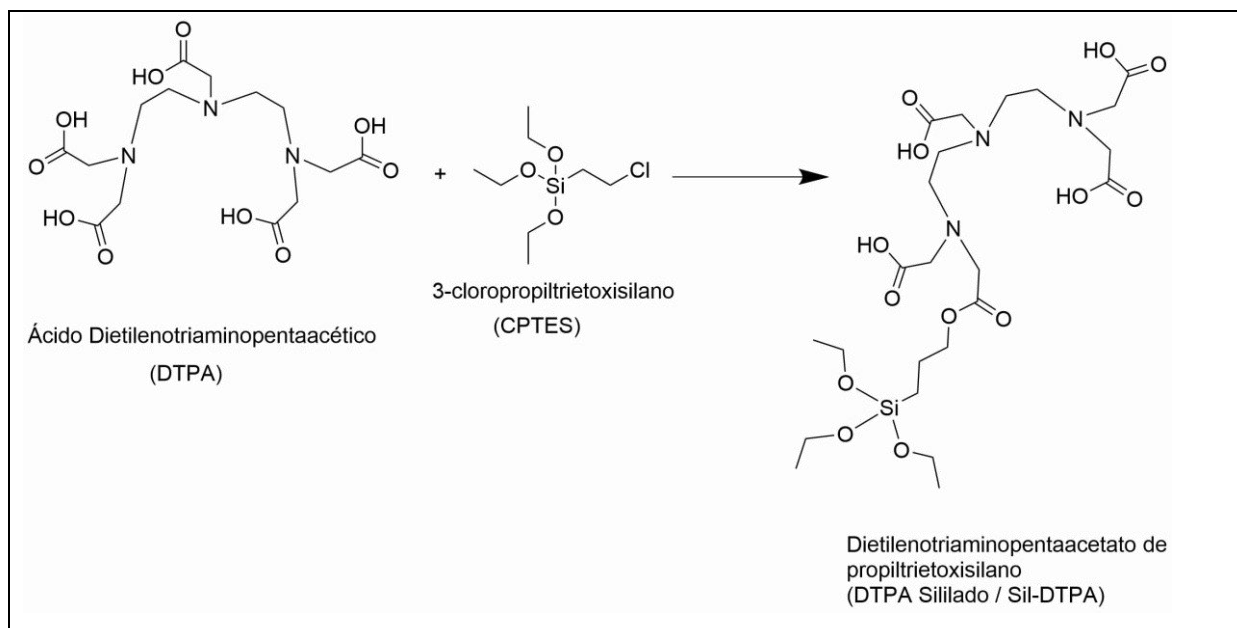


Fonte: Autoria própria

3.4. Modificação do ligante DTPA

A modificação do ligante ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) foi realizada com um agente sililante (3-cloropropiltrióxissilano), metodologia adaptada da literatura. A reação é ilustrada na Figura 16 (DUARTE et al., 2012).

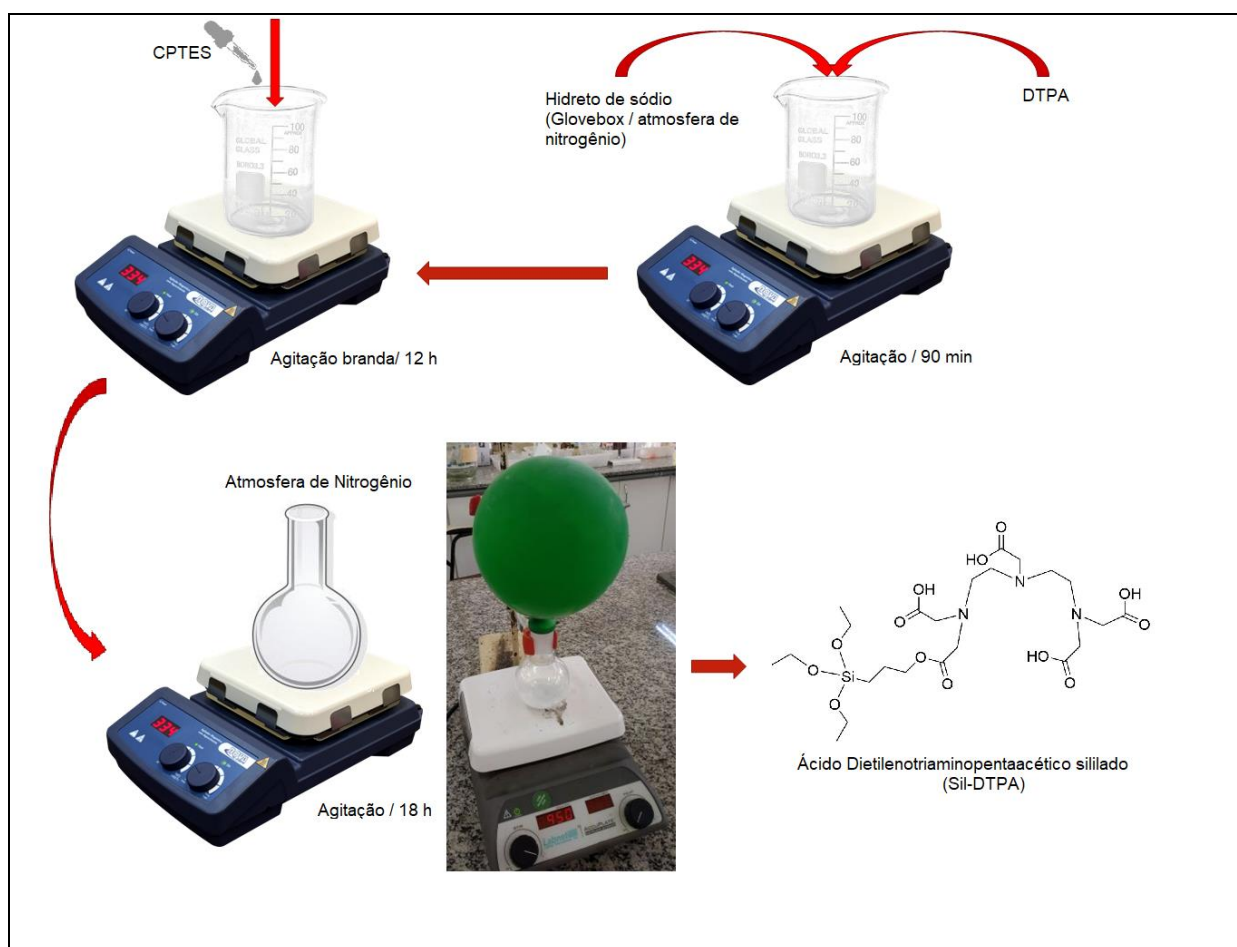
Figura 16 – Reação da modificação do ligante DTPA



Fonte: Autoria própria

Em um béquer foram preparados 20,0 mL de solução de ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tolueno anidro, a solução foi agitada com agitador magnético por 5 minutos, a seguir foi adicionado $2,0 \times 10^{-3}$ mol de hidreto de sódio; o processo foi realizado num 'glovebox' sob atmosfera de nitrogênio (N₂). Após a adição de hidreto de sódio a solução foi mantida sob agitação por 90 minutos. Transcorrido esse tempo foram adicionados $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de 3-cloropropiltriétoxissilano (3-CPTES) lentamente gota a gota. Finalizada a adição de 3-CPTES, a solução foi retirada do 'glovebox' mantendo a atmosfera de nitrogênio por meio de uma bexiga preenchida pelo citado gás ajustada à boca do balão que contém a solução reacional; também foi mantida sob agitação por 18 h. A metodologia utilizada se encontra ilustrada na Figura 17.

Figura 17 – Representação esquemática da metodologia para a modificação do ligante

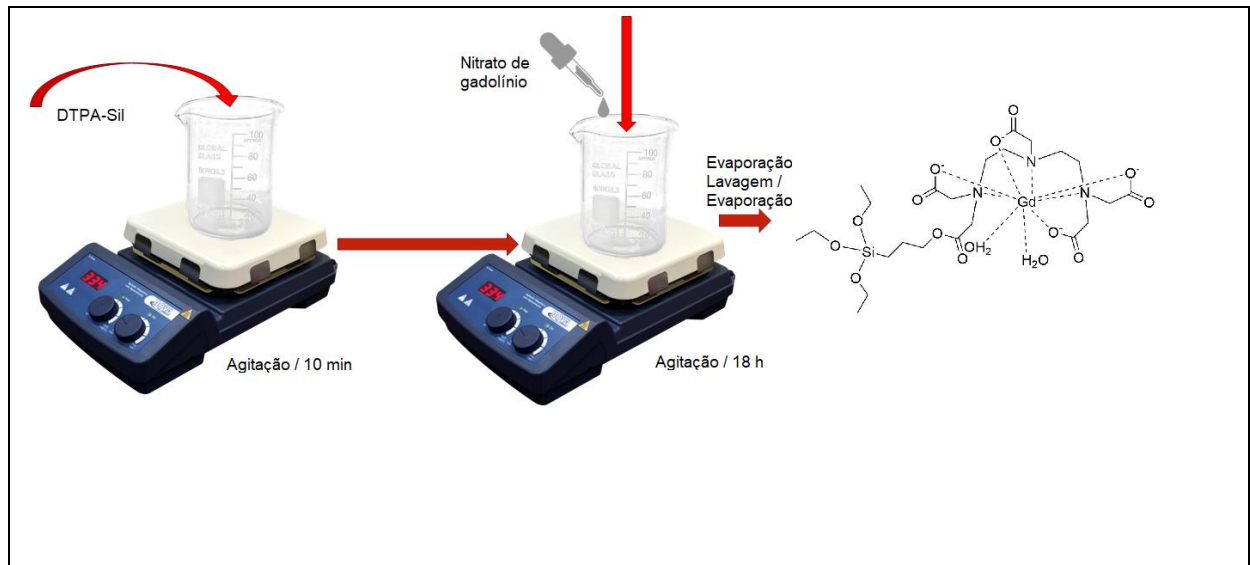


Fonte: Autoria própria

3.5. Síntese de complexo Gd^{3+} -DTPA modificado

Em um béquer foi preparada uma solução com 1×10^{-4} mol de DTPA modificado (DTPA-Sil) em 10,0 mL de etanol anidro sob agitação por 10 minutos. A seguir, foi adicionada uma solução padronizada de nitrato de gadolínio (III) 1×10^{-4} mol L^{-1} gota a gota. Após a adição, a solução foi mantida em agitação por 18 h a temperatura ambiente. Transcorrido esse tempo a agitação foi cessada e a solução deixada para evaporar em dessecador a vácuo. O material foi lavado com pentano e depois com dietiléter seguido de secagem sob vácuo em dessecador. Um esquema da metodologia utilizada pode ser observada na Figura 18.

Figura 18 – Representação esquemática da síntese do complexo



Fonte: Autoria própria

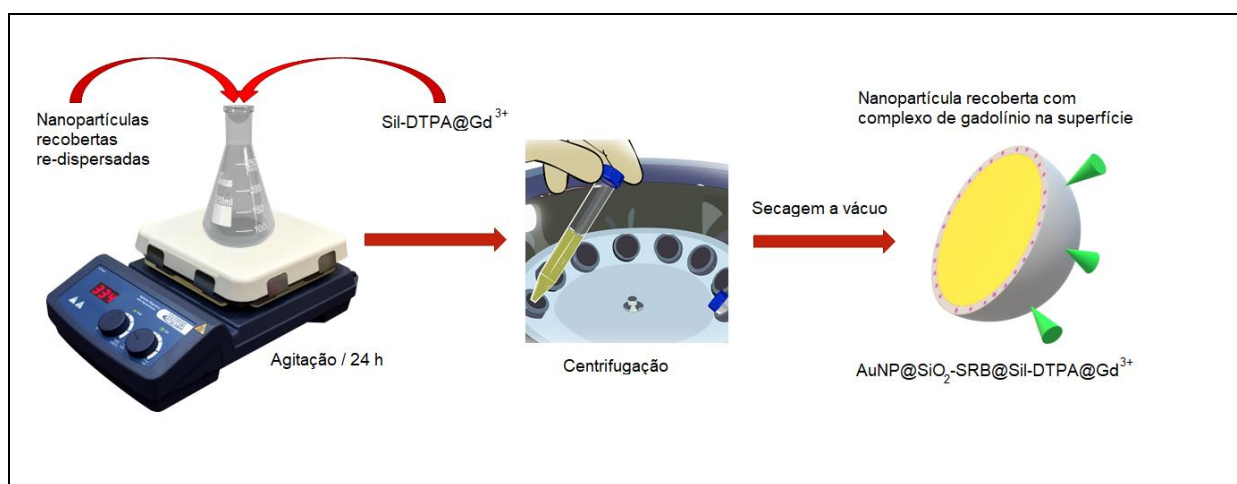
3.6. Ancoragem do complexo Gd^{3+} -DTPA-Sil na nanopartícula de ouro



Para a ancoragem do complexo à superfície da nanopartícula adaptamos a metodologia presente na literatura (LECHEVALLIER et al., 2013).

Em um béquer $5,0 \times 10^{-2}$ g de nanopartículas de ouro foram re-dispersadas em 25,0 mL de etanol anidro. Em outro béquer foi preparada uma solução de $5,0 \times 10^{-2}$ g de Gd^{3+} -DTPA-Sil em 25,0 mL de etanol anidro que, na sequência, foi adicionada no béquer contendo a dispersão de nanopartículas de ouro e mantida sob agitação à temperatura ambiente por 24 h. Transcorrido esse tempo, as nanopartículas foram recuperadas por processos de centrifugação e secagem a vácuo. Na Figura 19 pode se observar de maneira esquemática a metodologia utilizada.

Figura 19 – Representação esquemática da ancoragem do complexo na nanopartícula



Fonte: Autoria própria

3.7. Caracterizações

As medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram realizadas no LP6-INQUI-UFMS num analisador de tamanho de partículas da Malvern modelo Zetasizer NanoZs com fonte de luz laser de 4 mW HeNe (633 nm), angulação de 173° e 90° e temperatura de 25°C. Para tal efeito alíquotas das soluções A, B, C e D foram colocadas em cubetas quadradas de vidro de 12 mm (PCS1115). A solução de nanopartículas recobertas foram colocadas em cubetas de poliestireno de 12 mm (DTS0012).

A caracterização por espectroscopia no infravermelho foi realizada preparando misturas das amostras com brometo de potássio (KBr) homogeneizadas em almofariz de ágata e posterior compressão mecânica resultando pastilhas sólidas finas. As medições foram realizadas no LTF-FACFAN-UFMS num espectrômetro de infravermelho com Transformada de Fourier Thermo Fischer Scientific Nicolet modelo IS5, analisando uma faixa espectral de 400 a 4000 cm⁻¹ e com um número de varreduras de 40.

A caracterização por ressonância magnética nuclear (RMN ¹H e ¹³C) do corante e do corante modificado foi realizada dissolvendo as amostras em clorofórmio deuterado CDCl₃ em tubos de 178 mm de altura e 5 mm de diâmetro da Erle Química. As medições foram realizadas no RMN-INQUI-UFMS num espectrômetro Bruker modelo DPX-300 (300/75 MHz).

A caracterização por espectroscopia ultra violeta – visível (UV-Vis) foi realizada no LP6 em soluções de acetonitrila com corante e corante modificado em cubetas de plástico CVD-UV 1S num espectrômetro Ocean Optics modelo USB4000+UV-Vis.

A caracterização para teste imaginológico por Tomografia Computadorizada foi realizado utilizando um mamógrafo no Hospital Universitário “Maria Aparecida Pedrossian” seção EBSEH. Amostras de nanopartículas de ouro aproximadamente 10 nm, de aproximadamente 20 nm e de nanopartículas recobertas de aproximadamente 40 nm de $2,5 \times 10^{-4}$ mol foram irradiadas.

A caracterização para teste imaginológico por Ressonância Magnética foi realizada no CEMES, Toulouse (França). 1 mL de mistura de amostras foi colocado em microtubos em concentração decrescente e gelatina, a aquisição das medidas foi realizada utilizando equipamento 3 T Clinical Imager (Philips Achieva). As imagens T2 foram realizadas utilizando uma sequência spin-eco com repetição tempo/tempo de eco (TR/TE) de 3000/40 ms e um ângulo de giro de 90° . As imagens T1 foram realizadas utilizando a sequência de spin-eco com a sequência de repetição de 500 ms, tempo de eco 12 ms, fatia de 5mm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Primeira Etapa: Preparação dos núcleos de ouro

4.1.1. Síntese das Nanopartículas de Ouro

A síntese de nanopartículas de ouro foi realizada pela redução do complexo tetracloroaurato de hidrogênio $\text{H}[\text{AuCl}_4]$ também conhecido como ácido cloroáurico em solução aquosa; o reagente mencionado constitui o fornecedor de ouro. Na solução o reagente se dissocia nos íons H^+ , Cl^- e Au^{3+} sendo esses últimos os que pelo processo de óxido-redução resultarão no elemento Au^0 . Na mesma solução é adicionada uma quantidade equimolar de citrato trissódico $\text{Na}_3\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_7$. Da mesma maneira este reagente se dissocia nos íons Na^+ e $(\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_7)^-$, o íon citrato desempenha o papel de estabilizante assim que os núcleos esféricos de ouro começam a ser formados.

Uma solução aquosa de borohidreto de sódio NaHB_4 foi adicionada à solução que contém o tetracloroaurato e o citrato. O reagente é o agente redutor da reação fornecendo os elétrons para que o cátion Au^{3+} reduza. Quando isso acontece o processo de nucleação se inicia e pequenos aglomerados esféricos do elemento ouro são formados que à medida que mais cátions são reduzidos recebem mais átomos de ouro conseqüentemente crescendo em tamanho.

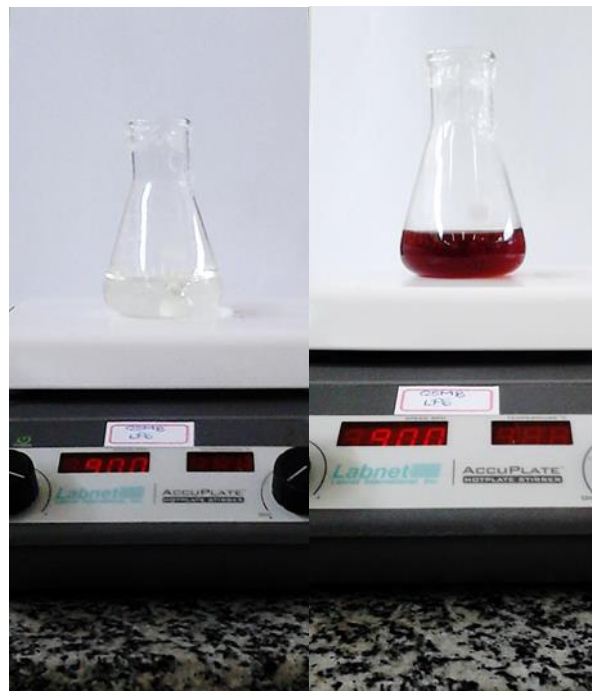
O agente estabilizante (íon citrato) forma uma camada ao redor desses núcleos neoformados criando uma carga de superfície negativa que repele os outros núcleos que também possuem a mencionada camada. Obtém-se dessa maneira uma solução coloidal estável de nanopartículas de ouro.

A formação de nanopartículas em soluções coloidais é explicada pela teoria de nucleação (LAMER & DINEGAR, 1950). A teoria relaciona a concentração dos reagentes com a velocidade de formação dos núcleos. Segundo a teoria a concentração dos reagentes deve ser baixa, pois existe uma concentração de supersaturação crítica que se ultrapassada resultaria em precipitação. A agitação vigorosa da solução resulta necessária para acelerar o crescimento por difusão discutido na mencionada teoria afastando rapidamente os núcleos recém formados que, somada à ação do agente estabilizante, mantém as nanopartículas separadas.

Outro fenômeno perceptível a nível macroscópico é a mudança de coloração da solução primitiva após a adição da solução do agente redutor. A solução amarelo-

pálida que contém o tetracloroaurato de hidrogênio e o citrato trissódico muda para uma cor vermelha parecida com a observada em vinhos tintos diluídos com um pouco de água, que pode ser observado na Figura 20. Em se tratando de soluções a cor observada é a cor transmitida, fenômeno diferente de quando a luz interage com corpos sólidos sejam estes transparentes ou opacos onde os fenômenos predominantes são os de reflexão e refração.

Figura 20 - Mudança na cor da solução após adição de NBH_4 . Solução de ouro e citrato à esquerda. A mesma solução após adição do agente redutor à direita



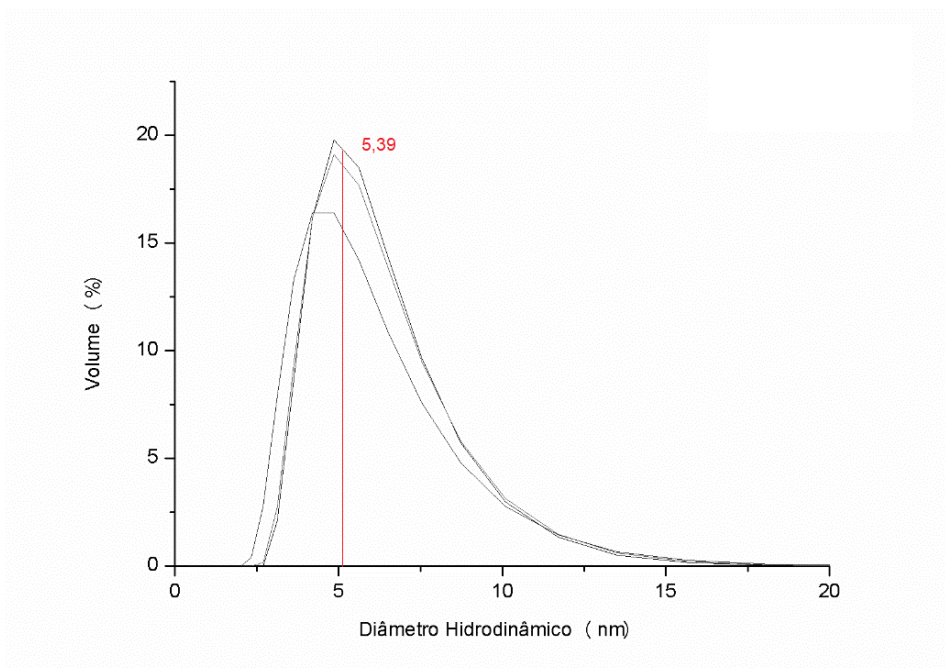
Fonte: Autoria própria

A mudança na cor transmitida acontece pela formação de nanopartículas esféricas de ouro na solução após a adição do agente redutor, e a interação das mencionadas nanopartículas com a luz incidente que resulta num fenômeno denominado Ressonância Localizada de Plásmon de Superfície (LSPR pelas siglas em inglês). Basicamente é a oscilação ressonante de elétrons de condução da superfície metálica (no caso ouro). Essa oscilação é resultado da incidência de um campo elétrico homogêneo (luz) que resulta num deslocamento dos elétrons de um “extremo” da nanopartícula para outro “extremo” e a aparição de uma força restauradora (por isso é oscilante). Na luz branca temos todos os comprimentos de onda, mas certos comprimentos de onda interagirão com as nanopartículas (dependendo do tamanho destas) provocando a aparição do fenômeno mencionado.

Conseqüentemente haverá absorção de certos comprimentos de onda resultando numa cor (AMENDOLA et al., 2017). Para nanopartículas de diâmetro compreendido entre 5 – 10 nm a cor é a observada (vermelho vinho tinto). À medida que as partículas são maiores acontece um desvio para o azul – violeta.

As soluções de núcleos resultaram em nanopartículas de diâmetro hidrodinâmico compreendido entre 5 – 10 nm, medidas pela técnica DLS. A medida que pode ser observada no gráfico da Figura 21 apresentou um diâmetro hidrodinâmico de $5,4 \pm 2,1$ nm.

Figura 21 - Gráfico de distribuição de nanopartículas de ouro (Solução A) feitas em triplicata por DLS. Foram realizadas 14 varreduras para cada medida da mesma solução.



Fonte: Autoria própria

Para obter nanopartículas de diâmetros maiores foi seguida a metodologia de crescimento de sementes ou núcleos (JANA, GEARHEART & MURPHY, 2001). Para tal efeito, foi preparada uma solução aquosa contendo tetracloroaurato de hidrogênio e o surfactante iônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) a qual foi reservada e denominada de solução de crescimento. A mistura de soluções de núcleos (solução A) e de crescimento em diferentes volumes resultou em soluções de nanopartículas com diâmetros maiores. Essa mistura de volumes diferentes de soluções de núcleos e de crescimento foi realizada com a adição de um volume fixo de uma solução de ácido ascórbico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

A solução de crescimento de cor laranja intenso se torna transparente após a adição da solução de ácido ascórbico. Atribuímos essa mudança à redução dos íons Au^{3+} a Au^+ a temperatura ambiente. O fenômeno de nucleação e a consequente formação de nanopartículas de ouro não ocorre na solução de crescimento pois o elemento se mantém na forma de íon. Quando as soluções de crescimento e de núcleos (A) são misturadas na presença de ácido ascórbico e de nanopartículas de ouro (solução A) acontece uma potencialização da capacidade redutora do ácido ascórbico para reduzir Au^+ a Au^0 , pois na solução de nanopartículas também se encontra o íon citrato que é um agente redutor. Os núcleos de ouro presentes na solução atuam como catalisadores da redução de íons Au^+ , fornecendo centros de nucleação para os átomos de ouro formados, esses átomos se agregam aos núcleos e conseqüentemente há um aumento no diâmetro das nanopartículas.

Como pode ser observada na Tabela 3, a mistura 7,5 mL de solução de crescimento, com 2,5 mL de solução A rendem nanopartículas de diâmetro da ordem de 10,0 nm denominadas de solução B, enquanto que o tamanho das nanopartículas de ouro resultantes da mistura de 9,0 mL de solução de crescimento com 1,0 mL de solução A rendem nanopartículas de diâmetro da ordem de 20,0 nm denominadas de solução C. Já na mistura de 9,0 mL de solução B com 1,0 mL de solução A são obtidas nanopartículas de diâmetro na ordem de 30,0 nm. Em todas as misturas foi colocado também 0,05 mL de solução de ácido ascórbico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 3 - Proporção das soluções utilizadas e os diâmetros resultantes

Solução	Volume Solução de Crescimento (mL)	Volume Solução A (mL)	Volume Solução B (mL)	Volume Solução ácido ascórbico (mL)	Diâmetro (nm)
B	7,5	2,5	--	0,05	$13,5 \pm 3,3$
C	9,0	1,0	--	0,05	$21,5 \pm 18,5$
D	9,0	--	1,0	0,05	$31,9 \pm 11,9$

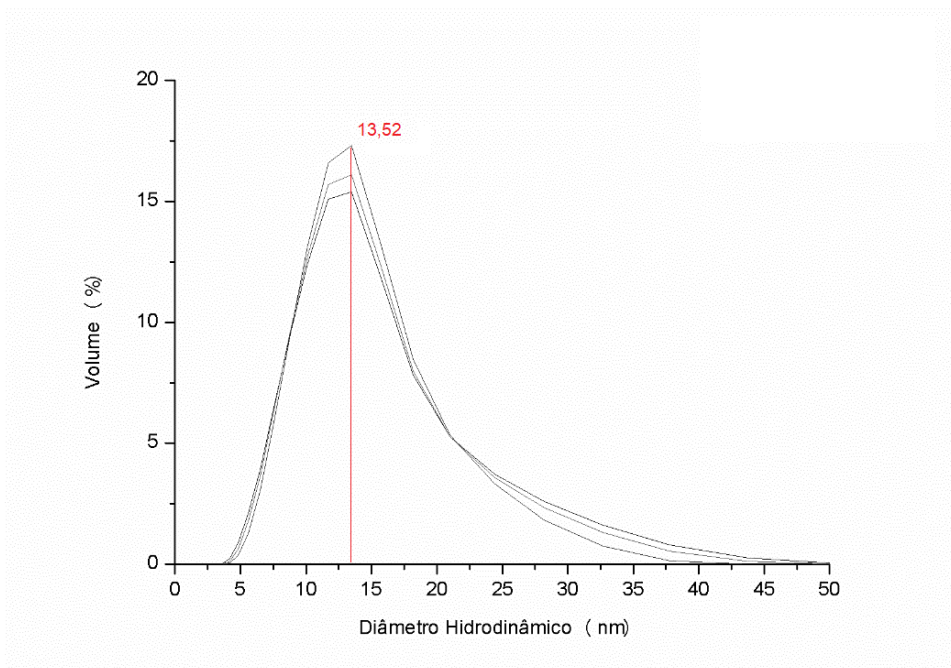
Fonte: Autoria própria

A diferença no diâmetro obtido é atribuível ao fato de que nas condições da segunda reação há uma quantidade menor de núcleos disponíveis como centros de nucleação para uma maior quantidade de átomos de ouro disponíveis para agregação

desses núcleos. Na terceira situação temos nanopartículas com uma quantidade de núcleos ainda menor e uma quantidade de átomos de ouro pequena resultando em um crescimento da ordem de 10-15 nm.

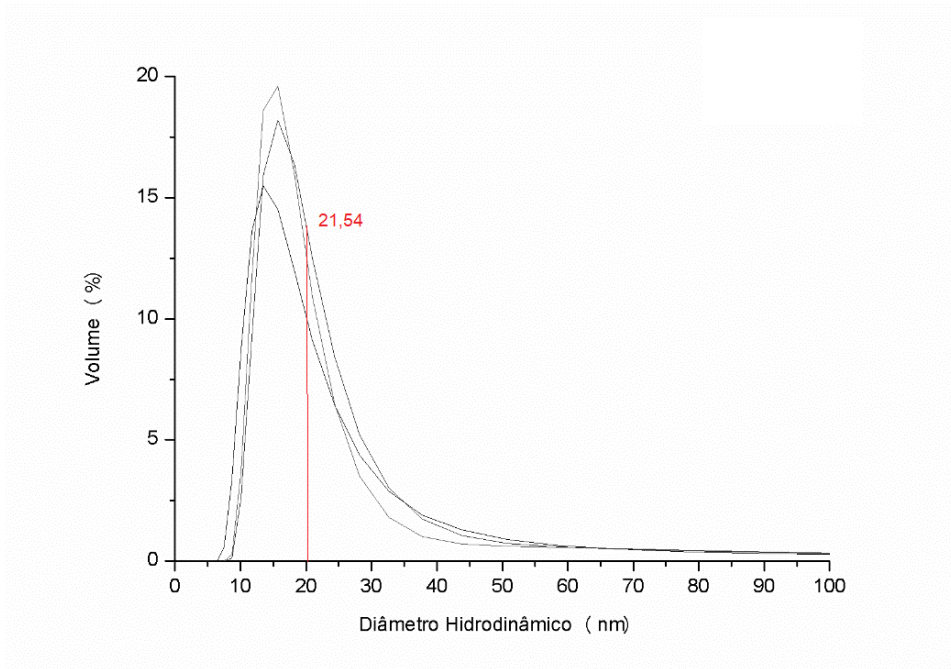
É possível observar nos gráficos apresentados nas Figuras 22, 23 e 24 os diferentes diâmetros hidrodinâmicos obtidos utilizando diferentes razões de soluções de crescimento e de soluções A ou B estimados pela técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).

Figura 22 - Gráfico de distribuição de nanopartículas de ouro (Solução B) feitas em triplicata por DLS. Foram realizadas 14 varreduras para cada medida da mesma solução.



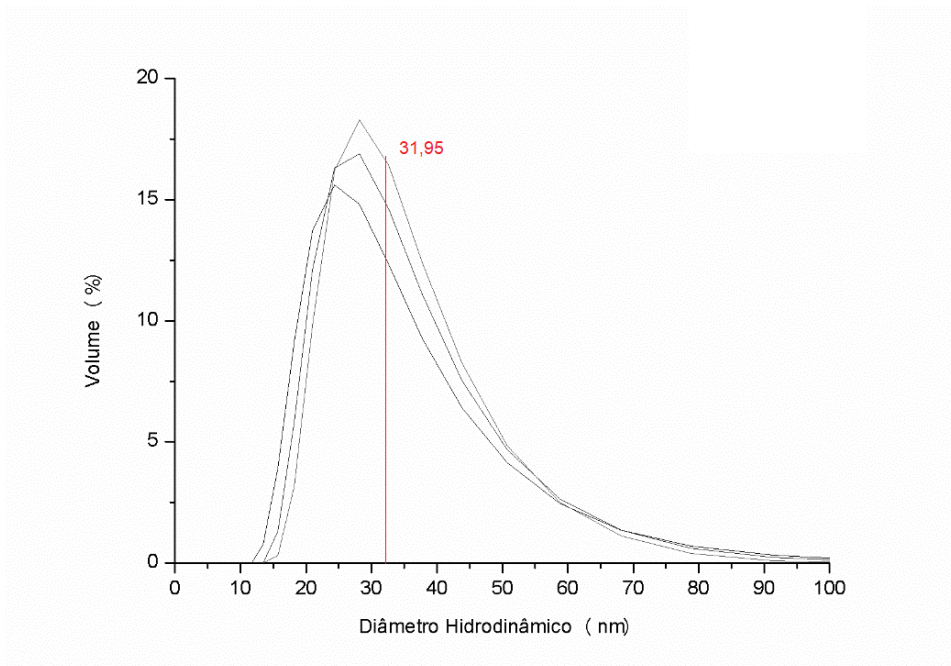
Fonte: Autoria própria

Figura 23 - Gráfico de distribuição de nanopartículas de ouro (Solução C) feitas em triplicata por DLS. Foram realizadas 14 varreduras para cada medida da mesma solução.



Fonte: Autoria própria

Figura 24 - Gráfico de distribuição de nanopartículas de ouro (Solução D) feitas em triplicata por DLS. Foram realizadas 14 varreduras para cada medida da mesma solução.



Fonte: Autoria própria

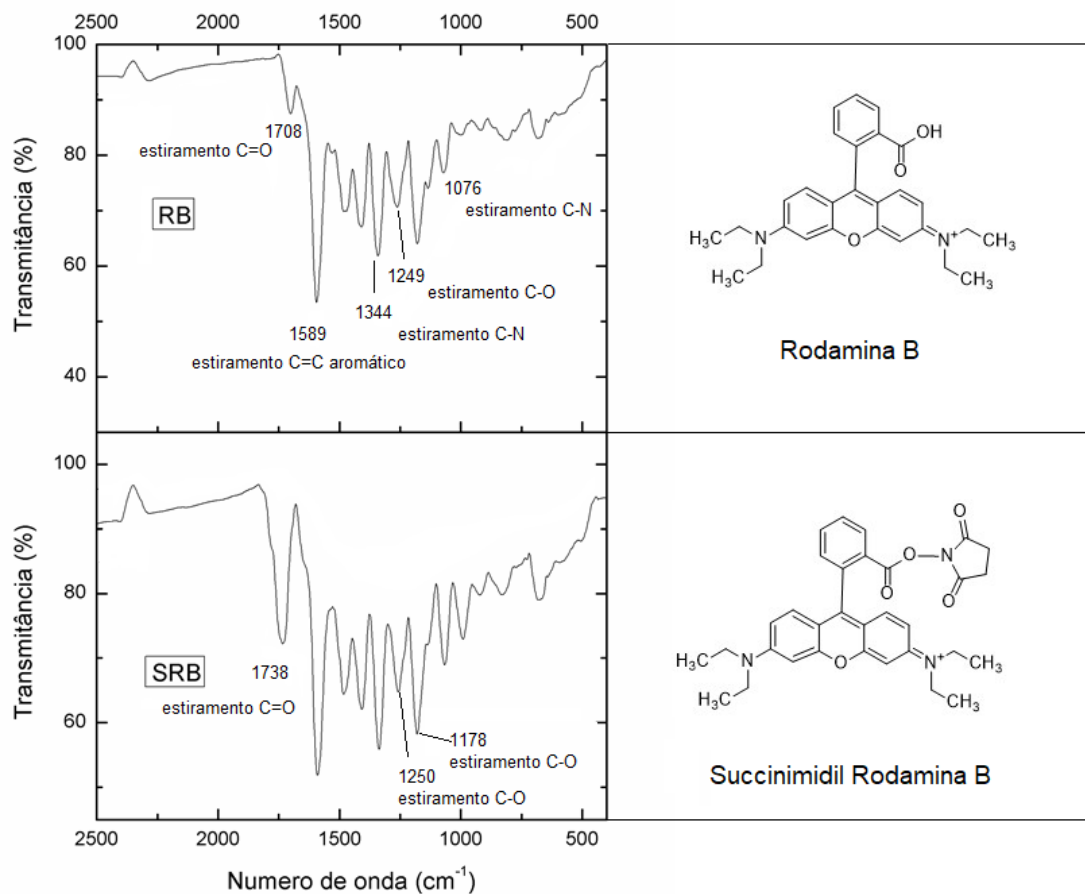
4.2. Segunda Etapa: Modificação do Corante Fluorescente Rodamina B

A modificação da substância fluorescente Rodamina B (RB) foi realizada pela reação de esterificação com N-Hidroxissuccinimida (NHS) na presença do catalisador N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC). A obtenção do corante modificado foi inspecionada por métodos espectroscópicos (Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear ^1H e ^{13}C). Foram caracterizadas amostras de Rodamina B (RB) e Succinimidil Rodamina B (SRB).

4.2.1. Espectroscopia no Infravermelho

Na Figura 25 tem-se os espectros de infravermelho de ambos compostos: Rodamina B (RB) e Succinimidil Rodamina B (SRB).

Figura 25 – Espectro no Infravermelho de Rodamina B (RB) (acima) e de Succinimidil Rodamina B (SRB) (embaixo)



Fonte: Autoria própria

Ambos espectros de infravermelho apresentam bandas em comum. As bandas correspondentes ao estiramento simétrico da ligação C-O em éteres aromáticos em 1249 cm^{-1} e 1250 cm^{-1} para RB e SRB respectivamente (PAVIA et al., 2013; SIVERSTEIN et al., 2007); as bandas correspondentes à ligação C-N 1076 cm^{-1} e 1070 cm^{-1} para RB e SRB respectivamente e a banda em 1589 cm^{-1} no espectro da RB que corresponde à banda em 1587 cm^{-1} observada no espectro da SRB que são atribuíveis as ligações C=C dos anéis (ŞAHUTOĞLU & KAYA, 2019), as bandas de C=N que costumam aparecer por volta de 1650 cm^{-1} apenas se insinua no espectro da SRB.

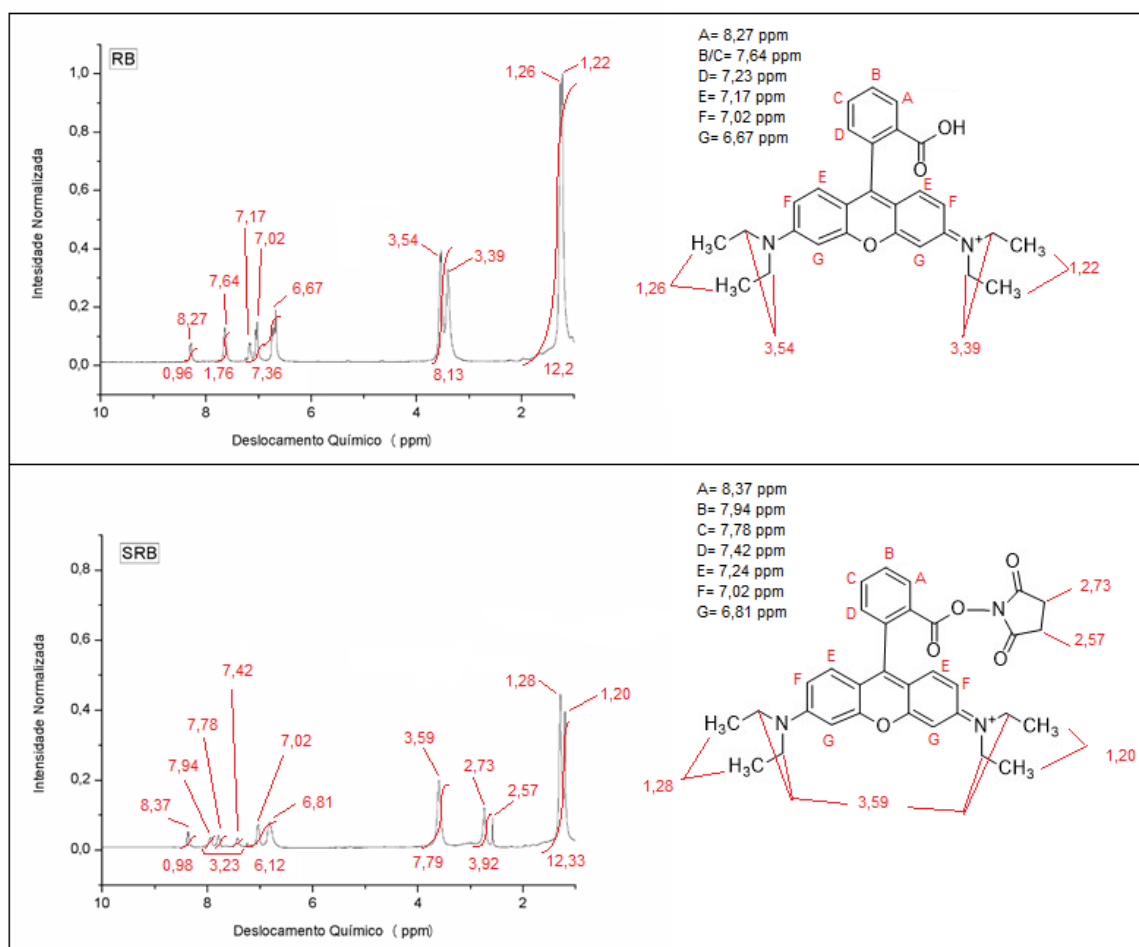
No espectro da rodamina B podemos observar uma banda de baixa intensidade em 1708 cm^{-1} que corresponde à ligação C=O do grupo funcional do ácido carboxílico (BATTULA et al., 2021), já no espectro de succinimidil rodamina B podemos observar uma banda intensa em 1738 cm^{-1} que pode ser interpretada como correspondendo a ligação C=O éster. Outra observação interessante é a banda em 1178 cm^{-1} que pode ser interpretada como ser da ligação C-O correspondente ao composto (agora éster, C-O-N).

4.2.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

4.2.2.1. Espectroscopia de RMN de ^1H

Os espectros de RMN ^1H para Rodamina B (RB) e Succinil Rodamina B podem ser observados na Figura 26.

Figura 26 – Espectros de RMN ^1H de Rodamina B (RB) e Succinil Rodamina B (SRB) com as atribuições nas estruturas químicas de cada molécula.



Na caracterização das amostras por RMN ^1H para a Rodamina B (RB) com fórmula química $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_3$ podemos observar que a integração dos sinais encontrados no espectro dá um total de 30. A ausência do sinal correspondente ao hidrogênio ácido (10-12 ppm) pode acontecer, principalmente quando entre as moléculas podem se formar ligações de hidrogênio ou trocas, isso tem como consequência o alargamento da base do pico que somado à baixa intensidade do sinal fazem que o pico desapareça na linha de base. Explicada a citada ausência, o resto do espectro apresenta dados compatíveis com a estrutura química da amostra. Para a Succinimidil Rodamina B (SRB) o espectro se mostra compatível com a fórmula do composto $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_5$:

- Rodamina B: dois picos muito próximos 1,22 ppm e 1,26 ppm com integração 6 cada, que atribuímos aos hidrogênios das metilas terminais, a diferenças nos

deslocamentos químicos se deve à influência protetora do par de elétrons do nitrogênio que faz ligação simples com o anel aromático (1,22 ppm) enquanto o nitrogênio que faz ligação dupla com o anel benzênico tem os seus elétrons comprometidos na ligação (1,26 ppm) (PAVIA et al., 2013; SIVERSTEIN et al., 2007; OLARU et al., 2019). Esses sinais aparecem no espectro de Succinimidil Rodamina B em 1,20 ppm e 1,28 ppm com integração 6 cada, atribuíveis aos hidrogênios das metilas terminais, o mesmo argumento apresentado para a RB serve aqui para justificar a diferença dos deslocamentos químicos;

- A diferença do espectro de Succinimidil Rodamina B em relação ao de Rodamina B: picos em 2,54 ppm e 2,73 ppm de integração 2 cada, ausentes no espectro da rodamina B, que atribuímos aos hidrogênios dos metilenos do anel succinimida (WANG, et al., 2018);

- No espectro de RB: dois picos próximos 3,39 ppm e 3,54 ppm com integração 4 cada, atribuíveis aos hidrogênios dos metilenos ligados às metilas terminais e aos nitrogênios, aqui a influência citada acima é mais marcada pela proximidade da ligação com o fenômeno mencionado, mais protegidos (3,39 ppm) próximos ao N e (3,54 ppm) para os próximos ao N⁺. No espectro de SRB aparece um sinal em 3,59 ppm com integração 8 correspondentes aos hidrogênios dos metilenos ligados aos nitrogênios.

- Espectro de RB: hidrogênios ligados aos carbonos dos anéis benzênicos: Sinal centrado em 6,71 ppm (picos em 6,67 com integração 2; 6,71 com integração 1 e 6,74 também com integração 1). Sinal centrado em 7,04 ppm (picos em 7,02 ppm e 7,05 ambos com integração 1). Sinal centrado em 7,16 ppm (picos em 7,15 ppm e 7,17 ppm pico desdobrado correspondente a integração 1). Sinal 7,64 ppm com integração 2 e sinal centrado em 8,29 ppm (picos em 8,27 ppm e 8,30 ppm sinal desdobrado integração 1) dando um total de 10. Esses mesmos hidrogênios geram sinais similares no espectro de SRB: Sinal em 6,81 ppm de integração 4, sinal em 7,02 ppm integração 2; sinais em 7,42 ppm, 7,78 ppm, 7,94 ppm e 8,37 ppm todos com integração 1.

Os picos mencionados podem ser visualizados na Figura 26 e na Tabela 4 e 5 estão as atribuições.

Tabela 4 – Atribuição do espectro de RMN ¹H de Rodamina B

Deslocamento químico (ppm)	Integração	Multiplicidade	Atribuição
1,22	6	Tripleto	2 grupos metila (CH ₃)
1,26	6	Tripleto	2 grupos metila (CH ₃)
3,40	4	Quarteto	2 grupos metileno (CH ₂)
3,54	4	Quarteto	2 grupos metileno (CH ₂)
6,71	4	Padrão anel aromático	4 grupos CH de anel benzênico
7,04	2	Padrão anel aromático	2 grupos CH de anel benzênico
7,16	1	Padrão anel aromático	1 grupo CH de anel benzênico
7,64	2	Padrão anel aromático	2 grupos CH de anel benzênico
8,29	1	Padrão anel aromático	1 grupo CH de anel benzênico

Fonte: Autoria própria

Tabela 5 - Atribuição do espectro de RMN ^1H de Succinimidil Rodamina B. Destacado os sinais presentes no espectro de SRB ausentes no espectro de RB.

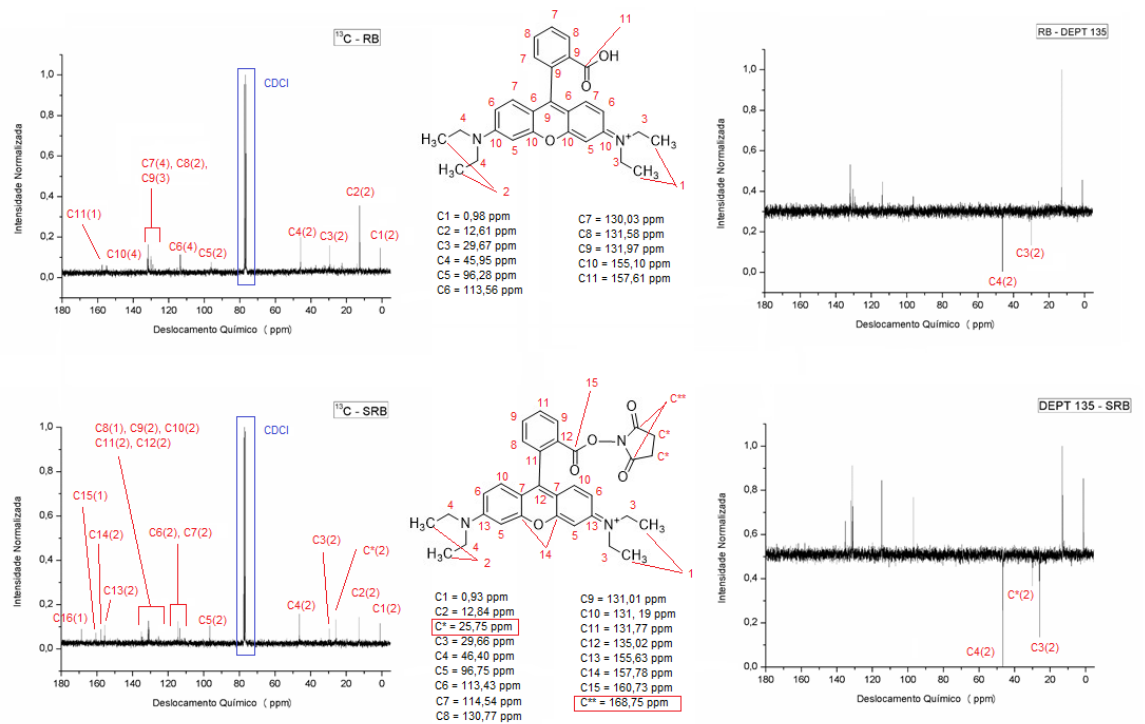
Deslocamento químico (ppm)	Integração	Multiplicidade	Atribuição
1,20	6	Tripleto	2 grupos metila (CH_3)
1,29	6	Tripleto	2 grupos metila (CH_3)
2,57	2	Tripleto	1 grupo metileno (CH_2)
2,73	2	Tripleto	1 grupo metileno (CH_2)
3,59	8	Quarteto	4 grupos metileno (CH_2)
6,81	4	Padrão anel aromático	4 grupos CH de anel benzênico aromático
7,02	2	Padrão anel aromático	2 grupos CH de anel benzênico aromático
7,42	1	Padrão anel aromático	1 grupo CH de anel benzênico aromático
7,78	1	Padrão anel aromático	1 grupo CH de anel benzênico aromático
7,94	1	Padrão anel aromático	1 grupo CH de anel benzênico aromático
8,37	1	Padrão anel aromático	2 grupos CH de anel benzênico aromático

Fonte: Autoria própria

4.2.2.2. Espectroscopia de RMN ^{13}C e DEPT 135

Os dados obtidos pela técnica de RMN ^{13}C e de RMN Experimento DEPT 135 (Intensificação do Sinal sem Distorção por Transferência de Polarização, ângulo de 135°) para RB indicam compatibilidade com a estrutura do fluoróforo Rodamina B de fórmula química $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_3$ e de Succinimidil Rodamina B de fórmula $\text{C}_{32}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_5$. Os espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135 podem ser observados na Figura 27.

Figura 27 – Espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135 Rodamina B (RB) e Succinil Rodamina B (SRB) com as atribuições nas estruturas químicas de cada molécula.



Fonte: Autoria Própria

- O sinal em 0,98 ppm correspondente aos carbonos das metilas terminais ligados a metilenos próximos a N⁺ no espectro de RB aparece em 0,93 ppm no espectro de SRB,
- Os sinais para os carbonos das outras metilas terminais aparecem em 12,61 ppm indicando uma maior “desproteção” por parte de N no espectro de RB enquanto aparece em 12,84 ppm no espectro de SRB;
- A presença de um sinal em 25,75 ppm no espectro de SRB que não se encontra no espectro de RB é atribuída aos carbonos de grupos metilenos (CH₂) que fazem parte do succinimidil constituindo uma das diferenças entre ambos os espectros;
- Sinal em 29,67 ppm (RB) 29,66 ppm (SRB) que atribuímos a dois grupos metilenos ligados a N;

- O sinal em 45,95 ppm (RB) e 46,40 ppm (SRB) também atribuídos a dois grupos metilenos ligados a nitrogênio encontram-se mais desprotegidos pois devido à conformação espacial da molécula sofrem o efeito da carbonila do grupo ácido carboxílico ocasionando um deslocamento químico maior;

- Sinal em 96,28 ppm (RB) e 96,75 ppm (SRB) atribuídos a dois carbonos do anel aromático ligados aos carbonos que fazem ligação com o heteroátomo do anel central;

- Sinais em 113,56; 130,02; 131,58 ppm no espectro de Rodamina B correspondem a dez carbonos da estrutura aromática policíclica que são equivalentes aos sinais em 113,43 ppm; 114,54 ppm; 130,77 ppm; 131,01 ppm; 131,19 ppm e 131,77 ppm do espectro de SRB;

- Em 131,97 ppm sinal do carbono mais próximo da função ácido da citada estrutura em RB e 135,02 ppm de SRB;

- No espectro de RB o sinal que atribuímos a quatro carbonos ligados a átomos mais eletronegativos, dois deles a nitrogênio os dois restantes ligados a oxigênio aparece em 155,11 ppm, a mesma atribuição corresponde ao sinal em 155,63 ppm no espectro de SRB para os carbonos ligados ao nitrogênio e em 157,78 ppm para os carbonos ligados ao oxigênio;

- Sinal em 157,61 ppm sinal de um carbono atribuído ao carbono da função ácido no espectro de RB, esse sinal aparece em 160,73 ppm no espectro de SRB;

- Outro sinal ausente no espectro de Rodamina B aparece no espectro de Succinimidil Rodamina B em 168,75 ppm atribuível aos carbonos carbonílicos (C=O) do grupo succinimidina.

As atribuições são compatíveis com os dados obtidos com o RMN Experimento DEPT 135. No experimento DEPT 135, os carbonos primários e terciários aparecem na mesma fase enquanto os secundários aparecem na fase oposta, já os quaternários não aparecem. Os sinais em 29,93 ppm e 46,21 ppm que se encontram na fase oposta no espectro DEPT 135 são equivalentes aos sinais em 29,67 ppm e 45,95 ppm respectivamente observados no espectro de RMN ^{13}C indicando se tratar de carbonos secundários. Os sinais em 155,11 ppm e 157,61 ppm que se encontram no espectro

de RMN ^{13}C não possuem equivalentes no espectro DEPT 135 sugerindo que esses sinais correspondem a carbonos quaternários.

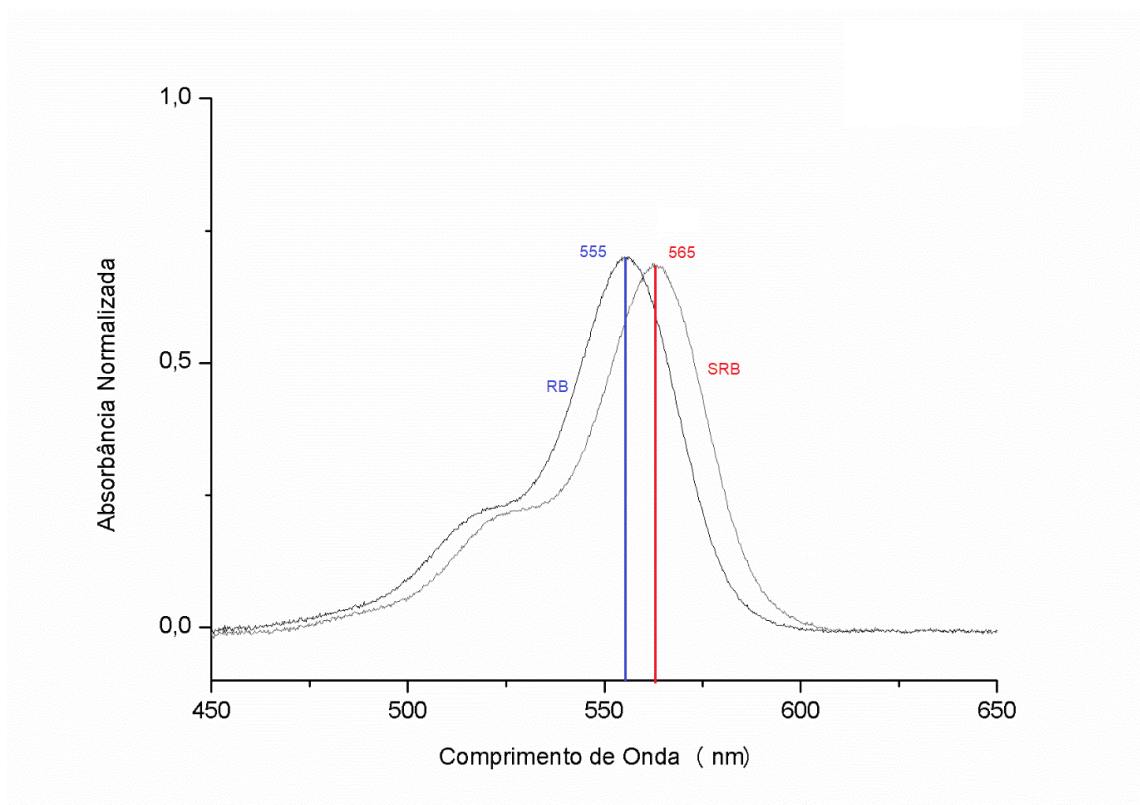
Assim como foram comparados os espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135 de Rodamina B foi feita a comparação dos espectros de Succinimidil Rodamina B. Os sinais em 25,79 e 26,01 ppm equivalentes ao sinal em 25,71 observado em ^{13}C se encontram na fase oposta indicando se tratarem de carbonos secundários, coerente com a proposta de dois metilenos do anel succinimidina, além de não apresentar sinais equivalentes para 155,63 ppm, 157,78 ppm, 160,73 ppm e 168,75 ppm indicando que tais sinais observáveis no espectro ^{13}C correspondem a carbonos quaternários o que resulta compatível com a estrutura de SRB.

A análise de todos os espectros de RMN sugerem a formação do composto Succinimidil Rodamina B.

4.2.2.3. Espectroscopia UV-visível

Os espectros de UV-visível de Rodamina B e Succinimidil Rodamina B podem ser observados na Figura 28.

Figura 28 – Espectro UV-visível de Rodamina B e Succinimidil rodamina B em acetonitrila.



Fonte: Autoria própria

As absorções máximas da Rodamina B na região do visível (uma delas por volta de 520 nm e a outra em 557 nm aproximadamente denominadas bandas Q) são interpretadas como transições $\pi-\pi^*$ entre orbitais moleculares ligantes e antiligantes (FARAG, A. & YAHIA, I., 2010; LAROWSKA et al., 2020). Esses máximos de absorção podem ser observados em 520 nm e 555 nm respectivamente para RB e 523 nm e 565 nm respectivamente no espectro de SRB.

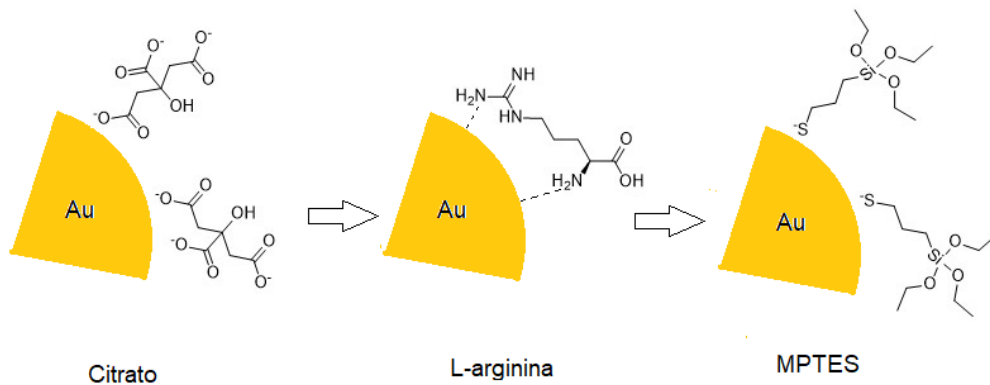
O espectro obtido de ambas amostras dissolvidas em acetonitrila mostra um desvio batocrômico para SRB sugerindo extensão na conjugação pela adição de um substituinte. A energia necessária para a transição de um elétron de um nível ocupado (HOMO) para o nível imediato desocupado (LUMO) diminui como consequência da aproximação em termos de energia dos níveis eletrônicos citados e o comprimento de onda absorvido é maior.

4.3. Terceira Etapa: Recobrimento das nanopartículas de ouro

Para recobrir as nanopartículas de ouro, utilizou-se a metodologia de troca sequencial de ligantes (SCHULZENDORF et al., 2011).

Primeiramente adicionou-se uma solução do aminoácido L-arginina na solução de nanopartículas de ouro. Nessa etapa, o aminoácido L-arginina substitui o citrato no recobrimento do núcleo de ouro. A seguir acrescentou-se uma fase orgânica constituída pelo ciclohexano, nessa fase foi adicionado (3-Mercaptopropil)triétoxissilano (MPTES). O MPTES substitui a L-arginina na primeira camada, recobrando o ouro devido à afinidade do enxofre pelo ouro (NATH et al., 2006; YADAV et al., 2021); fornecendo também grupos etóxi hidrolisáveis para formar grupos silanóis. Finalmente, adicionou-se tetraetilortossilicato (TEOS), para através dos processos de hidrólise e condensação formar a camada de recobrimento de sílica (JIANG et al., 2019). (Figura 29)

Figura 29 - Representação da troca sequencial no processo de recobrimento

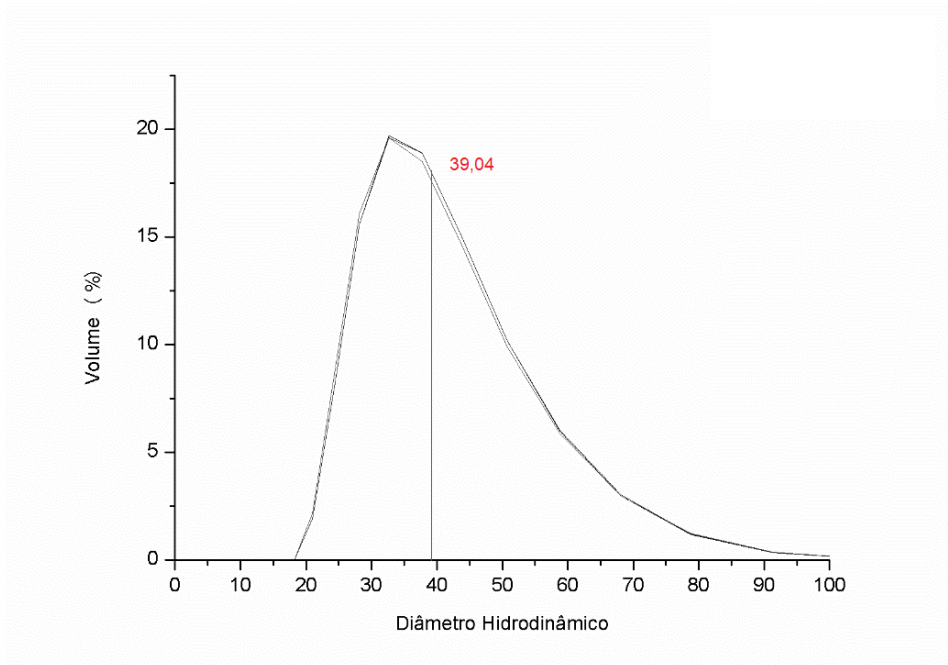


Fonte: Autoria própria

No momento de adicionar o precursor de sílica (TEOS) foi também adicionada a succinimidil rodamina B (SRB).

Utilizando a solução D de nanopartículas, que apresentou um diâmetro hidrodinâmico de $31,9 \pm 11,9$ nm foram obtidas nanopartículas recobertas com um diâmetro hidrodinâmico de $39 \pm 12,1$ nm, estimado pela técnica de DLS, como pode se observar na Figura 30. A escolha obedece a que o efeito de contraste para RMI pode estar favorecido por uma nanopartícula maior pode aumentar a relaxividade do complexo de gadolínio (III) podendo produzir uma maior desaceleração do movimento rotacional devido a sua maior massa, e devido à maior facilidade de recobrimento e posterior funcionalização em comparação com nanopartículas de menor diâmetro (energia de superfície) (VOLLATH, FISCHER & HOLEC, 2018; MOLLEMAN & HIEMSTRA, 2018) e alguns estudos sobre o tamanho das nanopartículas para contraste CT sugerem que diâmetros compreendidos entre 35-75 nm possuem uma atenuação maior de raios X, podendo gerar um melhor contraste (ROSS et al., 2014).

Figura 30 - Gráfico de distribuição de tamanho de nanopartículas de ouro recobertas medidas feitas em triplicata por DLS. Foram realizadas 14 varreduras para cada medida da mesma solução.



Fonte: Autoria própria

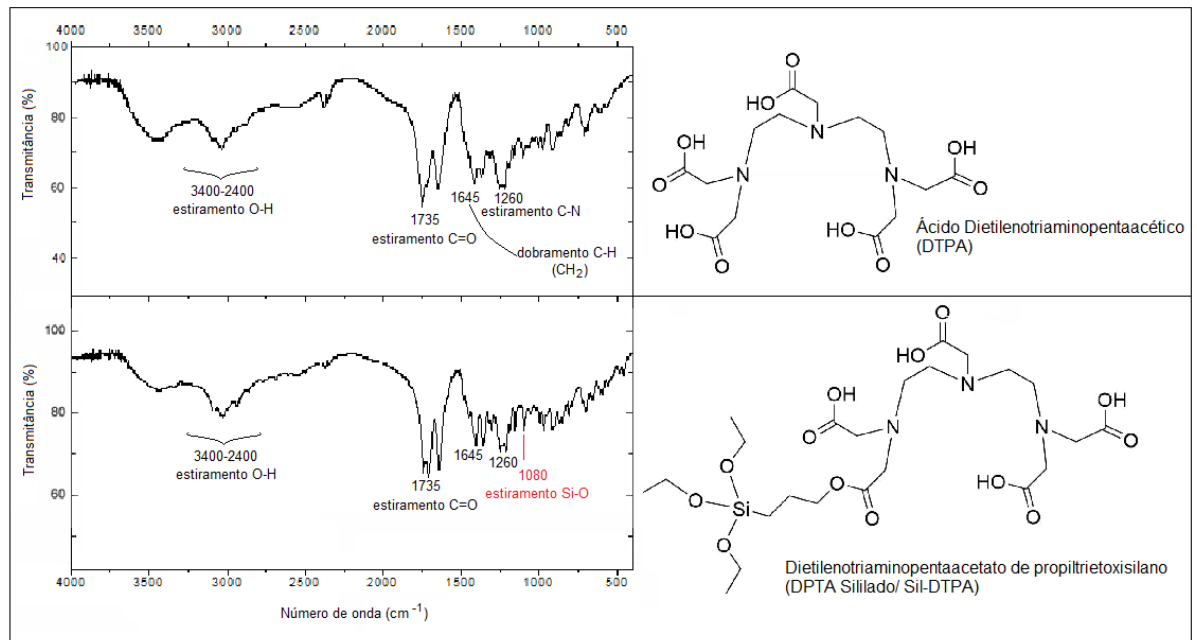
4.4. Quarta Etapa: Modificação do ligante DTPA

O ligante Dietilenotriaminopentacetato foi modificado com a adição de 3-Cloropropiltrietoxissilano (CPTES), resultando em um ligante sililado com a propriedade de se ligar nos grupos silanóis da superfície da nanopartícula recoberta com sílica, pois pelo processo de hidrólise são formados grupos Si-OH no próprio extremo do ligante modificado. Esses grupos silanóis tanto da superfície da sílica que envolve a nanopartícula quanto no extremo do ligante sililado podem, pelo processo de condensação formar a ligação Si-O-Si. Assegurando dessa maneira a inserção do complexo SiIDTPA@Gd³⁺ à nanopartícula.

4.4.1. Espectro no infravermelho

Os espectros no infravermelho do DTPA e do DTPA modificado podem ser observados na Figura 31.

Figura 31 – Espectros no Infravermelho de DTPA (acima) e DTPA sililado (embaixo) com as principais atribuições de bandas.



Fonte: Autoria própria

Em ambos espectros aparecem bandas em aproximadamente 1735 cm⁻¹ característico do estiramento correspondente as ligações C=O das cinco carbonilas presentes em ambas moléculas (PAVIA et al., 2013; SIVERSTEIN et al., 2007; LI et al., 2008; LI et al., 2018). Também há banda comum em aproximadamente 1345 cm⁻¹ que podem ser atribuídas ao estiramento das ligações C-N das três aminas terciárias presentes em ambas moléculas.

Outra característica compartilhada dos espectros são as bandas largas entre 2400 cm⁻¹ e 3400 cm⁻¹ que corresponde ao estiramento da ligação O-H dos grupos ácidos. A banda em aproximadamente 1465 cm⁻¹ pode ser atribuída ao dobramento das ligações C-H dos grupos metilenos (CH₂) presentes em ambas moléculas.

No espectro de DTPA modificado por sililação os sinais em 1100 cm⁻¹ (entre 1000 e 1250 cm⁻¹) são atribuídos ao estiramento assimétrico das ligações Si-O,

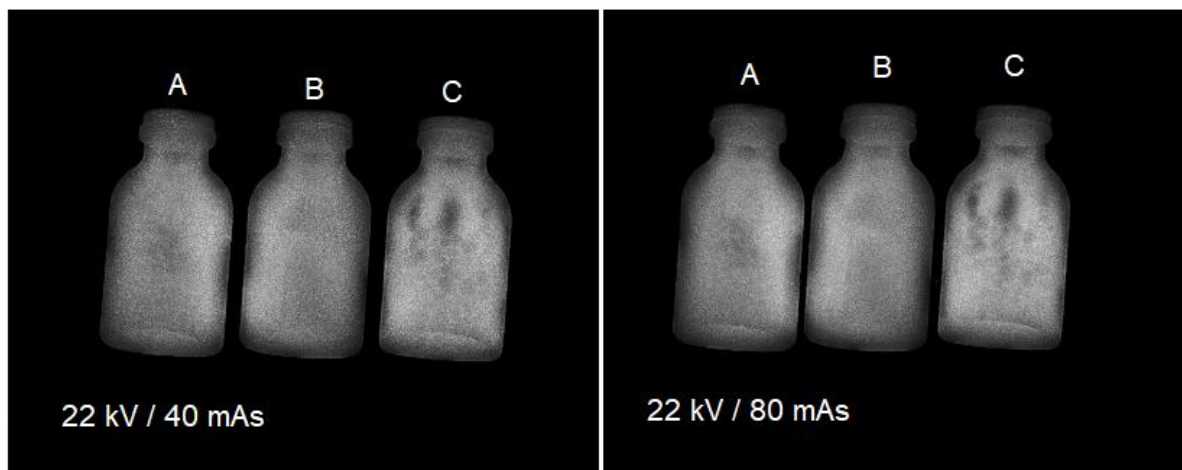
sugerindo que a reação com cloro-propil-trietóxi-silano ocorreu e que houve a inserção dos grupos Si-O na molécula de DTPA.

4.5. Testes Imagenológicos

4.5.1. Raios X

As imagens obtidas pela irradiação das amostras de 20 nm de diâmetro, 30 nm e de nanopartículas recobertas com raios X de baixa energia (22 kV) variando corrente do tubo medida em mAs (miliampère por segundo) são apresentadas na Figura 32.

Figura 32 – Imagens de Raios X obtidas por mamógrafo de soluções coloidais de nanopartículas com e sem recobrimento. A- nanopartículas de 20 nm, B- nanopartículas de 30 nm e C- nanopartículas recobertas. À esquerda imagem realizada a 40 mAs, à direita 80 mAs. Ambas a 22 kV.

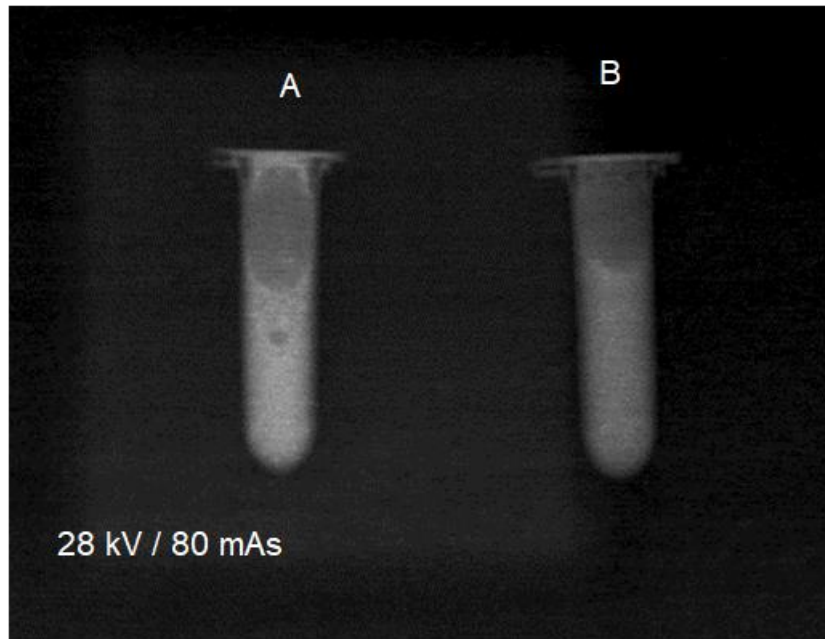


Fonte: Autoria própria

A voltagem do tubo medida em quilovolt (kV) controla a tensão aplicada e em equipamentos para mamografia são utilizadas tensões entre 20 e 30 kV, ou seja comparativamente com as radiografias convencionais geram uma tensão menor. A maior tensão se obtém mais penetração o que aumenta o contraste na escala de cinza. A corrente do tubo medida em miliampère (mA) por unidade de tempo, segundo (s) por exemplo, determina a quantidade de radiação que afeta a densidade radiográfica (DANCE, 2007; BUSHONG, 2020).

A imagem obtida da amostra de nanopartículas recobertas em comparação com água se é mostarda na Figura 33.

Figura 33 – Imagens de Raios X obtidas por mamógrafo de solução coloidal de nanopartículas de ouro recobertas com sílica (A) e água (B) realizada a 28 kV e 80 mAs.



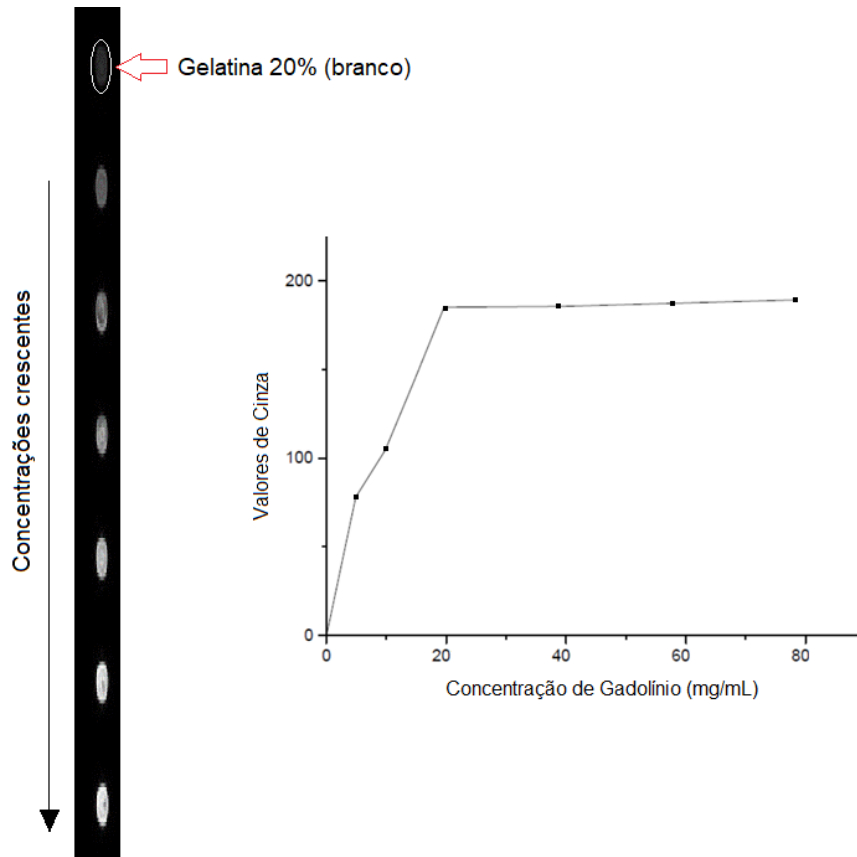
Fonte: Autoria própria

As imagens obtidas se mostraram promissoras para a utilização das nanopartículas sintetizadas como contraste para tomografia computadorizada (CT) devido a que ambas técnicas de diagnóstico (tomografia e mamografia) utilizam os mesmos princípios para a geração de imagem (irradiação por raios X) (HSIEH, 2013). As amostras apresentaram visualmente uma atenuação de raios X que pode ser boa para contraste.

4.5.2. Imagem por Ressonância Magnética Nuclear

A imagem obtida por ressonância magnética nuclear em T1 para concentrações crescentes de nanopartículas recobertas de diâmetro aproximado de 30 nm e o gráfico de valores de cinza em função de concentração de gadolínio (III) é mostrada na Figura 34.

Figura 34 – Imagem por Ressonância Magnética em T1 de nanopartículas de 30 nm, o branco está indicado com uma seta. Gráfico de Intensidade de branco em função da concentração de Gd^{3+} (à direita).

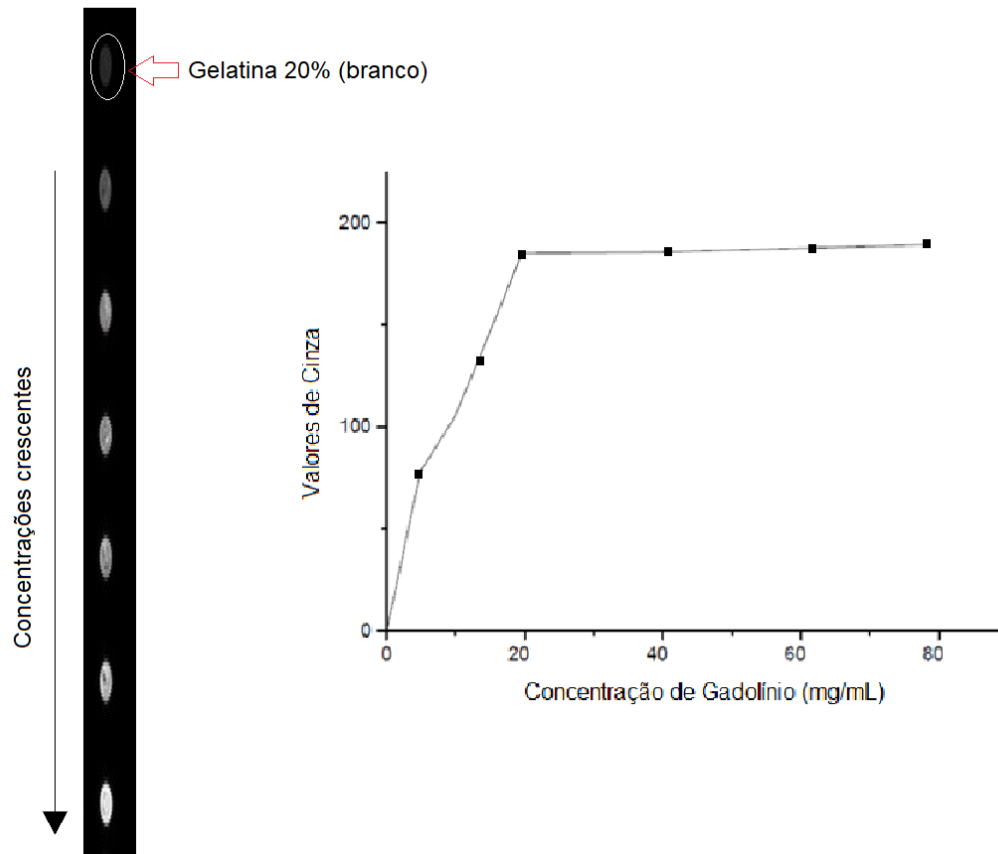


Fonte: Autoria própria

Na Figura 34 pode se observar um aumento na escala de cinza, ou seja, mais branco na imagem consequentemente maior contraste em comparação da gelatina 20% utilizado para imitar o tecido mole do organismo. Esse aumento é quase linear até o ponto 3, aproximadamente na concentração de 18 mg/mL. A partir desse ponto o aumento na escala de cinza é quase desprezível sugerindo uma saturação ou possível deposição das nanopartículas com consequente aglomeração. A gelatina 20% é considerada o ponto zero arbitrário na escala de cinzas.

Também foi realizada a obtenção de imagens para RMN em T1 para concentrações crescentes de nanopartículas recobertas com sílica de diâmetro aproximado de 60 nm. A imagem e o gráfico de valores de cinza em função de concentração de gadolínio (III) pode ser observada na Figura 35.

Figura 35 – Imagem por Ressonância Magnética em T1 de nanopartículas de 60 nm, o branco está indicado com uma seta. Gráfico de Intensidade de branco em função da concentração de Gd^{3+} (à direita).



Fonte: Autoria própria

O aumento na escala de cinzas das nanopartículas de 60 nm mostra um comportamento similar ao mostrado pelas nanopartículas de 30 nm. Um aumento quase linear até o ponto 3, por volta de 18 mg/mL de gadolínio (III) o que pode sugerir que para T1 o tamanho das nanopartículas não tem uma influência grande para o aumento da escala de cinzas e conseqüentemente o contraste em comparação com o que foi considerado como tecido mole do organismo (gelatina 20%). Outra coisa a considerar é a provável deposição das nanopartículas levando à aglomeração das nanopartículas o que pode ter levado a comportamentos similares de ambos conjuntos de tamanho de nanopartículas.

5. CONCLUSÕES

Nanopartículas de ouro de tamanhos que variam de 5 nm a 30 nm foram sintetizadas em soluções coloidais estáveis caracterizadas por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS). As nanopartículas maiores (30 nm) foram recobertas com uma camada de sílica contendo o corante fluorescente modificado Succinimidil Rodamina B. A camada apresentou uma espessura de aproximadamente 3,5 nm caracterizadas por DLS. A substância fluorescente utilizada para o estudo Rodamina B foi modificada com sucesso com NHS éster formando a substância Succinimidil Rodamina B, modificação essa caracterizada por espectroscopia no Infravermelho, Ressonância Magnética RMN ^1H e ^{13}C , Experimento de Intensificação do Sinal sem Distorção por Transferência de Polarização – Ângulo de 135° (DEPT 135) e Espectroscopia de UV – Visível (UV-Vis). O ligante DTPA foi modificado por silição caracterizado por espectroscopia no Infravermelho (FTIR). Os resultados nos testes imagiológicos de raios X (feitos com mamógrafo) se mostraram promissores para a utilização de nanopartículas como agentes de contraste em Tomografia Computadorizada (CT). Os estudos para Imagem por Ressonância Magnética (MRI) também se mostraram promissores para a utilização das nanopartículas sintetizadas como agentes de contraste em MRI, pois o aumento no contraste em comparação com a amostra que imita os tecidos moles do organismo (gelatina 20%) se mostrou quase linear até uma concentração de Gd^{3+} de aproximadamente 18 mg/mL em ambas populações de nanopartículas (30 e 60 nm), mantendo a intensidade em concentrações superiores.

6. PERSPECTIVAS

Realizar a caracterização das nanopartículas por Microscopia Eletrônica por Transmissão (TEM).

Realizar os espectros de Excitação e de Emissão das nanopartículas recobertas no espectrofotômetro.

Realizar os testes de imagem de Tomografia Computadorizada.

Realizar ensaios de citotoxicidade por MTT.

REFERÊNCIAS

- ALLOUCHE, Joachim et al. Biomimetic core–shell gelatine/silica nanoparticles: a new example of biopolymer-based nanocomposites. **Journal of Materials Chemistry**, v.16, n.30, p.3120-3125, 2006.
- ALRIC, Christophe. et al. Gadolinium chelate coated gold nanoparticles as contrast agents for both X-ray computed tomography and magnetic resonance imaging. **Journal of the American Chemical Society**, v.130, n.18, p.5908-5915, 2008.
- AMENDOLA, Vincenzo et al. Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v.29, n.20, 2017.
- ARRUEBO, Manuel et al. Development of magnetic nanostructured silica-based materials as potential vectors for drug-delivery applications. **Chemistry of Materials**, v.18, n.7, p.1911-1919, 2006.
- BARROSO, Gilvan et al. Polymeric and ceramic silicon-based coatings—a review. **Journal of materials chemistry A**, v. 7, n. 5, p. 1936-1963, 2019.
- BATTULA, Himabindu et al. Distinct rhodamine B derivatives exhibiting dual effect of anticancer activity and fluorescence property. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 6, p. 100026, 2021.
- BLOCH, Felix; HANSEN, William & PACKARD, Martin. The nuclear induction experiment. **Physical Review**, v.70, n. 7-8, p.474-485, 1946.
- BUSHONG, Stewart C. **Radiologic Science for Technologists E-Book: Physics, Biology, and Protection**. Elsevier Health Sciences, 2020.
- CAMPOS, Kevin et al. The importance of synthetic chemistry in the pharmaceutical industry. **Science**, v. 363, n. 6424, 2019.
- CARAVAN, Peter et al. Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications. **Chemical Reviews**, v.99, n.9, p.2293-2352, 1999.
- CARAVAN, Peter. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. **Chemical Society Reviews**, v.35, n.6, p.512-523, 2006.
- CHABLOZ, Nicolas et al. Polyfunctionalised Nanoparticles Bearing Robust Gadolinium Surface Units for High Relaxivity Performance in MRI. **Chemistry – A European Journal**, v.25, n.46, p.10895-10906, 2019.
- CHEN, Qian et al. Targeted CT/MR dual mode imaging of tumors using multifunctional dendrimer-entrapped gold nanoparticles. *Biomaterials*, v.34, n.21, p.5200-5209, 2013.
- CHRISTIANSEN, Cathrine. X-ray contrast media-an overview. **Toxicology**, v. 209, n. 2, p. 185–187, 2005.
- COCHRAN, Sachiko T. Anaphylactoid reactions to radiocontrast media. **Current allergy and asthma reports**, v. 5, n. 1, p. 28-31, 2005.
- DALE, Brian M.; BROWN, Mark A.; SEMELKA, Richard C. **MRI: basic principles and applications**. John Wiley & Sons, 2015.

DAMADIAN, Raymond. Tumor Detection by Nuclear Magnetic Resonance. **Science**, v.171, n.3976, p.1151-1153, 1971.

DANCE, David R. Physical principles of mammography. In: **Physics for Medical Imaging Applications**. Springer, Dordrecht, p. 355-365, 2007.

DE MARCO, Bianca Aparecida et al. Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. **Saudi pharmaceutical journal**, v. 27, n. 1, p. 1-8, 2019.

DUARTE, Adriana et al. Structural and Luminescence Properties of Silica-Based Hybrids Containing New Silylated-Diketonato Europium(III) Complex. **The Journal of Physical Chemistry C**, v.116, n.1, p.505-515, 2012.

ELING, Charlotte et al. A Dual-Modal SERS/Fluorescence Gold Nanoparticle Probe for Mitochondrial Imaging. **ChemPlusChem**, v.82, n.5, p.674-680, 2017.

FARAG, Alaa & YAHIA, Ibrahim. Structural, absorption and optical dispersion characteristics of rhodamine B thin films prepared by drop casting technique. **Optics Communications**, v. 283, n. 21, p.4310-4317, 2010.

FRACKOWIAK, Danuta. The Jablonski Diagram. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.2, n.3, p.399, 1988.

FRIEDMAN, Barry R. et al. **Principles of MRI**. United States, 1989.

FUCHS, Victor R.; SOX JR, Harold C. Physicians' views of the relative importance of thirty medical innovations. **Health Affairs**, v. 20, n. 5, p. 30-42, 2001.

GALLINA, Maria et al. Aptamer-conjugated, fluorescent gold nanorods as potential cancer theradiagnostic agents. **Materials Science and Engineering: C**, v.59, p.324-332, 2016.

HAINFELD, J. F. et al. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. **The British journal of radiology**, v. 79, n. 939, p. 248-253, 2006.

HEANEY, Peter J.; PREWITT, Charles T.; GIBBS, Gerald V. (Ed.). **Silica: Physical behavior, geochemistry, and materials applications**. Walter de Gruyter GmbH & Co KG, 2018.

HO, Jessica & HENDI, Arun. Recent trends in life expectancy across high income countries: retrospective observational study. **BMJ**, v. 362, 2018.

HSIEH, Jiang. **Computed tomography: principles, design, artifacts, and recent advances**. SPIE press, 2003.

HUO, Qisheng et al. A new class of silica crosslinked micellar core-shell nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v.128, n.19, p.6447-6453, 2006.

ISHERWOOD, Ian. Sir Godfrey Hounsfield. **Radiology**, v.234, n.3, p975, 2005.

JABLONSKI, Aleksander. Über den Mechanismus der Photolumineszenz von Farbstoffphosphoren. **Zeitschrift für Physik**, v.94, n.1-2, p.38-46, 1935.

JAMSHIDI, Mohammad et al. Artificial intelligence and COVID-19: deep learning approaches for diagnosis and treatment. **Ieee Access**, v. 8, p. 109581-109595, 2020.

JANA, Nikhil; GEARHEART, Latha & MURPHY, Catherine. Seeding growth for size control of 5-40 nm diameter gold nanoparticles. **Langmuir**, v.17, n.22, p.6782-6786, 2001.

JIA, Yachao et al. Regeneration of large bone defects using mesoporous silica coated magnetic nanoparticles during distraction osteogenesis. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 21, p. 102040, 2019.

JIANG, Xianfa et al. Synthesis and formation mechanism of amorphous silica particles via sol-gel process with tetraethylorthosilicate. **Ceramics International**, v. 45, n. 6, p. 7673-7680, 2019.

KALENDER, Willi. X-ray computed tomography. **Physics in Medicine and Biology**, v.51, n. 13, p. R29-R43, 2006.

KIM, Jong In & KIM, Gukbin. Effects on inequality in life expectancy from a social ecology perspective. **BMC public health**, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2018.

KUMAR, Krishan & TWEEDLE, Michael. Macrocyclic polyaminocarboxylate complexes of lanthanides as magnetic resonance imaging contrast agents. **Pure and Applied Chemistry**, v.65, n.3, p.515-520, 1993.

LAKOWICKZ, Joseph. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed. New York, Springer, 2006.

LAMER, Victor & DINEGAR, Robert. Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. **Journal of the American Chemical Society**, v.72, n. 11, p.4847-4854, 1950.

LAROWSKA, D. et al. Graphene Oxide Functionalized with Cationic Porphyrins as Materials for the Photodegradation of Rhodamine B. **The Journal of Physical Chemistry C**, v.124, n.29, p.15769-15780, 2020.

LAUTERBUR, Paul. Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance. **Nature**, v.242, p.190-191, 1973.

LECHEVALLIER, S. et al. Luminescence Properties of Mesoporous Silica Nanoparticles Encapsulating Different Europium Complexes: Application for Biolabelling. **Journal of Nanomaterials**, v.2013, p.1-11, 2013.

LEDDA, Caterina; SENIA, Paola & RAPISARDA, Venerando. Biomarkers for early diagnosis and prognosis of malignant pleural mesothelioma: The quest goes on. **Cancers**, v. 10, n. 6, p. 203, 2018.

LEE, Nohyun; CHOI, Seung & HYEON, Taeghwan. Nano-sized CT contrast agents. **Advanced Materials**, v.25, p. 2641-2660, 2013.

LI, Mei-fang et al. Performance of magnetic graphene oxide/diethylenetriaminepentaacetic acid nanocomposite for the tetracycline and ciprofloxacin adsorption in single and binary systems. **Journal of colloid and interface science**, v. 521, p. 150-159, 2018.

LI, Weisheng et al. Synthesis and evaluation of Gd-DTPA-labeled arabinogalactans as potential MRI contrast agents. **Carbohydrate research**, v. 343, n. 4, p. 685-694, 2008.

LIU, Yanlan; AI, Kelong & Lu, Lehui. Nanoparticulate X-ray computed tomography contrast agents: from design validation to in vivo applications. **Accounts of Chemical Research**, v.45 n.12, p. 1817-1827, 2012.

LO, L. et al. Diffusion-weighted MR imaging in early diagnosis and prognosis of hypoglycemia. **American Journal of Neuroradiology**, v. 27, n. 6, p. 1222-1224, 2006.

LOPES, Agliane. Inserção do fármaco clorambucil modificado à superfície de nanopartícula de ouro. **Dissertação** (Mestrado em Química) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande (MS) P. 79, 2017.

LUO, Teng et al. Mesoporous silica-coated gold nanorods with embedded indocyanine green for dual mode X-ray CT and NIR fluorescence imaging. **Optics Express**, v.19, n.18, p.17030-17039, 2011.

MAHAN, Matthew & DOIRON, Amber. Gold Nanoparticles as X-Ray, CT, and Multimodal Imaging Contrast Agents: Formulation, Targeting, and Methodology. **Journal of Nanomaterials**, v.2018, p.1-15, 2018.

MCKINNON, Katherine. Flow Cytometry: An Overview. **Current Protocols in Immunology**, v.120, n.5, p.1-5, 2018.

MENG, Qinghua et al. Synthesis and application of N-hydroxysuccinimidyl rhodamine B ester as an amine-reactive fluorescent probe. **Dyes and Pigments**, v.73, n.2, p.254-260, 2007.

MENZEL, Roland. Fluorescence in Forensic Science. In: **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Chichester, UK: John Wiley and Sons, Ltd, 2006.

MEZACASA, Adalberto. Síntese e caracterização de nanopartículas de óxido de tântalo como possível carreador de clorambucil e contraste de diagnóstico por imagem. **Tese** (Doutorado em Química) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande (MS) P. 142, 2020.

MOLLEMAN, Bastiaan & HIEMSTRA, Tjisse. Size and shape dependency of the surface energy of metallic nanoparticles: unifying the atomic and thermodynamic approaches. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 20, n. 31, p. 20575-20587, 2018.

NATH, Sudip et al. Is Gold Really Softer than Silver? HSAB Principle Revisited. **Journal of Nanoparticles Research**, v.8, p.111–116, 2006.

OLARU, Niculae et al. Synthesis and testing of cellulose acetate nicotinate as adsorbent for rhodamine B dye. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, n. 29, p. 47772, 2019.

PAUL, Debleena et al. Artificial intelligence in drug discovery and development. **Drug Discovery Today**, v. 26, n. 1, p. 80, 2021.

PAVIA, Donald et al. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. Philadelphia, W.B. Saunders Co, 2013.

PEER, Dan et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotech**, v.2, p.751-760, 2007.

PERRY, Hannah; BOTNAR, René & WILTON-ELY, James. Gold nanomaterials functionalised with gadolinium chelates and their application in multimodal imaging and therapy. **Chemical Communications**, v.56, n.29, p.4037-4046, 2020.

PURCELL, Edward; TORREY, Henry & POUND, Robert. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. **Physical Review**, v.69, p.37-38, 1946.

ROSER, Max; ORTIZ-OSPINA, Esteban; RITCHIE, Hannah. Life Expectancy. **Our World in Data**. 2013. Disponível em: <https://ourworldindata.org/life-expectancy>. Acesso em: 1.dez.2021.

ROSS, Ryan et al. Effects of Functionalized Gold Nanoparticle Size on X-ray Attenuation and Substrate Binding Affinity. **Chemistry of Materials**, v. 26, n. 2, p. 1187-1194, 2014.

ŞAHUTOĞLU, Ayşenur & KAYA, İsmet. Synthesis and a new mercury (II) ion sensor application of conductive polymer containing rhodamine B. **Reactive and Functional Polymers**, v. 141, p. 50-57, 2019.

SCHNEIDER, Petra et al. Rethinking drug design in the artificial intelligence era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 19, n. 5, p. 353-364, 2020.

SCHULZENDORF, Mathias et al. Biphasic synthesis of Au@SiO₂ core-shell particles with stepwise ligand exchange. **Langmuir**, v.27, n.2, p.727-732, 2011.

SCHWENZER, Nina et al. Non-invasive assessment and quantification of liver steatosis by ultrasound, computed tomography and magnetic resonance. **Journal of Hepatology**, v.51, n.3, p.433-445, 2009.

SILVERSTEIN, Robert et al. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2007.

SMITH, Lloyd et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. **Nature**, v.321, p.674-679, 1986.

STOKES, George. On the change of refrangibility of light. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v.142, p.463-562, 1852.

TIAN, Chixia et al. Poly(acrylic acid) Bridged Gadolinium Metal–Organic Framework–Gold Nanoparticle Composites as Contrast Agents for Computed Tomography and Magnetic Resonance Bimodal Imaging. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v.7, n.32, p.17765-17775, 2015.

VOLLATH, Dieter; FISCHER, Franz Dieter & HOLEC, David. Surface energy of nanoparticles–influence of particle size and structure. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 9, n. 1, p. 2265-2276, 2018.

VOLSI, Anna Li et al. Hybrid Gold/Silica/Quantum-Dots supramolecular-nanostructures encapsulated in polymeric micelles as potential theranostic tool for targeted cancer therapy. **European Polymer Journal**, v. 105, p. 38-47, 2018.

WANG, Carolyn et al. Frequency, management, and outcome of extravasation of nonionic iodinated contrast medium in 69 657 intravenous injections. **Radiology**, v. 243, n. 1, p.80-87, 2007.

WANG, Ya et al. Review of Cellulose Nanocrystal-based Fluorophore Materials and Their Application in Metal Ion Detection. **Paper and Biomaterials**, 2018.

WEN, Shihui et al. Multifunctional dendrimer-entrapped gold nanoparticles for dual mode CT/MR imaging applications. **Biomaterials**, v.34, n.5, p.1570-1580, 2013.

YADAV, Monika et al. Rapid selective optical detection of sulfur containing agrochemicals and amino acid by functionalized cyclodextrin polymer derived gold nanoprobles. **Microchemical Journal**, v. 169, p. 106630, 2021.

YU, Shi-Bao; WATSON, Alan. Metal-based X-ray contrast media. **Chemical Reviews**, v.99, n. 9, p.2353-2377, 1999.