

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DENISE RAQUEL BOHN KOBELINSKI

**Síntese sob demanda de mimético funcional da enzima
superóxido dismutase em resposta a ambiente oxidante**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química.

Profa. Dra. Fernanda Poletto
Orientadora

Prof. Dr. Fabiano Bernardi
Coorientador

Porto Alegre, julho de 2017.

A presente dissertação foi realizada inteiramente pela autora, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre agosto de 2015 e agosto de 2017, no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob orientação da Professora Doutora Fernanda Poletto e coorientação do Professor Doutor Fabiano Bernardi. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Ana Maria Percebom
Departamento de Química
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Rosane Michele Duarte Soares
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Tania Maria Haas Costa
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Fernanda Poletto
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Denise Raquel Bohn Kobelinski

Agradecimentos

Ao programa de capacitação da UFRGS que me motivou e viabilizou espaço e tempo para a realização desta etapa de formação profissional.

Agradeço aos meus colegas de trabalho Ronei, Tao e Eduardo, Thaniele, Mariana, que prontamente se dispuseram a suportar as atividades sob minha responsabilidade no CMM, durante minha ausência.

À Professora Fátima Guma e ao professor Daniel Baptista, diretores do Centro de Microscopia e Microanálise, sem o apoio de quem seria impossível concluir este mestrado no prazo estipulado.

Aos meus pais e marido, que acreditam que posso superar todos os desafios, mesmo quando nem eu acredito. Que com seu amor e compreensão, ao seu modo, redobram seus esforços para que eu pudesse submergir no mundo acadêmico.

Aos meus filhos queridos que, sem entender ainda, aceitaram um carinho mais breve do que deveria ser, mas intenso no amor e certeza da importância de travar essa batalha, por eles e por mim.

Às minhas amigas Vanessa Amorim de Amorim, Marina Laranjo, Luciane Elly e Juliana Troleis, mães, mulheres, profissionais e estudantes, que me lembraram, ao aceitarem desafios semelhantes e maiores que este, sempre que estive em dúvida, que é possível e que o mais importante é começar e persistir.

Aos meus colegas técnicos do Instituto de Química e do Centro de Microscopia que me apoiaram e salvaram nos momentos cruciais, com dicas, sorrisos e pequenas porções de reagentes.

Aos colegas mestrandos e graduandos que me ajudaram, compartilhando conhecimento e angústias, ao longo da realização das cadeiras eletivas e obrigatórias, e da confecção dessa dissertação, os quais represento através dos nomes: Jordana, Filomeno, Pascal, Alisson, Guilherme, Lívia, Henrique.

Agradeço ao Alisson Steffli Thill e Professor Fabiano Bernardi pelo companheirismo na realização dos ensaios no LNLS e pela realização dos ajustes das curvas de XAS e quantificações.

Ao meu grupo de pesquisas composto pela Bruna, Maira, Nataly, Alice, Bárbara e que contribuíram com muitas dúvidas e atenção.

À guerreira, organizada e constante Francielli Lobato, a “minha” super IC que me apoiou em cada fase, sugerindo, rindo, lembrando, corrigindo, alertando, ouvindo e suando a camisa comigo.

Agradeço ainda a minha primeira professora de química que pela primeira vez me encantou: Gleci Conti Petry, em Novo Hamburgo. A prof^a Dalva, da fundação Liberato, que primeiramente me sensibilizou para a responsabilidade que se assume ao ser químico.

E ainda, a minha orientadora Fernanda Poletto, que amorosamente me conduziu nesta jornada, aceitando minhas limitações e impondo desafios, sem deixar de apontar a luz no fim do túnel. E ao meu coorientador Fabiano Bernardi, que com a paciência de quem sabe que química é diferente de física, explicou e reexplicou o óbvio e o não-óbvio.

À professora Dinara Jaqueline Moura e Luiza Steffens por dividirem comigo seu conhecimento de bioquímicas e, em seu laboratório de Genética Toxicológica (UFCSPA), terem conduzidos os ensaios de SOD-like.

À Simone Betim e sua equipe do laboratório de química do LNLS que ensinaram técnicas de preparo de amostras e cuidaram dos detalhes para que não faltassem os materiais e cuidados para a condução da pesquisa.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (CNPEM/MCTI – Campinas, Brasil) pelo acesso às instalações das linhas de luz SAXS1 e XAFS2. Ao Instituto de Física pela disponibilização do difratômetro de raios X. Ao Laboratório de Materiais Poliméricos (LAPOL – UFRGS) pelas análises de TGA e ao Centro de Microscopia e Microanálise (CMM – UFRGS) pela disponibilização dos microscópios eletrônicos.

Resumo para Divulgação a Leigos

Enzimas são substâncias naturais que têm a função de promover reações químicas importantes para o adequado funcionamento do nosso organismo. Uma enzima-chave na degradação de toxinas produzidas pelo organismo chama-se superóxido dismutase. Quando esta enzima não é produzida, ocorre acúmulo de um composto tóxico denominado ânion radical superóxido no organismo, levando ao surgimento de várias doenças degenerativas. A suplementação de superóxido dismutase a pacientes que não produzem essa enzima é uma estratégia de tratamento que apresenta várias limitações. O presente estudo de mestrado dedicou-se a encontrar formas de produzir um sistema sintético capaz de imitar a ação da superóxido dismutase como alternativa de tratamento mais eficaz. Esse sistema consistiu em partículas esféricas extremamente pequenas contendo cério (um elemento químico presente no mineral monazita), aprisionadas no interior de uma rede altamente organizada de lipídio e água. Essa rede foi fundamental para dificultar a imediata dissolução das partículas em água, o que impediria sua utilização para os fins pretendidos. Cerio foi escolhido por ser capaz de doar e receber facilmente um elétron após formar ligação com o elemento oxigênio. Essa característica é fundamental para que possa atuar na degradação do ânion radical superóxido. A partir dos resultados obtidos, foi possível demonstrar que o sistema é ativado na presença de um componente químico presente apenas em locais no organismo onde a ação da enzima superóxido dismutase é necessária. Ensaios realizados de forma simplificada em laboratório mostraram que o sistema é capaz de imitar a ação da superóxido dismutase após ser ativado. Isto abre perspectivas promissoras para um tratamento inteligente e adaptável às necessidades do paciente no contexto de doenças causadas pela falta de superóxido dismutase no organismo. É importante ressaltar que este estudo de mestrado deteve-se no desenvolvimento e compreensão aprofundada dos aspectos químicos e físicos do sistema, podendo ser classificado como ciência básica. Ainda há um longo caminho a ser percorrido antes que esse sistema possa estar disponível no arsenal terapêutico dos médicos.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. SISTEMAS AUTOASSOCIADOS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS	3
2.1.1. Química supramolecular	3
2.1.2. Cristais líquidos liotrópicos	5
2.1.3. Nanopartículas de óxidos de metal	11
2.2. NANOPARTÍCULAS CONTENDO CÉRIO	13
2.2.1. Óxidos e hidróxidos de cério nanoparticulados	13
2.2.2. Técnicas de caracterização de nanopartículas contendo cério	16
2.2.3. Nanopartículas de óxido de cério como miméticos funcionais de oxirredutases	20
2.3. PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO: UM GATILHO BIOQUÍMICO PROMISSOR	22
2.3.1. Microambientes biológicos oxidantes	22
2.3.2. Oxidação de Ce(III) a Ce(IV) na presença de H ₂ O ₂	23
3. OBJETIVOS	25
4. PARTE EXPERIMENTAL	26
4.1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	26
4.1.1. Reagentes, solventes e outros materiais de consumo	26
4.1.2. Equipamentos	27
4.2. MÉTODOS	28
4.2.1. Síntese das nanopartículas de hidróxido de cério (III) em cristal líquido	28
4.2.2. Microscopia óptica	29
4.2.3. Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	29
4.2.4. Análise de nitrogênio total	29
4.2.5. Espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) empregando radiação síncrotron	29
4.2.6. Análise termogravimétrica (TGA)	30
4.2.7. Síntese <i>on-demand</i> das nanopartículas de óxido de cério a partir do material líquido-cristalino pela adição de H ₂ O ₂	30
4.2.8. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	31

4.2.9. Difração de raios X (XRD) das nanopartículas de óxido de cério (IV) em pó -----	32
4.2.10. Estrutura de absorção de raios X próxima à borda (XANES) -----	32
4.2.11. Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) -----	34
4.2.12. Ensaio <i>in vitro</i> para determinação da atividade de superóxido dismutase -----	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	36
5.1. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA LÍQUIDO-CRISTALINO LIOTRÓPICO	
CONTENDO Ce(OH) ₃ NANOPARTICULADO -----	36
5.2. SÍNTESE <i>ON-DEMAND</i> DE NANOPARTÍCULAS DE CeO _(2-x) COMO	
MIMÉTICOS FUNCIONAIS DE SUPERÓXIDO DISMUTASE -----	48
6. CONCLUSÃO -----	64
7. REFERÊNCIAS -----	66
ANEXOS -----	72

Lista de Figuras

- Figura 1. Representação (a) da estrutura química de uma molécula anfifílica genérica, onde estão indicados a área da cabeça polar (A), o volume da cadeia hidrofóbica (v) e o comprimento da cadeia hidrofóbica (l); e (b) de possíveis estruturas supramoleculares de agregados de acordo com faixas de valores de parâmetro de empacotamento crítico (CPP) de surfactantes. A curvatura da superfície que separa o microdomínio lipídico do meio aquoso nos agregados está qualitativamente representada no eixo vertical à direita. Imagem adaptada e reproduzida da referência [23].----- 6
- Figura 2. Estruturas esquemáticas representativas de fases normais, lamelar e reversas de cristais líquidos liotrópicos (onde $[c]$ é a concentração de surfactante em água). Adaptado e reproduzido de [26]. No detalhe, é possível visualizar a representação de fases cúbicas bicontínuas reversas com simetrias $Im3m$, $Pn3m$ e $Ia3d$. ----- 7
- Figura 3. Estruturas químicas (a) da monoleína e (b) do fitantriol. ----- 8
- Figura 4. Diagrama de fase de fitantriol e água, conforme determinado por Barauskas e Landh [41]. (Figura adaptada e reproduzida da referência citada). ----- 11
- Figura 5. Espectro de XAS de uma amostra de CeO_2 comercial na borda L_3 de Ce medido por transmissão. ----- 18
- Figura 6. Esquema de dismutação catalítica do ânion radical superóxido pela enzima superóxido dismutase (SOD), onde M = metal do sítio catalítico. ----- 20
- Figura 7. Esquema da reação de conversão de peróxido de hidrogênio a radical hidroxila *in vivo*. ----- 23
- Figura 8. Esquema de reação proposto entre hidróxido de cério (III) e peróxido de hidrogênio em meio aquoso. ----- 24
- Figura 9. Esquema da síntese de hidróxido de cério (III) a partir do precursor nitrato de cério(III) em meio aquoso alcalino (o ânion nitrato não está representado para fins de clareza; o cério está representado na forma hidratada). ----- 37
- Figura 10. Fotografia das amostras (a) LC e (b) LC-NP_{5,0} após preparação. ----- 37

- Figura 11. Esquema de reação de espécie de Ce(III) em meio aquoso sob exposição à atmosfera ambiente, com formação de espécie de Ce(IV). ----- 38
- Figura 12. Espectros de absorção molecular na região do infravermelho de (a) fitantriol, (b) LC, (c) LC-NP_{2,5}, (d) LC-NP_{5,0}, (e) LC-NP_{7,5}, (f) LC-NP_{10,0} (amostras depositadas em cristal de NaCl). ----- 39
- Figura 13. Imagens representativas de microscopia eletrônica de transmissão de dispersões obtidas a partir das amostras (a) LC-NP_{2,5}, (b) LC-NP_{5,0}, (c) LC-NP_{7,5}, (d) LC-NP_{10,0} (barra = 100 nm, magnificação de 300000 ×) e respectivas distribuições de diâmetro das nanopartículas (mínimo de 5000 partículas por amostra, *software*: ImageJ®) ----- 40
- Figura 14. Curvas de espalhamento de raios X a baixos ângulos das amostras (a) fitantriol em água, (b) LC, (c) LC-NP_{2,5}, (d) LC-NP_{5,0}, (e) LC-NP_{7,5}, (f) LC-NP_{10,0} (temperatura ambiente). No detalhe, está evidenciada a região de 1 a 2 nm⁻¹ para a série LC-NP_x. ----- 42
- Figura 15. Espectros de XANES na borda L₃ do cério dos padrões (a) Ce(NO₃)₃, (b) CeO₂, e das amostras (c) LC-NP_{2,5}, (d) LC-NP_{5,0}, (e) LC-NP_{7,5}, e (f) LC-NP_{10,0} sem tratamento (círculos fechados) e seu respectivo ajuste (linhas). ----- 45
- Figura 16. Curvas termogravimétricas de (a) percentual de massa na amostra e (b) sua primeira derivada (*dm/dT*) em função da temperatura, referentes a fitantriol, padrão de óxido de cério, e às amostras LC, LC-NP_{2,5}, LC-NP_{5,0}, LC-NP_{7,5} e LC-NP_{10,0} (atmosfera: ar).----- 47
- Figura 17. Fotografia da amostra LC-NP_{5,0} mantida (a) em tampão acetato pH 5,5 (0,1 M) ou (b) em tampão acetato pH 5,5 (0,1 M) contendo 120 mM de H₂O₂ (imagens obtidas após 12 h de contato). ----- 49
- Figura 18. Espectros de XANES medidos na borda L₃ do Ce para as amostras em meio tamponado pH 5,5 (0,1 M): (a) LC-NP_{2,5}, (b) LC-NP_{5,0}, (c) LC-NP_{7,5} e (d) LC-NP_{10,0} após 3 e 12 h de contato com 120 mM de H₂O₂. Os espectros das amostras em contato apenas com o tampão (0 h) também estão representados para fins de comparação.----- 50

- Figura 19. Espectro de XANES medidos na borda L_3 do cério para as amostras em meio tamponado pH 7,4 (0,1 M): (a) LC-NP_{2,5}, (b) LC-NP_{5,0}, (c) LC-NP_{7,5} e (d) LC-NP_{10,0} após 12 h de contato com 120 mM de H₂O₂. O espectro da amostra LC-NP_{5,0} em contato apenas com o tampão (0 h) também está representado para fins de comparação. ----- 51
- Figura 20. Imagens das amostras (a) LC-NP_{7,5} e (b) LC antes e após adição de H₂O₂ (120 mM) em tampão pH 5,5 (0,1 M) nos tempos 15 s, 30 s, 3 min e 5 min. ----- 52
- Figura 21. Difrátogramas das amostras (a) ox-NP_{2,5}, (b) ox-NP_{5,0}, (c) ox-NP_{7,5}, (d) ox-NP_{10,0} e (e) padrão de CeO₂. ----- 53
- Figura 22. Imagens representativas de microscopia eletrônica de transmissão das amostras (a) ox-NP_{2,5}, (b) ox-NP_{5,0}, (c) ox-NP_{7,5}, (d) ox-NP_{10,0} (barra = 100 nm, magnificação de 300000 ×) e respectivas distribuições de diâmetro das nanopartículas (mínimo de 1000 partículas por amostra, *software*: ImageJ®). ----- 55
- Figura 23. Espectros de absorção na região do ultravioleta-visível do meio aquoso tamponado (pH 5,5) após 10 min, 1 h, 12 h e 24 h em contato com as amostras (a) LC-NP_{2,5}, (b) LC-NP_{5,0}, (c) LC-NP_{7,5}, (d) LC-NP_{10,0} e (e) LC. Os espectros superiores foram obtidos após contato com o tampão, enquanto que os espectros inferiores respectivos foram obtidos após contato com tampão contendo 120 mM de H₂O₂. ----- 58
- Figura 24. Espectros de absorção na região do ultravioleta-visível do meio aquoso tamponado (pH 7,4) após 10 min, 1 h, 12 h e 24 h em contato com as amostras (a) LC-NP_{2,5}, (b) LC-NP_{5,0}, (c) LC-NP_{7,5}, (d) LC-NP_{10,0} e (e) LC. Os espectros superiores foram obtidos após contato com o tampão, enquanto que os espectros inferiores respectivos foram obtidos após contato com tampão contendo 120 mM de H₂O₂. ----- 59
- Figura 25. Esquema simplificado da reação de auto-oxidação da (-)-adrenalina em meio aquoso tamponado (pH 10,2) exposto ao ar, com formação de ânion radical superóxido e adrenocromo (laranja). ----- 61

Figura 26. Medida da atividade de superóxido dismutase a partir do percentual de inibição da formação de adenocromo decorrente da auto-oxidação catalítica de (-)-adrenalina em tampão aquoso alcalino (pH 10,2), considerando-se um tempo de reação de 15 min. Ácido gálico foi empregado como controle positivo. As amostras foram avaliadas em três concentrações (0,05; 0,10 e 0,25 mg mL⁻¹). ----- 62

Lista de Tabelas

Tabela I.	Posição relativa dos picos de difração de fases de ocorrência mais comum em cristais líquidos liotrópicos e índices de Miller (<i>hkl</i>) correspondentes. -----	10
Tabela II.	Exemplos de precursores de cério e revestimentos orgânicos empregados na síntese por precipitação de nanopartículas de CeO _(2-x) dispersas em meio aquoso visando aplicações biológicas. -----	15
Tabela III.	Componentes empregados na primeira etapa de preparação das nanopartículas de hidróxido de cério (III) em cristal líquido. ----	28
Tabela IV.	Diâmetros médios das nanopartículas de hidróxido de cério (III) presentes nas amostras da série LC-NP _x , obtidos por microscopia eletrônica de transmissão (<i>software</i> : ImageJ®). ----	41
Tabela V.	Percentual de Ce(III) nas amostras da série LC-NP _x conforme preparadas e após contato com meio tamponado na ausência e presença de H ₂ O ₂ (120 mM) em tempos pré-determinados.-----	49
Tabela VI.	Diâmetros médios das nanopartículas de CeO _(2-x) , obtidos por microscopia eletrônica de transmissão (<i>software</i> : ImageJ®). ----	54

Resumo

Nesta dissertação de mestrado, foi proposta uma estratégia inovadora baseada na síntese e liberação *on-demand* de miméticos funcionais de enzima para potencialmente combater doenças relacionadas a estresse oxidativo, tais como câncer, inflamações e demências, de forma que não ocorresse dano a tecidos saudáveis. Para isso, propôs-se a síntese de nanopartículas constituídas por cério no estado reduzido Ce(III), em meio líquido-cristalino composto por fitantriol. O mecanismo envolvido na síntese foi a precipitação de concentrações crescentes do precursor $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pela ação de solução aquosa de NaOH, que levou à formação de nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ com diâmetros de 2-4 nm, bem como induziu a autoassociação do fitantriol na forma de cristal líquido de fase cúbica bicontínua reversa, com grupo espacial $\text{Pn}3\text{m}$. O aprisionamento das nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ no cristal líquido foi fundamental para manter o cério no estado Ce(III). Isto é importante para que o sistema seja capaz de atuar como pró-enzima artificial, sendo ativado por ambiente oxidante. Essa ativação consistiu na oxidação do $\text{Ce}(\text{OH})_3$ a $\text{CeO}_{(2-x)}$ por H_2O_2 como gatilho, em meios tamponados ácido e neutro. A síntese *on-demand* de nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$ com diâmetro de cerca de 1,4 nm a partir dos sistemas líquido-cristalinos foi observada logo após a adição de H_2O_2 ao meio. A diminuição da razão Ce(III)/Ce(IV) nos sistemas foi confirmada por medidas de absorção de raios X. A estrutura cristalina tipo fluorita das nanopartículas formadas foi evidenciada por difração de raios X, corroborando tratar-se de $\text{CeO}_{(2-x)}$. As nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$ foram liberadas para o meio aquoso externo e apresentaram atividade de superóxido dismutase em ensaio *in vitro*. Essa atividade decorreu da facilidade de interconversão entre os estados Ce(III) e Ce(IV) na superfície das nanopartículas.

Abstract

In this work, *on-demand* synthesis and release of functional enzyme mimetics were proposed as an innovative strategy to potentially overcome oxidative stress-related diseases, such as cancer, inflammation and dementia with minimum damage to healthy tissues. In order to achieve this goal, the colloidal synthesis of reduced cerium-based nanoparticles was carried out in lyotropic liquid crystal composed of phytantriol by an *in situ* precipitation mechanism. The liquid crystal structure presented reverse cubic bicontinuous phase with Pn3m symmetry. Increasing concentrations of $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ as precursor were evaluated and aqueous NaOH was chosen as precipitating agent to obtain the $\text{Ce}(\text{OH})_3$ nanoparticles, which showed 2-4 nm mean sizes. The entrapment of $\text{Ce}(\text{OH})_3$ into the liquid crystal was fundamental to maintain cerium in the Ce(III) reduced state. A highly Ce(III)/Ce(IV) ratio was desirable because $\text{Ce}(\text{OH})_3$ should act as an artificial proenzyme in this study. The activation of the system was done through the oxidation of $\text{Ce}(\text{OH})_3$ to $\text{CeO}_{(2-x)}$ by H_2O_2 as trigger in acid and neutral buffered media. *On-demand* synthesis of $\text{CeO}_{(2-x)}$ nanoparticles with around 1.4 nm mean sizes was observed just after the trigger was added to the medium containing the liquid crystalline systems. The Ce(III)/Ce(IV) ratio was reduced due to the presence of H_2O_2 as confirmed by X-ray absorption spectroscopy measurements. The fluorite crystalline structure of the nanoparticles determined from X-ray diffraction indicated that $\text{CeO}_{(2-x)}$ was obtained in response to the oxidative environment. $\text{CeO}_{(2-x)}$ nanoparticles were released to the medium and showed superoxide dismutase-like activity. This occurred due to the ability of cerium to interchange between the (III) and (IV) oxidation states on the nanoparticle surface.

1. INTRODUÇÃO

O estudo de enzimas artificiais com potencial aplicação biomédica é uma área emergente no cenário científico internacional. Miméticos de enzimas nanoparticulados vêm atraindo particular interesse nessa área devido às suas propriedades únicas se comparadas com enzimas de origem natural ou enzimas artificiais clássicas, tais como menor custo, maior robustez e atividade dependente de seu tamanho e composição química. Nesse contexto, nanopartículas de óxido de cério encontram lugar de destaque pela facilidade de conversão entre os estados Ce(III) e Ce(IV) em sua superfície, que abre a possibilidade de mimetizar a ação de diversas enzimas envolvidas em reações redox, tais como a superóxido dismutase. Ambientes oxidantes são encontrados em regiões inflamadas e tumores, como consequência da resposta do organismo a lesões. Em outros casos, o estresse oxidativo é causado por depleção de enzimas naturais responsáveis pela depuração de espécies reativas de oxigênio, como no caso de demências. Independentemente da origem, ambientes oxidantes estão geralmente associados a graves danos teciduais.

Embora sejam altamente promissoras para tratamento de doenças envolvendo estresse oxidativo no local de ação, nanopartículas de óxido de cério que contenham baixo teor de Ce(III), e por isso apresentem caráter oxidante, podem causar oxidação em tecidos saudáveis, justamente pela facilidade de interconversão dos estados Ce(III) e Ce(IV) na sua superfície. O revestimento das nanopartículas com compostos orgânicos não representa uma estratégia eficaz para resolver este problema, pois em geral ele contribui para reduzir a agregação das nanopartículas sem afetar a reatividade na sua superfície.

Frente ao exposto, o presente estudo de mestrado foi dedicado a encontrar uma solução para essa questão altamente desafiadora. Para isso, propôs-se um sistema constituído de nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ capaz de atuar como uma pró-enzima funcional sintética. Por estar na forma reduzida Ce(III), o cério seria menos propenso a oxidar os tecidos saudáveis estando na forma $\text{Ce}(\text{OH})_3$. Porém, em condições fisiológicas, esse composto tende a dissociar-se no meio aquoso. Por isso, foi desenvolvida uma estratégia inovadora de síntese de nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ diretamente em cristal líquido liotrópico. O aprisionamento em cristal líquido teve como objetivo manter o $\text{Ce}(\text{OH})_3$ na forma coloidal em meio aquoso com valores de pH semelhantes àqueles encontrados em condições fisiológicas. Até o advento desta dissertação de mestrado, não foram encontrados relatos sobre a síntese *in situ* de nanopartículas contendo cério em cristais líquidos liotrópicos. Peróxido de hidrogênio

(espécie reativa de oxigênio comum em processos inflamatórios) foi proposto como indutor da ativação *on-demand* da pró-enzima sintética, transformando-a em $\text{CeO}_{(2-x)}$, sua forma ativa. As nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$ sintetizadas em resposta a um ambiente oxidante teriam capacidade de mimetizar a atividade da enzima superóxido dismutase. A presente dissertação aborda um tema de fronteira sob uma perspectiva interdisciplinar, combinando princípios da química, da física e da biologia e empregando técnicas avançadas de caracterização do sistema oriundas de diversas áreas do conhecimento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. SISTEMAS AUTOASSOCIADOS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

2.1.1. Química supramolecular

A química supramolecular, também conhecida como a “química além da molécula”, tem como foco o estudo de sistemas formados via interações não-covalentes. Um marco importante dessa área da química ocorreu em 1987, quando foi outorgado o Prêmio Nobel em Química a Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn e Charles J. Pedersen por estudos relacionados a agregados capazes de interagir entre si de forma bastante específica e seletiva, devido a características próprias das estruturas químicas das moléculas que os compõem [1-4]. Desde então, observou-se crescente interesse da comunidade científica por temas do âmbito da química supramolecular. Até 1990, 12 artigos com a palavra-chave “*supramolecular chemistry*” foram indexados na base de dados Web of Science[®]. Este número aumentou exponencialmente, chegando a um total de 10155 artigos publicados até junho de 2017 [5]. Em 2016, o Prêmio Nobel em Química foi novamente outorgado a pesquisadores envolvidos com temas da química supramolecular [6,7], explicitando a importância e a contemporaneidade da área.

Tipicamente, a química supramolecular divide-se em duas grandes sub-áreas: a química envolvendo estruturas do tipo hospedeiro-hóspede (*host-guest chemistry*) e a química de agregados supramoleculares formados por autoassociação (*self-assembly*). O conceito de autoassociação pode ser enunciado como um processo pelo qual forma-se espontaneamente uma estrutura organizada a partir de componentes individuais, como resultado de interações localizadas e específicas entre estes componentes. Quando os componentes constitutivos são moléculas, o processo é denominado autoassociação molecular. Arquiteturas supramoleculares bastante complexas podem ser obtidas como resultado de processos de autoassociação. Nesses casos, o equilíbrio termodinâmico é um princípio-chave que norteia o tipo de estrutura a ser formada, pois as interações entre essas moléculas tipicamente possuem caráter não-covalente (portanto, facilmente reversível de acordo com as condições do meio). Isto abre caminho para a obtenção de sistemas que respondem a mudanças no ambiente químico. [8,9]

Interações não-covalentes dominam o cenário em vários processos bioquímicos. A estreita similaridade entre agregados supramoleculares e sistemas de origem natural evidencia o grande potencial da química supramolecular para aplicações envolvendo a saúde humana. Essa similaridade pode ser explorada na obtenção de miméticos de enzimas, que podem ser estruturais ou funcionais. No primeiro caso, há uma grande similaridade entre o sítio ativo da enzima natural e do composto mimético. [10] No segundo caso, não há compromisso com essa similaridade, sendo considerado mimético o sistema capaz de catalisar uma reação semelhante àquela catalisada por enzimas em meio biológico. [11]

A maioria dos relatos envolvendo reações catalisadas por enzimas artificiais descrevem nanopartículas inorgânicas compostas por metais e óxidos de metais cumprindo a função de miméticos funcionais de oxidases, hidrolases, redutases, entre outros [12]. Essas nanopartículas geralmente são revestidas por moléculas orgânicas. A proteção da superfície das nanopartículas por moléculas orgânicas é particularmente interessante do ponto de vista biológico, pois pode promover aumento da biocompatibilidade [13]. Polímeros anfifílicos são os compostos orgânicos mais populares empregados para constituir esses sistemas híbridos [14]. A biocompatibilização de nanopartículas inorgânicas também pode ser feita pelo revestimento com lipídios, como o ácido oleico. No entanto, a agregação das nanopartículas em meio biológico é uma consequência dessa estratégia, pois a cauda hidrofóbica do lipídio fica exposta à água.

Uma possível alternativa para evitar a agregação de nanopartículas revestidas por lipídios poderia ser sua incorporação em sistemas capazes de estruturar-se como fases reversas líquido-cristalinas liotrópicas. Essa hipótese é suportada por estudo prévio envolvendo estabilização de insulina frente à agregação induzida por agitação, por meio de sua incorporação em cristal líquido [15,16]. Os resultados demonstraram que a conformação nativa de insulina incorporada em fase cúbica líquido-cristalina de lipídio (monoleína) manteve-se inalterada após agitação a 37°C, mesmo após transcorridos 2 meses. A insulina livre em solução não resistiu ao mesmo tratamento, agregando-se e precipitando logo após 8 dias. Embora a insulina não seja uma nanopartícula inorgânica, os resultados foram bastante contundentes quanto à capacidade de cristais líquidos em evitar agregação de estruturas coloidais, categoria na qual se enquadra tanto a insulina quanto as nanopartículas inorgânicas.

2.1.2. Cristais líquidos liotrópicos

Cristais líquidos são sistemas compostos por moléculas que se autoassociam espontaneamente, apresentando certo grau de ordem orientacional e ausência de ordem posicional. Estas características diferenciam os cristais líquidos de sólidos cristalinos (os quais possuem moléculas orientadas no mesmo sentido e com posições bem definidas no espaço) e líquidos isotrópicos (os quais apresentam moléculas agrupadas de forma aleatória). Nesse sentido, fases líquido-cristalinas podem ser consideradas como estados intermediários, combinando propriedades tanto de sólidos cristalinos quanto de líquidos. [17]

Os cristais líquidos podem ser divididos em duas grandes categorias: termotrópicos e liotrópicos. No primeiro caso, a estrutura de fase depende da temperatura. As moléculas que formam fases termotrópicas são altamente rígidas e apresentam forma anisotrópica, a qual pode ser discótica, calamítica, tipo-banana, entre outras. A anisotropia da molécula reflete-se no conjunto de estruturas de fase possíveis para o sistema dentro da faixa de temperatura que corresponde ao estado líquido-cristalino. Temperaturas muito baixas (inferiores à temperatura de fusão) levam à formação de sólidos cristalinos, enquanto que temperaturas suficientemente elevadas (acima da chamada temperatura de clarificação) resultam em líquidos convencionais. [18,19].

Cristais líquidos liotrópicos são compostos por moléculas anfífilas que tendem a agregar-se na presença de solvente. A estrutura autoassociada resultante em geral é a micela, porém estruturas ainda mais complexas podem surgir conforme as condições do sistema. Considerando-se sistemas compostos por lipídios e água, pode-se afirmar que a autoassociação é dirigida pela minimização do contato entre as regiões hidrofóbicas do lipídio e a fase aquosa. Este fenômeno, somado a interações repulsivas entre as cabeças polares dos lipídios e restrições de empacotamento de suas cadeias alquílicas, resulta em estruturas supramoleculares de diferentes arquiteturas. Desta maneira, o comportamento de fase em cristais líquidos liotrópicos depende de diferentes fatores, como a estrutura das moléculas, as forças intermoleculares no sistema, bem como temperatura e a proporção lipídio/solvente. [20,21]

As propriedades de empacotamento geométrico de uma molécula anfífila podem ser expressas pelo parâmetro de empacotamento crítico (CPP), que relaciona uma possível fase em particular com características estruturais do lipídio (Equação 1):

$$CPP = \frac{v}{A \cdot l} \quad (1)$$

onde A é a área da cabeça polar do composto anfifílico e v e l são, respectivamente, o volume e o comprimento molecular da cadeia hidrofóbica. [22]

Valores de CPP menores que 1 indicam a tendência das moléculas anfifílicas em agregar-se de forma que as cabeças polares fiquem expostas à região externa da estrutura. Isto define as fases normais, que tipicamente ocorrem em regimes diluídos. Por outro lado, denominam-se fases reversas aquelas nas quais as caudas hidrofóbicas ficam expostas às regiões externas da estrutura. Fases reversas tendem a ser obtidas a partir de moléculas cujo CPP é maior que 1. Quando o valor de CPP é próximo à unidade, as moléculas tendem a agregar-se como lamelas (Figura 1). É importante pontuar que vários fatores além do CPP definem a estrutura de fase a ser obtida, sendo seu valor apenas um indicativo.

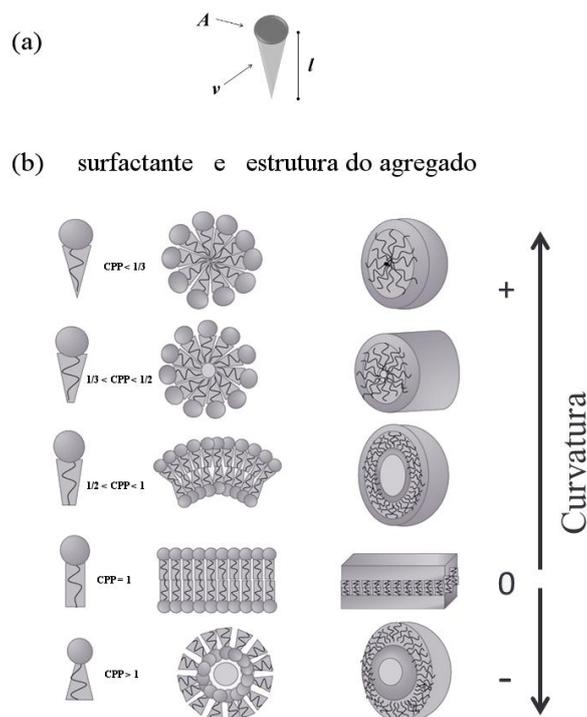


Figura 1. Representação (a) da estrutura química de uma molécula anfifílica genérica, onde estão indicados a área da cabeça polar (A), o volume da cadeia hidrofóbica (v) e o comprimento da cadeia hidrofóbica (l); e (b) de possíveis estruturas supramoleculares de agregados de acordo com faixas de valores de parâmetro de empacotamento crítico (CPP) de surfactantes. A curvatura da superfície que separa o microdomínio lipídico do meio aquoso nos agregados está qualitativamente representada no eixo vertical à direita. Imagem adaptada e reproduzida da referência [23] *sob licença Creative Commons (CC)*.

A fase lamelar (L_α), de curvatura de interface igual a zero, é caracterizada pela disposição das moléculas anfifílicas em bicamadas, que por sua vez são intercaladas por solvente. As fases normais apresentam curvaturas de interface positivas, sendo bastante comuns as fases micelares (L_1) e hexagonais (H_1). Em altas diluições, abaixo da concentração micelar crítica, o sistema tende a perder sua estruturação. Por outro lado, as fases reversas (Figura 2) são particularmente interessantes, pois apresentam capacidade de manter sua estrutura em regime diluído. Essa última característica é importante no contexto da aplicação biológica, devido ao excesso de fluidos corporais aos quais esses sistemas são expostos após administração. [24,25]

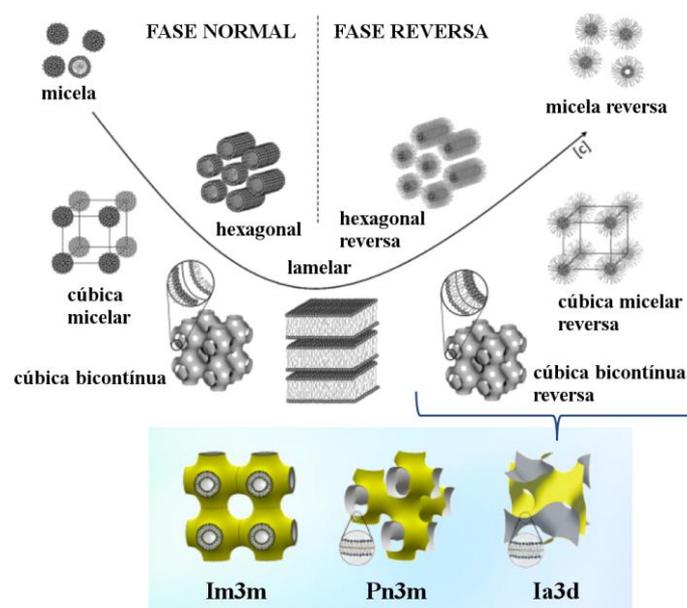


Figura 2. Estruturas esquemáticas representativas de fases normais, lamelar e reversas de cristais líquidos liotrópicos (onde $[c]$ é a concentração de surfactante em água). Adaptado e reproduzido de [26], *direitos autorais de John Wiley & Sons*. No detalhe, é possível visualizar a representação de fases cúbicas bicontínuas reversas com simetrias $Im3m$, $Pn3m$ e $Ia3d$.

Fases cúbicas micelares (I_2) e hexagonais (H_2) reversas são possibilidades interessantes no que tange à aplicação biomédica, sendo empregadas quando é desejado um contato reduzido entre o meio externo e fármacos a elas incorporados, visto que apresentam curvaturas negativas elevadas. As fases I_2 consistem em micelas reversas dispostas espacialmente em celas unitárias cúbicas. Para cristais líquidos, são comuns as fases reversas micelares com simetrias do tipo $Pm3n$ e $Fd3m$ [27]. Fases H_2 são constituídas por arranjos espaciais de micelas reversas cilíndricas em hexágonos. Como consequência, estas fases

apresentam canais aquosos não-interconectados em seu interior. [28] As fases reversas cúbicas bicontínuas (Q_2) são formadas por bicamadas lipídicas com curvatura negativa, que adotam arquiteturas complexas. Como resultado, apresentam canais interconectados de água em seu interior que tornam a área de contato do sistema com o meio aquoso externo muito superior àquela de fases micelares reversas, lamelares ou mesmo hexagonais reversas [29]. No contexto da aplicação de sistemas líquido-cristalinos como miméticos de enzimas, este contato facilitado com o meio externo é desejável. As fases cúbicas bicontínuas reversas em cristais líquidos apresentam três tipos de simetrias mais comuns: $Ia3d$ (giróide), $Pn3m$ (diamante) e $Im3m$ (primitiva).

No que concerne a aplicações biomédicas, há um número limitado de moléculas biocompatíveis capazes de formar fases cúbicas bicontínuas reversas em excesso de água, sob condições fisiológicas de temperatura. A mais notória é a monooleína (monooleato de glicerila), empregada em misturas binárias com água ou em misturas mais complexas com água e outros lipídios. No entanto, essa molécula apresenta ligação éster, podendo ser facilmente degradada. [30,31] Uma alternativa interessante à monooleína é o fitantriol (3,7,11,15-tetrametil-hexadecantriol), que não possui ligações éster em sua estrutura (Figura 3). [32]

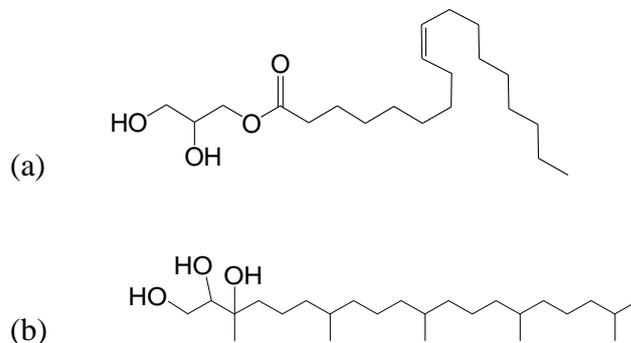


Figura 3. Estruturas químicas (a) da monooleína e (b) do fitantriol.

Sistemas compostos por fitantriol e excesso de água tipicamente apresentam estrutura de fase Q_2 com simetria $Pn3m$ à temperatura ambiente e H_2 em temperaturas superiores a $60\text{ }^\circ\text{C}$. A adição de acetato de tocoferol a fitantriol disperso em água, mesmo em baixas concentrações, leva à ocorrência de transições de fase do tipo $Q_2 \rightarrow H_2$ em temperaturas menores que aquelas observadas para a mistura binária de fitantriol e água. Essa evidência, observada por Boyd e colaboradores [33], abre a perspectiva de modulação da estrutura de fase de cristais líquidos de fitantriol em resposta à temperatura. Também há relatos do surgimento de novas fases após adição de compostos à mistura binária, como L_α [34] e $Im3m$

[35]. Estruturas compostas por fitantriol vêm sendo exploradas não só para o desenvolvimento de sistemas responsivos ao ambiente como também para liberação controlada de fármacos. Lee e colaboradores [36] investigaram o comportamento de liberação de vários fármacos-modelo hidrofílicos a partir de dispersões de fitantriol em água. Os autores observaram que a cinética de liberação foi difusional, com taxas de liberação que dependem da estrutura de fase do sistema, bem como da massa molar do fármaco-modelo.

As propriedades de sistemas líquido-cristalinos estão intrinsecamente relacionadas com a forma como suas unidades estruturais se ordenam no espaço. Nesse sentido, é essencial determinar a estrutura de fase dos sistemas. Várias técnicas estão disponíveis para alcançar esse objetivo. A mais simples consiste na observação do material por microscopia óptica com controle de temperatura. Empregando-se um filtro polarizador no microscópio, é possível distinguir entre estruturas espacialmente isotrópicas e anisotrópicas, pois apenas estas últimas exibem o fenômeno de birrefringência. Fases cúbicas, por exemplo, não apresentam birrefringência. Por sua vez, fases hexagonais e lamelares apresentam padrões da luz transmitida característicos devido ao fenômeno de birrefringência [26]. A topologia de cristais líquidos liotrópicos pode ser visualizada a partir de medidas de microscopia eletrônica de transmissão de amostras em condições criogênicas (Cryo-TEM). Esta técnica foi fundamental para determinar a coexistência de vesículas e estruturas coloidais de fase Q_2 em dispersões de fitantriol em água contendo dispersante, preparadas por Akhlaghi e colaboradores [37]. O surgimento de vesículas é dependente do método de preparação e da natureza do dispersante. Diferentes estruturas de fase também podem ser caracterizadas a partir de suas propriedades reológicas, embora esta seja uma técnica pouco comum para cristais líquidos liotrópicos. Quanto maior a interconectividade na topologia da estrutura, maior é sua resistência ao cisalhamento [38]. Técnicas de análise térmica vêm sendo empregadas como medidas complementares na caracterização de fases líquido-cristalinas liotrópicas. A calorimetria exploratória diferencial (DSC) permite determinar as temperaturas onde ocorrem as transições de fase, porém não informam sobre a identidade topológica de cada fase. Por sua vez, a análise termogravimétrica (TGA) fornece valores aproximados do conteúdo de água de fases líquido-cristalinas e temperaturas de degradação dos materiais. [39]

Para determinar a topologia e simetria dos grupos espaciais cristalográficos de cristais líquidos liotrópicos presentes em cada temperatura, uma das técnicas mais importantes é o espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS). Nesta técnica, um feixe monocromático de raios X incide sobre a amostra e é transmitido, sendo então detectado. No feixe transmitido, são detectados raios X que sofreram espalhamento *quasi*-elástico, em ângulos

próximos a zero (tipicamente $< 5^\circ$) em relação à direção do feixe incidente. Os dados obtidos (2D) correspondem a uma medida de intensidade de fótons detectada em função do vetor de espalhamento \vec{q} . O vetor de espalhamento é definido como a diferença entre os vetores de onda dos raios X espalhados (\vec{k}') e dos incidentes (\vec{k}), conforme Equação 2 [40]:

$$|\vec{q}| = |\vec{k}' - \vec{k}| = \frac{4 \cdot \pi \cdot \sin \theta}{\lambda} \quad (2)$$

sendo λ o comprimento de onda dos raios X incidentes e 2θ o ângulo entre os vetores k' e k . O dado bidimensional é posteriormente reduzido a curvas de intensidade de espalhamento $I(q)$ (1D) para análise quantitativa.

É possível determinar o tipo de estrutura da fase líquido-cristalina a partir da da indexação dos picos de difração na curva de SAXS. A posição relativa dos picos e os respectivos índices de Miller para as fases de cristais líquidos liotrópicos mais citadas na literatura encontram-se apresentados na Tabela I.

Tabela I. Posição relativa dos picos de difração de fases de ocorrência mais comum em cristais líquidos liotrópicos e índices de Miller (hkl) correspondentes.

Estrutura de Fase	1	$\sqrt{2}$	$\sqrt{3}$	2	$\sqrt{5}$	$\sqrt{6}$	$\sqrt{7}$	$\sqrt{8}$	3
L_α	(100)	-	-	(200)	-	-	-	-	(300)
Pn3m	-	(110)	(111)	(200)	-	(211)	-	(220)	(221)
Q_2	-	(110)	-	(200)	-	(211)	-	(220)	-
Ia3d	-	-	-	-	-	(211)	-	(220)	-
$H_{1/2}$	(100)	-	(110)	(200)	-	-	(210)	-	(300)
Pm3n	-	(110)	-	(200)	(210)	(211)	-	(220)	-
I_2	-	-	(111)	-	-	-	-	(220)	-

O diagrama de fase de cristais líquidos compostos por fitantriol e água foi determinado por Barauskas e Landh [41] empregando-se medidas de SAXS. À temperatura ambiente, a redução da proporção lipídio/água levou à sequência de transições de fase $L_2 \rightarrow L_\alpha \rightarrow Q_2$ (Ia3d) $\rightarrow Q_2$ (Pn3m). A 44°C , ocorre transição de fase do tipo $Q_2 \rightarrow H_2$ (Figura 4). Posteriormente, verificou-se que impurezas oriundas de fitantriol comercial de diferentes marcas causam mudanças no diagrama de fase, as quais devem ser consideradas no

planejamento de sistemas contendo esse composto. [42] Como mencionado anteriormente, a incorporação de aditivos a sistemas líquido-cristalinos pode resultar em transições e estruturas de fase diferentes daquelas observadas para a mistura binária de origem. Como esperado, isto ocorre também para sistemas compostos por fitantriol [33].

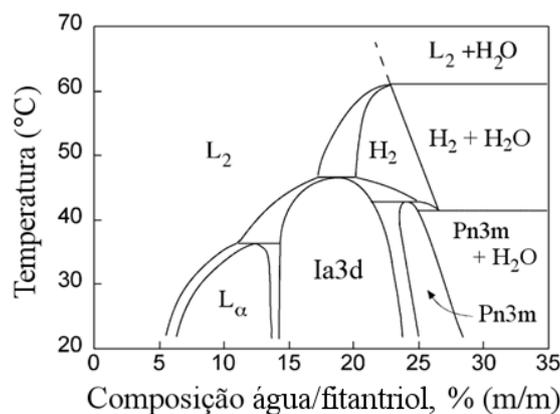


Figura 4. Diagrama de fase de fitantriol e água, conforme determinado por Barauskas e Landh [41]. (Figura adaptada e reproduzida da referência citada, *direitos autorais de American Chemical Society*).

2.1.3. Nanopartículas de óxidos de metal

Óxidos de metais (M_nO_y) constituem um grupo de grande interesse nos âmbitos da física, da química e da ciência de materiais. Esses compostos apresentam uma vasta gama de estruturas cristalinas, com diferentes propriedades eletrônicas. Imperfeições na estrutura cristalina, também denominadas de defeitos, ocorrem com frequência nessas estruturas. Em especial, vacâncias de oxigênio na superfície representam um dos defeitos mais ativos para aplicações catalíticas [43]. Isto resulta na formação de compostos não-estequiométricos do tipo M_nO_{y-x} . Conforme o tamanho do cristal diminui, aumenta a proporção de átomos na superfície da partícula em relação ao total. Quando a razão entre área de superfície e volume é suficientemente alta, propriedades químicas e físicas únicas emergem [44]. Essa é a principal característica que torna a aplicação de nanopartículas interessante para catálise, uma vez que os eventos catalíticos ocorrem nos sítios ativos existentes na sua superfície.

No que tange a aplicações biomédicas, a utilização de nanopartículas de óxidos de metais capazes de oxirredução em níveis de energia compatíveis com as reações biológicas vem ganhando destaque nas últimas décadas, em particular pelo seu grande potencial como miméticos funcionais de enzimas, tais como peroxidases, superóxido dismutases, entre outras.

Nanopartículas de óxidos de metais são vantajosas, pois não sofrem desnaturação, permitem alto número de ciclos de utilização (*turnover*) e apresentam tamanhos comparáveis aos de enzimas naturais e maior número de sítios para ocorrência das reações catalíticas. [45,46]

Os métodos de síntese de nanopartículas de óxidos de metais podem ser agrupados em duas estratégias: líquido-sólido e gás-sólido. Esta última está restrita a processos de deposição química de vapor (*chemical vapor deposition*, CVD), deposição por laser pulsado (*pulsed laser deposition*, PLD) e deposição por desbastamento iônico (*sputtering*). Por sua vez, já foram propostos vários métodos baseados na estratégia líquido-sólido (que é aquela escolhida para este trabalho de mestrado). Entre eles, os mais populares são a coprecipitação, o processo sol-gel, a síntese em microemulsão e processo solvotérmico. [46-48] O método de coprecipitação consiste em dissolver um sal precursor (cloreto, nitrato, etc) em água e, com adição de base, precipitar a forma oxo-hidróxido do metal. [49] Técnicas sol-gel baseiam-se na hidrólise de precursor (geralmente alcóxidos de metais) em solvente adequado, resultando no oxo-hidróxido correspondente. A condensação das espécies, com perda de água, resulta em um gel poroso. Após calcinação, óxidos porosos são obtidos. [50] Na técnica de microemulsão, micelas normais ou reversas de surfactantes em água formam nanorreatores onde ocorre a precipitação de precursores de metal na forma oxo-hidróxido correspondente, levando a partículas de tamanho reduzido e baixa polidispersão. [51] Por fim, no caso de métodos solvotérmicos, complexos do metal são termicamente decompostos a óxidos. Muitas vezes, as reações são realizadas em autoclave, sob pressão. [52]

Embora nanopartículas de óxidos de metais apresentem grande potencial para aplicações biológicas em virtude de sua reatividade, podem não ser biocompatíveis. A estratégia mais empregada para aumentar a biocompatibilidade de nanopartículas inorgânicas consiste em revesti-las com compostos orgânicos. [53] Esse revestimento pode ser realizado na etapa de síntese ou *a posteriori*. Nesse contexto, a incorporação de nanopartículas em cristais líquidos pode ser uma alternativa bastante promissora pelas vantagens intrínsecas desses sistemas supramoleculares, bem como pela biocompatibilidade inerente aos lipídios que os compõem, como mencionado anteriormente. Nanopartículas magnéticas de ferrita estabilizadas por oleato (hidrofóbico) ou citrato (hidrofílico) foram incorporadas em dispersões aquosas de cristal líquido de monoleína com fase Pn3m visando obter sistemas inteligentes para tratamento de câncer. Ao sistema de monoleína, adicionou-se também um fármaco quimioterápico. Observou-se que as nanopartículas hidrofílicas permaneceram presas aos canais aquosos da fase cúbica, aumentando levemente o parâmetro de rede da fase cúbica, enquanto que as nanopartículas hidrofóbicas mantiveram-se nos domínios lipofílicos [54]. Em

outro estudo, Mezzenga e colaboradores [55] aliaram medidas de SAXS e microscopia óptica sob luz polarizada, demonstrando de forma elegante que sistemas líquido-cristalinos liotrópicos constituídos por lipídios podem ser controladamente alinhados na presença de campo magnético externo quando nanopartículas de magnetita estão incorporadas aos mesmos.

Nanopartículas inorgânicas podem induzir transições de fase em cristais líquidos, por meio de estruturas tipo “colar de pérolas” depositadas na interface entre o lipídio e a água que impeçam a ocorrência de fases com maior curvatura [56]. Em baixas concentrações, nanopartículas inorgânicas acomodam-se no interior das fases líquido-cristalinas de lipídios. Porém, o aumento de sua concentração pode induzir a nucleação de agregados, com consequente separação macroscópica de fase. [57]

Fases líquido-cristalinas liotrópicas foram propostas como nanorreatores para síntese de nanopartículas inorgânicas, em estratégia que se assemelha àquela da síntese em microemulsão [58]. O tamanho das nanopartículas foi controlado a partir de mudanças na estruturação do cristal líquido. Após a síntese, observou-se que as nanopartículas mantiveram-se não-aglomeradas no interior da fase líquido-cristalina.

2.2. NANOPARTÍCULAS CONTENDO CÉRIO

2.2.1. Óxidos e hidróxidos de cério nanoparticulados

Cério (Ce) é um elemento do grupo dos lantanídeos (terras raras) com configuração eletrônica $[Xe] 4f^1 5d^1 6s^2$, sendo facilmente encontrado em minerais como bastnasita, loparita e monazita [59]. Este elemento é geralmente isolado de fontes naturais por precipitação na forma de oxalato, carbonato ou hidróxido. Óxidos de cério podem ser obtidos a partir da calcinação desses precipitados. O óxido de cério $CeO_{(2-x)}$ ($0 < x < 0,5$) pode variar continuamente entre os casos totalmente oxidado (CeO_2 ; $x = 0$) e totalmente reduzido (Ce_2O_3 ; $x = 0,5$). Esse óxido tipicamente apresenta os estados de oxidação Ce(III) e Ce(IV). O óxido de cério mais reduzido, Ce_2O_3 , não é estável sob atmosfera ambiente devido à presença de oxigênio, sendo rapidamente oxidado. A forma mais oxidada, CeO_2 estequiométrico (ceria), apresenta estrutura do tipo fluorita com grupo espacial $Fm\bar{3}m$ em uma faixa ampla de temperatura. Sua cor é amarelo-pálida e está provavelmente relacionada a um processo de transferência de carga entre Ce(IV)-O(II). A estrutura do ceria tolera certo grau de redução, sendo que o grupo espacial $Fm\bar{3}m$ da estrutura de $CeO_{(2-x)}$ é mantido quando $0 < x < 0,35$. A

redução do ceria estequiométrico a $\text{CeO}_{(2-x)}$, sendo $0 < x < 0,5$, está relacionada à formação de defeitos na rede cristalina. Esses defeitos são vacâncias de oxigênio, que levam parte dos átomos de cério a assumir o estado Ce(III). [60] O íon Ce(III) tem maior raio iônico (1,034 Å) que o íon Ce(IV) (0,92 Å). A presença de defeitos (vacâncias de oxigênio) gera distorção local de simetria, a qual causa mudanças no comprimento de ligação Ce–O e aumento do parâmetro de rede do cristal. Essa distorção tende a ser mais significativa com a diminuição do diâmetro de partícula. [61]

Em meio aquoso, o cério pode assumir diferentes formas, descritas por um diagrama de Pourbaix. Este diagrama aponta qual é a espécie majoritária no equilíbrio termodinâmico para uma dada condição de pH e potencial redox da solução, fixando-se a concentração do elemento e a temperatura. Geralmente, as espécies que precipitam a partir das soluções contendo cério são os hidróxidos $\text{Ce}(\text{OH})_3$ e $\text{Ce}(\text{OH})_4$. As formas hidratadas dos respectivos óxidos também são espécies possíveis de se observar em determinadas condições. [62,63] Hayes e colaboradores [63] construíram um diagrama de Pourbaix para o cério na concentração de 0,01 M a 25 °C. Sob condições redutoras e pH ácido, a espécie predominante é o $\text{Ce}^{3+}_{(\text{aq})}$ na forma dissociada. A adição de $\text{OH}^-_{(\text{aq})}$, com consequente aumento do valor de pH na solução, resulta na observação de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ como espécie predominante. Por sua vez, um ambiente oxidante favorece a formação de $\text{Ce}(\text{OH})_4/\text{CeO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em ampla faixa de pH. Apenas em meio altamente ácido e oxidante, a espécie $\text{Ce}^{4+}_{(\text{aq})}$ é majoritária. Em uma estreita faixa de pH e ambiente redutor, é possível observar as espécies $\text{Ce}(\text{OH})^{2+}$ (pH 8-9) e $\text{Ce}(\text{OH})_2^+$ (pH 9-10) predominando na solução. A pressão parcial de oxigênio na água influencia o equilíbrio das espécies e consequentemente as condições nas quais cada uma é majoritariamente observada. O mesmo ocorre com a adição de compostos oxidantes/redutores à solução.

A concentração de defeitos no ceria eleva-se com a redução do tamanho da partícula. Como consequência da coexistência de Ce(III) e Ce(IV) na sua superfície e a facilidade de interconversão entre estes dois estados, as propriedades redox de ceria na nanoescala são muito melhores em relação ao material massivo. Nesse contexto, estruturas nanoparticuladas de $\text{CeO}_{(2-x)}$ têm recebido crescente atenção da comunidade científica como catalisadores [64], células combustíveis [65] e miméticos funcionais de enzimas redox para aplicações biomédicas [66]. Neste último caso, destaca-se a capacidade das nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$ em captar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no organismo. Por esse motivo, essas nanopartículas são alternativas altamente promissoras para tratar patologias associadas a

estresse oxidativo crônico e inflamação, cujos níveis de espécies oxidantes em regiões bem localizadas do organismo são elevados.

O controle das características das nanopartículas, tais como diâmetro e razão Ce(III)/Ce(IV), pode ser até certo ponto obtido com base na estratégia de síntese escolhida [67]. Além disso, a perspectiva de aplicação biológica exige estratégias de síntese que evitem a aglomeração das nanopartículas. O revestimento orgânico pode levar não só à estabilização cinética das partículas, como também à sua biocompatibilização. Uma das técnicas mais empregadas para a síntese de nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$ organicamente revestidas envolve dissolução de precursor de cério em água e precipitação por adição de base ou agente oxidante (Tabela II).

Tabela II. Exemplos de precursores de cério e revestimentos orgânicos empregados na síntese por precipitação de nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$ dispersas em meio aquoso visando aplicações biológicas.

Precursor de cerio	Revestimento orgânico	Agente precipitante	Referência
$\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Dextrana/glicose	$\text{NH}_4\text{OH}/ \text{H}_2\text{O}_2$	[68]
$\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Poli(etilenoglicol)	$\text{HNO}_3/ \text{H}_2\text{O}_2$	[66]
$\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Dodecilsulfato de sódio	NH_4OH	[69]
$\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Ácido etilenodiaminotetracético/ ácido cítrico	$\text{NH}_4\text{OH}/ \text{H}_2\text{O}_2$	[70]
$\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Poli(ácido acrílico)- octilamina/ ácido oleico/ poli(etileno-imina)/ poli(anidrido maleico)- alt-1-octadeceno	Oleilamina	[71]

Relatos a respeito de nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ em meio aquoso com valores brandos de pH não são comuns, pois é prevista sua dissolução na forma de $\text{Ce}^{3+}_{(\text{aq})}$ nessas condições a partir do diagrama de Pourbaix. Recentemente, Abellan e colaboradores [72] relataram a obtenção de nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ em meio aquoso, a partir de $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ como precursor, através do aumento do pH local causado pela irradiação da amostra com feixe de elétrons. De acordo com os autores, a radiólise da água levou à redução do $\text{Ce}^{3+}_{(\text{aq})}$ a Ce^0 . Essa

redução seguida de hidrólise foi o provável mecanismo catalítico que gerou $\text{OH}^-_{(\text{aq})}$ *in situ*. Este, por sua vez, permitiu a precipitação de nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ com cerca de 5 nm de diâmetro.

O problema do equilíbrio de hidrólise desfavorável na síntese de nanopartículas contendo Ce(III) pode ser contornado empregando-se um processo sol-gel modificado, inicialmente desenvolvido por Pechini em 1967 para filmes finos [73]. Neste método, a etapa-chave consiste na formação de complexos de metais com agentes quelantes bi- e tridentados, como o ácido cítrico. Um poli(álcool), como o etilenoglicol, é adicionado para estabelecer as ligações entre os quelatos via reação de poliesterificação, resultando em gelificação da mistura reacional. Após secagem, o gel é aquecido para iniciar a pirólise das espécies orgânicas, resultando nas nanopartículas em pó. Agentes quelantes tendem a formar complexos estáveis em amplas faixas de pH, o que é uma vantagem importante deste método.

2.2.2. Técnicas de caracterização de nanopartículas contendo cério

As principais técnicas de caracterização de nanopartículas contendo cério informam sobre suas propriedades eletrônicas, estruturais e morfológicas. A forma e a distribuição de diâmetro das nanopartículas podem ser acessadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM – *Transmission Electron Microscopy*). Nesta técnica, um feixe de elétrons monoenergético incide sobre uma região fina da amostra. Parte do feixe sofre retroespalhamento e parte é transmitida após sofrer colisões elásticas e inelásticas. O feixe transmitido atinge uma tela fluorescente ou uma CCD (*Charge Coupled Device*), onde são detectados. O contraste observado na imagem de TEM depende do modo de operação empregado. O modo mais utilizado é o de campo claro, onde o contraste depende da densidade eletrônica e espessura da região analisada. Assim, regiões das amostras eletronicamente mais densas ou espessas permitem que menos elétrons sejam transmitidos, formando uma região mais escura. Este modo é tipicamente utilizado para obtenção de tamanho e morfologia da amostra, pois mostra uma projeção das estruturas presentes. Nanocristais de $\text{CeO}_{(2-x)}$ de 4 nm, sintetizados por precipitação de precursor em solução com dextrana, foram visualizados por essa técnica por Perez e colaboradores [74]. TEM permitiu a Hussain e colaboradores observar a incorporação de nanopartículas de céria por células monocíticas, [75] revelando-se uma ferramenta valiosa em estudos multidisciplinares que conectam a síntese e caracterização das nanopartículas com sua aplicação biológica.

Apesar das diversas vantagens das técnicas de microscopia eletrônica, as mesmas não dão informações químicas sobre o material analisado. Por conta disso, uma técnica complementar rotineiramente utilizada acoplada a um microscópio eletrônico é a Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDS – *Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy*). Nesse caso, são detectados os raios X característicos emitidos pelos átomos constituintes da amostra após serem excitados pelo feixe de elétrons incidente. Dessa forma, é feita uma imagem de microscopia eletrônica (transmissão ou varredura) com subsequente medida do espectro de EDS de uma região específica da imagem, sendo possível identificar os elementos presentes naquela região estudada. Medidas de EDS são particularmente úteis no caso de misturas complexas, onde é necessário determinar a presença de cério juntamente com outros elementos químicos na amostra. [76]

Informações sobre a estrutura cristalina e o parâmetro de rede das nanopartículas podem ser obtidas a partir da técnica de Difração de Raios X (XRD – *X-Ray Diffraction*). A técnica é baseada na incidência de um feixe monocromático de raios X sobre uma amostra com ângulo de incidência variável, seguido de detecção do feixe difratado. O difratograma obtido é regido pela lei de Bragg, que permite identificar as posições angulares com máximos de intensidade para uma dada estrutura cristalina. Tipicamente, nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_4$ e $\text{CeO}_{(2-x)}$, sendo $0 < x < 0,35$, apresentam arranjo cristalino do tipo fluorita com grupo espacial $\text{Fm}\bar{3}\text{m}$, conforme já mencionado anteriormente. Por sua vez, $\text{Ce}(\text{OH})_3$ e Ce_2O_3 possuem estrutura hexagonal. A técnica de XRD foi empregada por Kurian e Kunjachan [77] não só para confirmar a natureza química das amostras de nanocéria sintetizadas por método sol-gel via indexação dos picos de difração, como também para investigar distorções na rede cristalina causadas pelo processo de síntese. Estas distorções foram particularmente importantes no caso de partículas com diâmetro menor que 10 nm e estão relacionadas à presença de vacâncias de oxigênio na estrutura cristalina.

O estado de oxidação do cério nas nanopartículas pode ser determinado de forma complementar a partir das técnicas de Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X (XPS – *X-Ray Photoelectron Spectroscopy*) [78] e Espectroscopia de Absorção de Raios X (XAS – *X-Ray Absorption Spectroscopy*) [79]. A técnica de XPS permite sondar a região próxima à superfície da amostra, tipicamente até uma profundidade de alguns nanômetros. Medidas de XPS do nível eletrônico Ce 3d de nanopartículas de céria após contato com H_2O_2 foram empregadas por Heckert e colaboradores [80] para demonstrar que a redução da razão Ce(III)/Ce(IV) nas amostras correlaciona-se com a perda da sua atividade catalítica.

A técnica de XAS é baseada na medida do coeficiente de absorção de uma amostra em função da energia do fóton de raios X incidentes. Tipicamente é medida a intensidade do feixe incidente e transmitido e, através da lei de Beer-Lambert [79], é obtido o coeficiente de absorção para uma dada energia de fóton incidente. A Figura 5 mostra um espectro típico de XAS para a borda L_3 do Ce, a qual corresponde a uma transição eletrônica permitida segundo as regras de seleção de dipolo do nível $2p_{3/2}$ para o nível $5d$ do Ce.

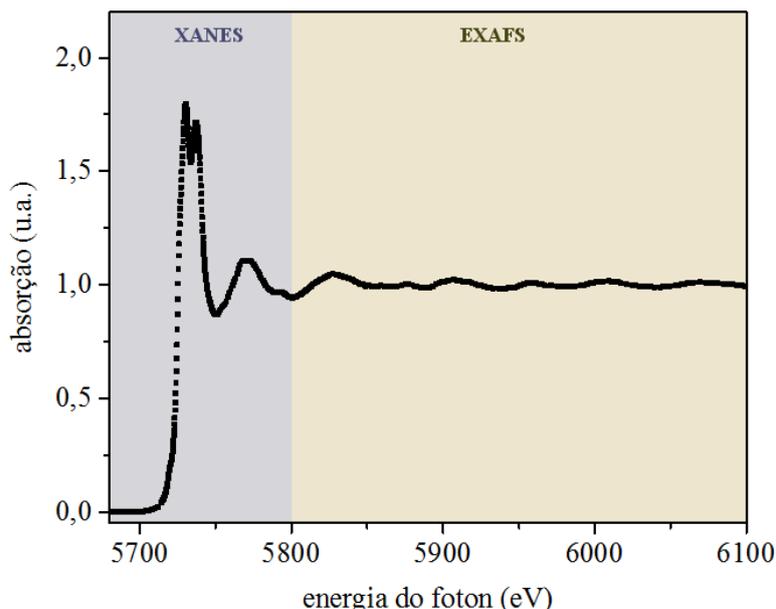


Figura 5. Espectro de XAS de uma amostra de CeO_2 comercial na borda L_3 de Ce medido por transmissão.

Observa-se que, se a energia do fóton incidente for menor do que a energia de ligação do elétron no nível $2p_{3/2}$ do Ce, não ocorre absorção. Quando a energia do fóton incidente se aproxima da energia necessária para ocorrer a transição eletrônica, é observado um aumento abrupto no coeficiente de absorção. A região em energia próxima a esse aumento abrupto no coeficiente de absorção é chamada de borda de absorção. Após a borda de absorção, são observadas oscilações do coeficiente de absorção em torno de um determinado valor. Essas oscilações são provenientes da interferência entre a onda associada ao fotoelétron emitido no processo de absorção e a onda associada ao fotoelétron retroespalhado pelos átomos vizinhos ao átomo absorvedor (nesse caso, o Ce).

O espectro de XAS pode ser dividido em duas regiões em energia: XANES (*X-Ray Absorption Near Edge Structure*), que corresponde à região tipicamente até 50 eV após a borda de absorção, e EXAFS (*Extended X-Ray Absorption Fine Structure*), que corresponde à

região em energia desde o final do XANES até o final do espectro de XAS (Figura 5). A análise de EXAFS permite obter informações estruturais referentes à ordem atômica local em torno do átomo absorvedor (número de coordenação, distância entre o átomo absorvedor e espalhador, desordem estrutural e térmica). A análise do espectro de XANES permite obter informações eletrônicas (estado de oxidação, composto químico presente, densidade de estados eletrônicos vazios) e estruturais (geometria local) do átomo absorvedor. A técnica de XAS, em condições normais de uso, é sensível à região massiva (*bulk*) do material. Em especial, para o caso do óxido de cério a análise da região do espectro de XANES permite obter a razão Ce(III)/Ce(IV) existente na amostra. Em um trabalho prévio, Della Mea e colaboradores [64] utilizaram a técnica de XANES para determinar a influência das condições de síntese na razão Ce(III)/Ce(IV) de nanopartículas obtidas por precipitação de $\text{NH}_4\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ em água ou água/etanol após adição de base. Nesse estudo, a população de vacâncias de oxigênio foi controlada ajustando-se parâmetros da síntese.

A presença de cério nos estados de oxidação Ce(III) e Ce(IV) em solução pode ser determinada também a partir de espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível, no caso de partículas suficientemente pequenas. Ambos os estados de oxidação apresentam bandas de absorção características no óxido de cério: na faixa de 230-260 nm ocorre absorção pelo Ce(III), enquanto que a absorção na faixa de 300-400 nm é decorrente do Ce(IV). A absorção na faixa de 230-260 nm ocorre por mecanismo de transferência de carga do tipo $\text{O}^{2-} \rightarrow \text{Ce}^{3+}$. Por sua vez, a absorção em torno de 300 nm é causada por transferência de carga do tipo $\text{O}^{2-} \rightarrow \text{Ce}^{4+}$, enquanto que a absorção mais próxima a 400 nm advém de processo de transição interbanda. [81] Diminuindo-se o tamanho dos cristais de ceria, ocorre deslocamento hipsocrômico da banda em torno de 400 nm devido ao confinamento eletrônico. Máximos de absorbância em comprimentos de onda menores que 375 nm são característicos de cristalitos muito pequenos, da ordem de alguns nanômetros. [82] No mesmo estudo mencionado em parágrafos anteriores, realizado por Heckert e colaboradores [80], medidas espectroscópicas de absorção na região de 210 a 500 nm foram utilizadas para verificar mudanças no estado de oxidação do cério ao longo do tempo, na ausência ou presença de peróxido de hidrogênio como agente oxidante. Observou-se aumento da absorbância na região de 300-400 nm após adição do peróxido de hidrogênio ao meio aquoso. Este resultado evidenciou o aumento da concentração de Ce(IV) nas nanopartículas em resposta ao agente oxidante. Os resultados mostraram-se complementares àqueles obtidos por XPS.

2.2.3. Nanopartículas de óxido de cério como miméticos funcionais de oxirredutases

Oxirredutases constituem uma classe de enzimas que catalisam reações de oxidação-redução. No sistema de classificação de enzimas, são designadas pelo código EC 1 e dividem-se em 22 subclasses. Dentre elas, destacam-se as peroxidases (EC 1.11), oxigenases (EC 1.13) e superóxido dismutases (EC 1.15), pelo seu importante papel nos mecanismos de prevenção de dano oxidativo no organismo. Sabe-se que danos oxidativos estão ligados a uma série de enfermidades, como câncer, isquemia, demência e inflamação crônica [83-86]. Uma mutação na superóxido dismutase, por exemplo, está diretamente correlacionada à esclerose lateral amiotrófica, que é uma doença neurodegenerativa na qual há acúmulo do ânion radical superóxido no organismo, com conseqüente peroxidação lipídica e disfunção mitocondrial. Uma das conseqüências mais devastadoras da doença é o dano aos neurônios motores no cérebro, responsáveis por controlar os movimentos voluntários dos músculos estriados. [87]

A superóxido dismutase (SOD) é um tipo de metaloenzima que catalisa a conversão do ânion radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, em um mecanismo chamado “*ping-pong*”, que consiste em redução e oxidação sequencial do centro metálico, com concomitante oxidação e redução do ânion radical superóxido (Figura 6). Seu sítio catalítico em geral contém ferro, manganês, cobre ou níquel, conforme a espécie. Em humanos, predomina SOD com cobre e zinco. [88]

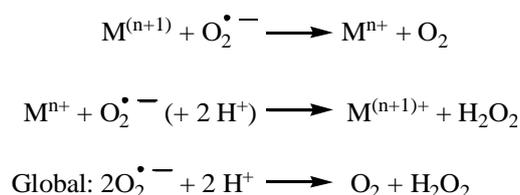


Figura 6. Esquema de dismutação catalítica do ânion radical superóxido pela enzima superóxido dismutase (SOD), onde M = metal do sítio catalítico.

O tratamento de doenças pela reposição periódica de enzimas naturais não é uma tarefa simples, pois sua síntese/obtenção geralmente é bastante cara, sua degradação *in vivo* antes de atingir o local de ação no organismo é um limitador importante e as condições de armazenagem devem ser altamente controladas para não comprometer a atividade devido à desnaturação. Nesse sentido, miméticos funcionais de enzimas são amplamente vantajosos, pois sua síntese é mais barata (em particular no caso de miméticos inorgânicos). Além disso, os sistemas são mais robustos frente à degradação ou perda da reatividade durante o

armazenamento ou no percurso *in vivo* após administração até o local de ação no organismo. [10] Nesse contexto, nanopartículas de óxido de cério têm se tornado miméticos funcionais de oxirredutases cada vez mais populares na literatura. Isso está relacionado à facilidade de interconversão entre os estados Ce(III) e Ce(IV) na sua superfície, que permite às nanopartículas atuar como agentes oxidantes e redutores em reações redox de interesse biológico. [89] A aplicação biológica deste material como mimético de enzimas pode ser considerada relativamente recente. Relatos da atividade mimética de SOD de nanopartículas de CeO_(2-x) em condições biologicamente compatíveis começaram a surgir há 10 anos. Um dos primeiros estudos nessa linha foi realizado por Korsvik e colaboradores em 2007 [90], no qual se verificou que maiores proporções de Ce(III) estavam relacionadas a um incremento na atividade mimética de SOD de nanopartículas de CeO_(2-x).

A reatividade de nanopartículas contendo cério está intrinsecamente relacionada a características como tamanho e forma [71]. No caso de nanopartículas de CeO_(2-x), a razão Ce(III)/Ce(IV) aumenta com a redução do tamanho da partícula. Menores partículas apresentam, portanto, aumento da concentração de vacâncias de oxigênio, que são fundamentais para mimetização da atividade de SOD. [91] No entanto, é preciso salientar que sistemas altamente reduzidos não apresentam atividade como miméticos de SOD, evidenciando que há uma proporção ótima de Ce(III)/Ce(IV) para que ocorra a degradação de ânion radical superóxido na superfície das nanopartículas.

Como mencionado anteriormente, a química de superfície das nanopartículas, bem como seu tamanho, são consideravelmente influenciados pela escolha dos precursores e pelo método de síntese empregado. Por sua vez, revestimentos orgânicos em geral não influenciam diretamente na reatividade de superfície, mas sim no perfil de agregação das nanopartículas e sua forma de depuração pelo organismo. Nanopartículas sofrem um processo biológico *in vivo* que consiste na adsorção de proteínas (“*corona proteica*”) à sua superfície. O tipo de proteína e a força dessa interação dependem da natureza do revestimento e podem ter importantes consequências no que se refere à biodistribuição, agregação e metabolização. [92,93]

O conhecimento existente a respeito da catálise promovida por céria em altas temperaturas não é necessariamente aplicável para a compreensão de seu papel em eventos biológicos. Por isso, a química de superfície das nanopartículas de CeO_(2-x) em condições fisiológicas (ambiente aquoso e temperatura de 37 °C) ainda é importante objeto de estudo. As propriedades de superfície das nanopartículas podem ser afetadas, por exemplo, pelo pH e natureza dos íons presentes em solução. Íons fosfato, citrato e ascorbato, que são constituintes

de tampões biológicos, adsorvem-se na superfície de nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$ podendo alterar suas propriedades catalíticas. Por sua vez, isto não é observado com íons sulfato e carbonato. [94] Curiosamente, a própria presença de água adsorvida na superfície das nanopartículas pode ser suficiente para afetar a reatividade. Em estudo prévio envolvendo cálculos de dinâmica molecular (MD) e teoria do funcional da densidade (DFT), sugeriu-se que óxido de cério sintetizado em água possui regiões cataliticamente ativas que são afetadas com a desidratação. Ensaio *in vitro* de atividade de SOD mostraram que a desidratação da superfície das nanopartículas levou à redução da sua atividade catalítica, confirmando as previsões teóricas. [95]

2.3. PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO: UM GATILHO BIOQUÍMICO PROMISSOR

2.3.1. Microambientes biológicos oxidantes

Alterações complexas na composição do meio biológico podem ocorrer com certa facilidade em virtude de eventos específicos (ex.: infecções, lesões, escassez de determinados nutrientes, entre outros) [96]. Determinados compostos químicos gerados *in vivo* como consequência desses eventos podem atuar como gatilhos na indução de mudanças controladas em sistemas supramoleculares para fins terapêuticos. Isso é interessante por permitir maior controle do efeito biológico desencadeado pela resposta do sistema supramolecular. Essa estratégia promete revolucionar a medicina, por atuar de forma bastante específica no organismo, reduzindo as doses e os efeitos colaterais do tratamento. [97]

Microambientes oxidantes no organismo estão associados a processos inflamatórios e disfunções mitocondriais, como resultado de mudanças metabólicas diversas que levam ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS). As duas formas predominantes de ROS são o ânion radical superóxido e o peróxido de hidrogênio. Este último vem sendo bastante empregado como gatilho para liberação controlada de fármacos e agentes de diagnóstico em regiões do organismo sob estresse oxidativo, a partir de nanopartículas responsivas [98,99].

O peróxido de hidrogênio, nas concentrações típicas observadas no organismo durante processos inflamatórios (25-50 μM), não é um agente oxidante potente. Seu dano aos tecidos é principalmente indireto, pela sua conversão a radical hidroxila após exposição à luz ultravioleta ou interação com íons de metais de transição (sendo ferro o mais importante no contexto *in vivo*) em uma reação tipo-Fenton (Figura 7). Por ser altamente reativo, o radical

hidroxila causa dano oxidativo ao DNA, peroxidação lipídica e quebra de ligações covalentes em proteínas. [100,101]

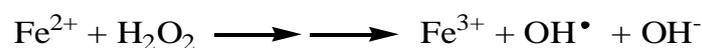


Figura 7. Esquema da reação de conversão de peróxido de hidrogênio a radical hidroxila *in vivo*.

A depuração do peróxido de hidrogênio no organismo é realizada por enzimas, como a catalase. No entanto, como mencionado acima, ocorre acúmulo dessa espécie em locais atingidos por processos inflamatórios ou com metabolismo alterado em virtude de diversas patologias. Nesse contexto, a liberação controlada de antioxidantes no local de ação como forma de reduzir a concentração de espécies reativas de oxigênio pode levar a melhores prognósticos para os pacientes. Nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$, por serem miméticos funcionais de oxidoredutases, conforme explicitado anteriormente, apresentam vantagens em relação a antioxidantes orgânicos convencionais no combate ao dano oxidativo. No entanto, estas nanopartículas podem atuar como pró-oxidantes em alguns tecidos saudáveis, o que levaria ao efeito contrário do benefício inicialmente pretendido.

2.3.2. Oxidação de Ce(III) a Ce(IV) na presença de H_2O_2

A preocupação com a toxicidade de nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$ está associada ao forte caráter oxidante da espécie Ce(IV) e sua consequente habilidade de causar modificações químicas deletérias em tecidos saudáveis, o que limita sua aplicação para o tratamento de doenças. Para contornar esse problema, no presente trabalho de mestrado foi proposta uma estratégia inovadora de síntese *on-demand* de nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$ a partir de *clusters* de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ aprisionados em cristal líquido liotrópico de fitantriol na presença de peróxido de hidrogênio como gatilho. Os *clusters* inorgânicos seriam oxidados em meio aquoso pelo peróxido de hidrogênio (espécie reativa de oxigênio bastante comum em processos inflamatórios) [102] através de um provável mecanismo que envolve a formação de ácido peroximonoceroso e ácido peroximonocerico. A formação de $\text{Ce}(\text{OH})_4$ seria seguida de desidratação a CeO_2 (mais especificamente, $\text{CeO}_{(2-x)}$, devido à formação de vacâncias, conforme discutido anteriormente) (Figura 8).

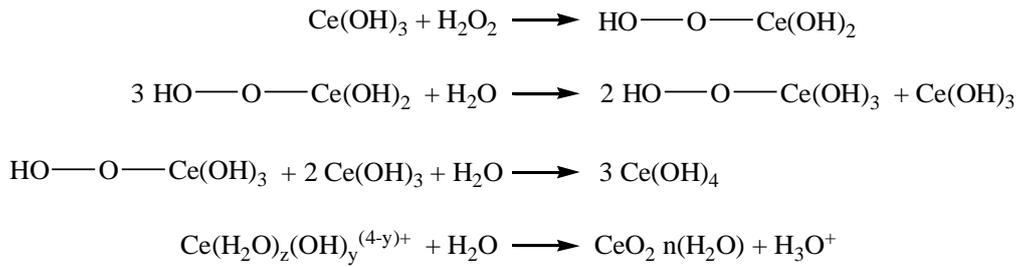


Figura 8. Esquema de reação proposto entre hidróxido de cério (III) e peróxido de hidrogênio em meio aquoso.

Nanopartículas compostas por cério apenas em seu estado reduzido Ce(III) apresentariam menor tendência a comprometer a integridade de tecidos saudáveis. Por outro lado, sua ação como mimético de SOD seria inexistente. Portanto, as nanopartículas de Ce(OH)₃ aprisionadas no cristal líquido podem ser consideradas como uma pró-enzima sintética (forma inativa), com ativação a CeO_(2-x) (mimético funcional de enzima, forma ativa) em resposta à presença de H₂O₂ como gatilho. A comprovação dessa hipótese abriria uma nova janela para o desenvolvimento de plataformas de tratamento inteligentes baseadas na síntese de miméticos nanoparticulados de enzimas diretamente no organismo em locais específicos, de acordo com a necessidade do paciente.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Esta dissertação de mestrado teve como objetivo desenvolver sistemas líquido-cristalinos liotrópicos contendo *clusters* de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ com capacidade de responder à presença de H_2O_2 no meio externo através da síntese *on-demand* de nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$ com atividade de superóxido dismutase.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma estratégia de síntese de nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ com diâmetro controlado em cristal líquido liotrópico composto de fitantriol e água;
- Verificar a responsividade do sistema líquido-cristalino frente a H_2O_2 como gatilho, com síntese *on-demand* de nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$;
- Caracterizar as nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$ sintetizadas *in situ* quanto às suas propriedades eletrônicas e estruturais;
- Determinar o potencial das nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$ como mimético funcional de superóxido dismutase através de ensaios de atividade enzimática *in vitro*.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

4.1.1. Reagentes, solventes e outros materiais de consumo

- Ácido acético glacial (99,7%)
- Ácido clorídrico concentrado (37 %)
- Ácido sulfúrico PA (95-97 %)
- (-)-Adrenalina, Sigma-Aldrich® (EUA)
- Água ultrapura (tipo 1, resistividade de 18MΩ.cm a 25°C)
- Catalase de fígado bovino (EC 1.11.1.6, para cultura celular), 3809 U/mg, lote: 010M7011V, produzido por Sigma-Aldrich® (EUA)
- Etanol PA (pureza 96%)
- Etanol absoluto (pureza > 99%)
- Fita de Kapton, 3M® (EUA)
- Fita indicadora de pH (indicador universal faixa pH 0-14), Merck® (Alemanha)
- Fitantriol (3,7,11,15-tetrametilexadecano-1,2,3-triol, pureza > 95%, lote: UQ40907005, produzido por DSM Nutritional Products), Sarfam® (Brasil)
- Grades de cobre de *mesh* 300 para microscopia eletrônica de transmissão, cobertas por filme de carbono ultrafino, Ted Pella® (EUA)
- Glicina (pureza ≥ 99%), Sigma-Aldrich® (EUA)
- Hidróxido de sódio PA (pureza > 98%)
- Isopropanol PA (pureza > 99%)
- Membranas filtrantes de Nylon 40 μm, Filtrostec® (Brasil)
- Membranas de PVDF Durapore 0,22 μm, Merck-Millipore® (Alemanha)
- Nanopartículas de óxido de cério (IV) (tamanho < 25 nm por BET, lote MKBW9921V), Sigma-Aldrich® (EUA)
- Nitrato de cério (III) hexaidratado (pureza > 99% com relação a metais traço, lote BCBJ9823V), Sigma-Aldrich® (EUA)
- Peróxido de Hidrogênio 130 V (teor mínimo 35% m/m, lote 66462), Dinâmica Química® (Brasil)
- Polissorbato 20, Sigma-Aldrich® (EUA)
- Polissorbato 80 (pureza 98%, lote MKBV7222V), Sigma-Aldrich® (EUA)
- Tris base (2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol, pureza 99,95%), Neon® (Brasil)

4.1.2. Equipamentos

- Agitador de tubos tipo vórtex mod. AV-2, Gehaka® (Brasil) – *Lab. E208, IQ/UFRGS*
- Agitador tipo estator-rotor mod. Ultra-Turrax T10 basic, IKA® (Alemanha) – *Lab. E208, IQ/UFRGS*
- Analisador termogravimétrico mod. Q50, TA Instruments® – *LAPOL, Escola de Engenharia/UFRGS*
- Balança analítica mod. ATX224, Shimadzu® (Japão) – *Lab. E208, IQ/UFRGS*
- Banho de ultrassom mod. Limp Sonic LS-5,7DA-2X, Embrasol® (Brasil) – *Lab. E208, IQ/UFRGS*
- Bomba de vácuo mod. V-100, Büchi® (Alemanha) – *Lab. E208, IQ/UFRGS*
- Chapa de agitação magnética com aquecimento mod. AA-840, Gehaka® (Brasil) – *Lab. E208, IQ/UFRGS*
- Centrífuga analógica para tubos com rotor de ângulo fixo mod. 80-2B, Daiki® (Japão) – *Lab. E208, IQ/UFRGS*
- Difrator de raios-x convencional D5000, Siemens® (Alemanha) – *IF/UFRGS*
- Espectrofotômetro de absorção molecular no ultravioleta-visível mod. UV-2450, Shimadzu® (Japão) – *Lab. E208, IQ/UFRGS*
- Espectrofotômetro mod. Spectramax M2e, Molecular Devices® (EUA) – *Laboratório de Genética Toxicológica, UFCSPA*
- Espectrofotômetro de absorção molecular no infravermelho com transformada de Fourier mod. IRPrestige-21, Shimadzu® (Japão) – *Central Analítica, IQ/UFRGS*
- Estufa a vácuo mod. 440-D, Ethik Technology® (Brasil) – *Lab. E208, IQ/UFRGS*
- Metalizadora mod. MED 020, Bal-Tech Instrument® (Alemanha) – *CMM/UFRGS*
- Microscópio eletrônico de transmissão mod. JEM 1200 ExII equipado com câmera CCD, Jeol® (Japão) – *CMM/UFRGS*
- Microscópio eletrônico de varredura mod. EVO MA10, equipado com detector de elétrons secundários, detector de elétrons retroespalhados e detector de raios X característicos, Zeiss® (Alemanha) – *CMM/UFRGS*
- Microscópio óptico mod. BX41TF acoplado a câmera fotográfica e polarizador, Olympus®, (Japão) – *IQ/UFRGS*
- pHmetro de bancada mod. PG1800, Gehaka® (Brasil) – *Lab. E208, IQ/UFRGS*
- Sistema de purificação de água (MilliQ®), mod. Integral5/Q-POD, Millipore® (EUA) – *DQI/UFRGS*

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Síntese das nanopartículas de hidróxido de cério (III) em cristal líquido

Nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ foram sintetizadas por método de precipitação em meio líquido-cristalino liotrópico composto por fitantriol e água, empregando-se $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ como precursor. Em balão de fundo redondo, adicionou-se fitantriol e o precursor em quantidades determinadas (Tabela III). A mistura foi mantida a $70\text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação magnética por 30 min, a fim de propiciar a fusão do $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. A solução resultante apresentou aspecto incolor. Após esse período, antes do arrefecimento da mistura, adicionou-se 10 ml de solução aquosa de NaOH 0,01 M e manteve-se o balão em agitador tipo vórtex por cerca de 1 min. Ocorreu intumescimento imediato do fitantriol, sugerindo que o mesmo estruturou-se como cristal líquido devido à presença de água. O excesso de solução aquosa (cujo pH foi reduzido a 6 devido à reação química do NaOH com o precursor de cério) foi removido por decantação. Este procedimento foi repetido com novas alíquotas de solução de NaOH 0,01 M até que o pH da mesma mantivesse valor igual a 12 (determinado com fita indicadora de pH) após contato com o cristal líquido. Subsequentemente, realizou-se lavagem do cristal líquido com água destilada, com auxílio de agitador tipo vórtex, tantas vezes quantas necessárias até o pH do líquido decantado ter atingido a neutralidade.

Tabela III. Componentes empregados na primeira etapa de preparação das nanopartículas de hidróxido de cério (III) em cristal líquido.

Amostra	Fitantriol (g)	$\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (g)	Proporção molar Cerío:Fitantriol
LC	2,40	0	-
LC-NP _{2,5}	2,40	0,06	1:52
LC-NP _{5,0}	2,40	0,12	2:52
LC-NP _{7,5}	2,40	0,18	3:52
LC-NP _{10,0}	2,40	0,24	4:52

Ao final da preparação, as amostras apresentaram aspecto transparente e cor amarelada (com exceção da amostra-controle LC, que se manteve incolor). As amostras foram armazenadas em frascos de vidro âmbar. O conjunto de amostras líquido-cristalinas contendo

nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ foi denominado LC-NP_x, sendo “x” igual ao percentual em massa de precursor em relação ao fitantriol (Tabela III).

4.2.2. Microscopia óptica

Para verificar se estruturas micrométricas foram formadas pela aglomeração de nanopartículas no cristal líquido após a síntese, alíquotas das amostras foram depositadas em lâminas de vidro e visualizadas sob luz normal em microscópio óptico Olympus BX41TF, acoplado à câmera fotográfica, sob aumento de 10 ×.

4.2.3. Espectroscopia de absorção molecular na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As amostras da série LC-NP_x foram depositadas em cristais de NaCl e analisadas à temperatura ambiente em espectrofotômetro IRPrestige-21 (programa de tratamento de dados Shimadzu IR Resolution 1.50) na região do infravermelho (4000 a 600 cm^{-1}) em modo transmitância, com 16 acumulações e resolução de 4 cm^{-1} .

4.2.4. Análise de nitrogênio total

As amostras da série LC-NP_x foram analisadas através de ensaio de nitrogênio total pelo método Kjeldahl, que quantifica nitrogênio orgânico e inorgânico como nitrogênio total [103]. A amostra sofreu digestão em meio ácido na presença de catalisador e toda a amônia gerada a partir da decomposição das espécies nitrogenadas foi determinada quantitativamente por eletrodo seletivo. O tratamento das amostras e as medidas foram inteiramente realizados pela empresa NSF Bioensaios (Viamão, Brasil).

4.2.5. Espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS) empregando radiação síncrotron

Análises de SAXS foram realizadas na linha de luz SAXS1 do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, CNPEM – Campinas, Brasil). As amostras foram depositadas entre duas fitas de Kapton® e colocadas em porta-amostra de sólidos. Um feixe monocromático colimado de raios X ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$) incidiu sobre a câmara contendo o porta-amostra, sob

pressão reduzida. O detector linear (Pilatus®, Dectris) do feixe difratado foi posicionado a 1 m atrás da amostra. As medidas foram realizadas à temperatura ambiente com tempo de exposição típico de 50 s. Beenato de prata foi empregado para calibração e as intensidades dos picos correspondentes foram corrigidas para os sinais do detector vazio e da corrente de fundo. Os padrões bidimensionais obtidos a partir das análises de SAXS foram convertidos em curvas de intensidade de luz espalhada $I(q)$ como função da magnitude do vetor de espalhamento q (nm^{-1}) na faixa de 0,1 a 4,0 nm^{-1} , empregando-se o programa de tratamento de dados FIT2D®. O sinal de raios X espalhados referente ao Kapton® foi subtraído dos perfis das amostras.

4.2.6. Análise termogravimétrica (TGA)

As amostras de cristal líquido (cerca de 15 mg) foram depositadas em panelinhas de alumina e analisadas empregando-se equipamento TA Instruments® TGA Q50. O experimento foi realizado de 40 a 600 °C com taxa de aquecimento de 20 °C min^{-1} sob atmosfera oxidante (ar). A primeira derivada dos termogramas foi calculada através do programa de tratamento de dados TA Universal Analysis 2000 para Windows 2000/XP/Vista, versão 4.5A. Fitantriol (cerca de 15 mg) e padrão de óxido de cério (5 mg) também foram analisados nas mesmas condições, sem qualquer tratamento prévio das amostras.

4.2.7. Síntese *on-demand* das nanopartículas de óxido de cério a partir do material líquido-cristalino pela adição de H_2O_2

As amostras da série LC-NP_x (2,0 g) foram colocadas em contato com 15 ml de solução tamponada oxidante (120 mM de H_2O_2) e mantidas em repouso, em frasco âmbar, à temperatura ambiente. A solução tamponada oxidante foi preparada no momento de sua utilização, diluindo-se 200 μl de solução de peróxido de hidrogênio 130 v diretamente em 15 ml de tampão. Para fins de comparação, avaliou-se as amostras na presença de 15 ml de tampão sem adição de H_2O_2 . Os tampões empregados na reação corresponderam a: 1) tampão ácido acético/acetato de sódio 0,1 M (pH = 5,5) e 2) tampão Tris·HCl/Tris 0,1 M (pH = 7,4). A descrição detalhada da preparação dos tampões encontra-se no Anexo I. A série de amostras de óxido de cério sintetizadas pela adição de H_2O_2 foi denominada ox-NP_x (detalhes do processo de secagem dessas amostras estão descritos no item 4.2.8).

4.2.8. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

As medidas de TEM foram realizadas com o intuito de determinar a forma e a distribuição de tamanho das nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ no cristal líquido (item 4.2.1) e das nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$ sintetizadas *in situ* após exposição do sistema líquido-cristalino a H_2O_2 em tampão pH 5,5 (conforme descrito no item 4.2.7).

Medidas de TEM das amostras da série LC-NP_x:

Como as medidas de TEM exigem a deposição de amostra de espessura ultrafina sobre grade de cobre (suporte de amostras para TEM), foi necessário dispersar finamente o cristal líquido em meio aquoso, de forma que a quantidade de amostra depositada fosse suficientemente reduzida a fim de permitir a ocorrência de transmissão. Para isso, as amostras de cristal líquido contendo nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ (100 mg) foram misturadas a fitantriol (100 mg) e dispersas em 10 ml de solução aquosa de polissorbato 80 (5 mg ml^{-1}), sob agitação magnética por 24 h. A dispersão grosseira assim obtida foi cisalhada em agitador do tipo estator-rotor (Ultra-Turrax, Ika®) a aproximadamente 24000 rpm por 15 min, utilizando-se haste S10N-10G. A dispersão resultante apresentou-se leitosa e macroscopicamente homogênea. Uma alíquota de 150 μl dessa dispersão foi diluída a 5 ml com água MilliQ®. Uma gota da dispersão diluída foi delicadamente depositada sobre grade de cobre de 3 mm de diâmetro coberta com filme de carbono ultrafino. A gota permaneceu em contato com a grade por 1 min e, após esse período, o excesso de líquido foi cuidadosamente removido com auxílio de papel absorvente. As grades com amostra foram mantidas em dessecador por no mínimo 24 h. A obtenção das imagens foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão JEM 1200 ExII (Jeol®, Japão) operando a 80 kV (CMM - UFRGS).

Medidas de TEM das amostras da série ox-NP_x:

O meio tamponado contendo as nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$ sintetizadas *in situ* foi transferido para tubo de vidro tipo Falcon e procedeu-se centrifugação por 15 min a 3500 rpm. O precipitado foi lavado com água e seco em dessecador acoplado a bomba de vácuo durante 24 h. O pó seco obtido foi denominado genericamente de ox-NP_x, sendo “x” indicativo da quantidade de precursor de cério utilizada na preparação das amostras líquido-cristalinas de origem (ex.: ox-NP_{5,0} foi obtido a partir da reação de H_2O_2 com LC-NP_{5,0}). Para

realização das medidas de TEM, este pó foi disperso em etanol e mantido em banho de ultrassom por 30 min. A mistura resultante foi delicadamente depositada em grade de cobre e medida conforme procedimento descrito acima.

A distribuição de diâmetro das nanopartículas (séries LC-NP_x e ox-NP_x) foi obtida com auxílio do programa ImageJ® (versão 1.49v) a partir do processamento das imagens de TEM. O diâmetro de partícula foi calculado a partir da área, considerando-se as partículas como sendo esféricas. Foram analisadas pelo menos 5000 partículas por amostra no caso das dispersões de LC-NP_x e 1000 partículas por amostra no caso das nanopartículas da série ox-NP_x.

4.2.9. Difração de raios X (XRD)

A técnica de XRD foi empregada com o intuito de identificar as fases cristalinas existentes nas nanopartículas da série ox-NP_x. Para isso, amostras dos pós ox-NP_{2,5}, ox-NP_{5,0}, ox-NP_{7,5} e ox-NP_{10,0} foram tamisados em peneira de 49 µm. Foi utilizado um difratômetro convencional Siemens D500 operado a 40 kV e 17,5 mA e radiação de Cu-K α com comprimento de onda de 1,5405 Å. Empregou-se passo de 0,05° e intervalo de ângulo 2 θ de 20° a 80°. Cada ponto foi medido durante 1s. Foram utilizados os padrões de referência do software PCPDFWIN, versão 2.1, a partir da base de dados JCPDS-ICDD. Para fins de comparação, CeO₂ comercial (padrão) foi igualmente medido.

4.2.10. Estrutura de absorção de raios X próxima à borda (XANES)

As medidas de XANES das amostras LC-NP_x foram realizadas na linha de luz XAFS2 do LNLS em modo fluorescência na borda L₃ do Ce (5723 eV) à temperatura ambiente. As amostras de cristal líquido contendo nanopartículas de Ce(OH)₃ foram colocadas em cubetas de acrílico para líquidos (caminho óptico = 10 mm), as quais foram fechadas com fita Kapton® e inseridas no ponto focal da linha de luz. Cada cubeta foi posicionada com a respectiva direção normal a 45° em relação ao feixe de luz incidente. Utilizou-se um monocromador de Si (111), sendo que a calibração foi realizada na borda K do Cr (5989 eV) utilizando-se uma folha metálica de cromo, medida no modo transmissão. Além disso, também foram medidos padrões comerciais de Ce(NO₃)₃·6H₂O e de CeO₂ na borda L₃ do Ce no modo transmissão para verificação da calibração em energia durante as medidas. Foi

utilizado um detector de estado sólido de Ge com 15 elementos G-15 SSD. As medidas foram realizadas na região de XANES no intervalo de 5675 eV a 5780 eV com passo de energia de 0,2 eV na região da borda de absorção durante 4 s/ponto. Foram obtidas de duas a quatro varreduras para aumentar a razão sinal/ruído da medida.

A conversão do Ce(III) a Ce(IV) induzida por H₂O₂ (item 4.2.7) foi monitorada por XANES colocando-se as amostras de cristal líquido em contato com meio tamponado oxidante. Após tempo pré-determinado, retirou-se as amostras das soluções tamponadas para depositá-las em porta-amostras de acrílico e realizar as medidas de XANES conforme método descrito acima. Também foram realizadas medidas de XANES na borda L₃ do Ce de padrões comerciais de Ce(NO)₃·6H₂O e CeO₂. As medidas dos padrões foram realizadas no modo transmissão.

Inicialmente foi realizada a calibração dos espectros de XANES e normalização dos dados medidos seguindo-se procedimento padrão de redução dos dados de XAS [104]. Em seguida, a análise dos espectros de XANES foi realizada empregando-se método descrito por Takahashi e colaboradores [105] na região compreendida desde a borda de absorção até em torno de +15 eV após a borda. Esse método consiste no ajuste da região de XANES por uma soma de duas funções arcotangentes e três funções Lorentzianas. Duas dessas funções Lorentzianas estão associadas ao estado de oxidação Ce(IV) enquanto que a outra função Lorentziana é associada ao estado de oxidação Ce(III). A Lorentziana correspondente ao estado de oxidação Ce(III) representa uma transição do nível 2p_{3/2} para o estado eletrônico 4f¹5d. Uma das funções Lorentzianas associadas ao estado de oxidação Ce(IV) corresponde à uma transição eletrônica do nível 2p_{3/2} para o estado 4f⁰5d e a outra do nível 2p_{3/2} para o estado 4f^L5d, onde L denota que um elétron de um orbital 2p do O foi transferido para o orbital 4f do Ce. As funções arcotangentes correspondem à transição eletrônica do nível 2p_{3/2} para o contínuo. Dessa forma, a fração de Ce(III) χ é obtida diretamente por (Equação 3):

$$\chi = \frac{A_3}{A_3 + A_4} \quad (3)$$

onde A₃ corresponde à área da Lorentziana associada ao estado de oxidação Ce(III) e A₄ à soma das áreas das funções Lorentzianas associadas ao estado de oxidação Ce(IV).

O ajuste dos espectros de XANES foi realizado utilizando-se inicialmente os espectros dos padrões medidos. Foram considerados os compostos Ce(NO)₃·6H₂O e CeO₂ como padrões associados aos estados de oxidação do Ce(III) e Ce(IV), respectivamente. Assim,

ajustou-se o espectro de XANES do padrão de Ce(III) com uma função arcotangente e uma função Lorentziana. Nesse ajuste, todos os parâmetros associados à função arcotangente (altura, concavidade e posição em energia) e à função Lorentziana (altura, largura total à meia altura FWHM e posição em energia) foram deixados livres, sem vínculos. Depois, foi ajustado o espectro de XANES do padrão de Ce(IV), também deixando livres os parâmetros associados à função arcotangente e às funções Lorentzianas. A partir do ajuste dos padrões, obtiveram-se os parâmetros associados às funções arcotangente e Lorentzianas, que são utilizados como parâmetros fixos durante ajuste dos espectros de XANES das amostras. O único parâmetro variável foi a altura das funções Lorentzianas, a partir da qual é possível obter a área e, conseqüentemente, a fração de Ce(III) a partir da Equação 3.

Durante ajuste dos espectros de cada amostra, uma das funções arcotangente convergiu a zero. Assim, os espectros de XANES das amostras foram ajustados com três funções Lorentzianas e apenas uma função arcotangente. Com esse procedimento, não foi possível obter um ajuste plenamente satisfatório dos espectros de XANES de todas as amostras. Devido a isso, foi realizado um ajuste fino deixando-se variar minimamente a altura da função arcotangente (cerca de 10% do valor inicial), FWHM da função Lorentziana (~ 1 eV) e posição em energia da função Lorentziana (~ 0,5 eV). Desta forma, foram obtidos ajustes satisfatórios para todos os casos.

4.2.11. Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)

A técnica de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) foi empregada para monitorar a liberação das nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$ para o meio externo como consequência da conversão de Ce(III) a Ce(IV) induzida por H_2O_2 após contato com o cristal líquido. Para isso, as amostras de cristal líquido contendo $\text{Ce}(\text{OH})_3$ foram colocadas em contato com meio tamponado oxidante (120 mM de H_2O_2) e o sobrenadante de cada mistura foi retirado em tempos pré-determinados para análise à temperatura ambiente em espectrofotômetro UV2450 (Shimadzu), na faixa de 210 a 500 nm. O mesmo procedimento foi feito utilizando-se a amostra LC, cujas medidas do sobrenadante foram empregadas como controle. Paralelamente, foram analisadas também soluções aquosas dos compostos $\text{Ce}(\text{OH})_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ como padrões de Ce(III) e Ce(IV), respectivamente.

4.2.12. Ensaio *in vitro* para determinação da atividade de superóxido dismutase

(colaboração: Profa. Dra. Dinara Jaqueline Moura - UFCSPA)

As nanopartículas de $CeO_{(2-x)}$ foram avaliadas quanto ao seu potencial mimético de SOD através da medida da sua capacidade de inibir a formação de adrenocromo gerado pela auto-oxidação da adrenalina em pH 10,2. Em pH elevado e atmosfera ambiente, o ânion radical superóxido é um subproduto gerado na conversão da adrenalina (incolor) a adrenocromo (colorido) em meio contendo O_2 , via processo radicalar [106]. A formação de ânion radical superóxido no início do processo leva ao aumento considerável da taxa de formação do adenocromo por mecanismo autocatalítico.

As nanopartículas da série ox-NP_x (1 mg) foram adicionadas a solução aquosa contendo 20 % (v/v) de polissorbato 20 (1 mL) e mantidas sob agitação magnética por 15 min à temperatura ambiente. Alíquotas de 2, 5 e 10 μ L da dispersão aquosa foram transferidas para placas de 96 poços. Para cada alíquota, adicionou-se respectivamente 198, 195 e 190 μ L de solução tampão de glicina (50 mM, pH 10,2 – *vide* preparação no Anexo I) e 1 μ L de solução de catalase (100 U/mL). As concentrações finais de ox-NP_x em cada poço foram iguais a 0,05; 0,10 e 0,25 mg/mL. Para fins de comparação, avaliou-se também nanopartículas de CeO_2 (padrão comercial) nas mesmas concentrações finais. Solução aquosa de ácido gálico foi empregada como controle positivo nas mesmas concentrações finais. A geração de ânion radical superóxido foi iniciada pela adição de 1 μ L de solução acidificada de (-)-adrenalina (2 mM – *vide* preparação no Anexo I). A formação de adrenocromo foi monitorada em 480 nm por 15 min a 32 °C em espectrofotômetro, no Laboratório de Genética Toxicológica da UFCSPA (Porto Alegre – RS). As soluções de nanopartículas da série ox-NP_x e CeO_2 com polissorbato 20 mostraram-se transparentes ao comprimento de onda de 480 nm nas condições do ensaio.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA LÍQUIDO-CRISTALINO LIOTRÓPICO CONTENDO $\text{Ce}(\text{OH})_3$ NANOPARTICULADO

Sabe-se que, em meio aquoso, cério tende a permanecer solúvel na forma $\text{Ce}^{3+}_{(\text{aq})}$ em pH ácido, enquanto que sua solubilidade é bastante reduzida em pH alcalino pela formação predominante da espécie $\text{Ce}(\text{OH})_3$ [63]. Nesse sentido, a indução da precipitação de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ a partir de sal solúvel de Ce(III) pela adição de $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ ao meio aquoso é uma escolha conveniente. Porém, faixas alcalinas de pH não são compatíveis com aplicações biológicas. Frente ao exposto, a primeira etapa deste estudo de mestrado consistiu no desenvolvimento de uma metodologia de síntese de nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ a partir de precursor na forma de sal solúvel de Ce^{3+} e $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$, de forma que o seu caráter coloidal fosse mantido mesmo após neutralização do meio. Levantou-se a hipótese de que nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ formadas em meio alcalino seriam estabilizadas por lipídio contendo grupo hidroxila, devido à forte interação Ce–O. Este revestimento poderia dificultar a dissolução de Ce^{3+} a partir das nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ em ampla faixa de pH [107]. Devido à hidrofobicidade conferida pelo revestimento com lipídio, seria esperada também uma redução significativa na sua citotoxicidade [108]. Por outro lado, a conseqüente aglomeração resultante de uma superfície altamente hidrofóbica em água não é vantajosa para aplicação biológica. A escolha de fitantriol como lipídio neste trabalho baseou-se na sua resistência à degradação em meio aquoso alcalino, presença de hidroxila em sua estrutura química e capacidade de estruturar-se como cristal líquido liotrópico em água. [32] Com o lipídio revestindo as nanopartículas e, ao mesmo tempo, estruturando-se em uma rede líquido-cristalina, a aglomeração das nanopartículas em água seria evitada.

Após várias tentativas com precursores e condições diversas, optou-se pela utilização de $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 70 °C, pois esta é a temperatura de fusão deste sal. Com isso, uma mistura entre este precursor de cério e fitantriol (também líquido) tornou-se bastante facilitada, sem necessidade de adição de solventes, que nas tentativas anteriores tenderam a induzir precipitação de partículas na faixa micrométrica. À mistura, verteu-se solução aquosa de $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$, e procedeu-se agitação com auxílio do equipamento vórtex. Durante este processo, ocorreu o rápido arrefecimento da solução e a queda do pH da fase aquosa resultante de pH 12 (original da solução de NaOH 0,01M) para 6. Este fato demonstrou o

consumo da $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$, durante a reação de precipitação de espécies $\text{Ce}(\text{OH})_3$. O ciclo de adição de $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ e remoção do excesso de água por decantação foi repetido sucessivas vezes até que o pH da solução aquosa após contato com o cristal líquido permanecesse em 12, indicando não haver mais consumo de $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$. O sal, por ser nitrato, é bastante solúvel e dissocia-se em água formando $\text{Ce}^{3+}_{(\text{aq})}$ e $\text{NO}_3^{-}_{(\text{aq})}$. O cátion Ce^{3+} hidratado é um ácido fraco, o qual perde prótons sistematicamente devido à adição da base forte $\text{OH}^{-}_{(\text{aq})}$, com formação de espécies carregadas (Figura 9). Esta sequência culmina na formação de $\text{Ce}(\text{OH})_{3(\text{s})}$, neutro e insolúvel no meio aquoso.

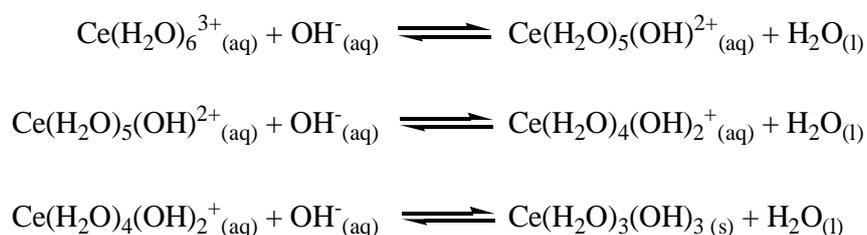


Figura 9. Esquema da síntese de hidróxido de cério (III) a partir do precursor nitrato de cério(III) em meio aquoso alcalino (o ânion nitrato não está representado para fins de clareza; o cério está representado na forma hidratada).

O contato do sal de cério com hidróxido de sódio resultou na formação de uma mistura de cor transparente-amarelada independentemente da concentração de precursor utilizada na síntese (série LC-NP_x). O mesmo procedimento foi realizado sem precursor de cério para fins de comparação (LC). O cristal líquido obtido neste caso manteve-se incolor (Figura 10).

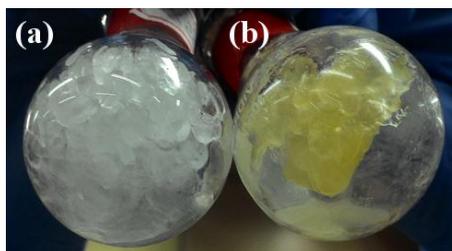


Figura 10. Fotografia das amostras (a) LC e (b) LC-NP_{5,0} após preparação.

A partir da coloração amarelada das amostras LC-NP_x, pode-se inferir que certo grau de conversão de Ce(III) a Ce(IV) possa ter ocorrido. Isso é plausível, pois o sistema foi mantido aberto, em contato com O_2 da atmosfera, em excesso de $\text{OH}^{-}_{(\text{aq})}$ durante a lavagem (Figura 11). [63]



Figura 11. Esquema de reação de espécie de Ce(III) em meio aquoso sob exposição à atmosfera ambiente, com formação de espécie de Ce(IV).

Após transcorridas 24 h da sua preparação, as amostras da série LC-NPx foram visualizadas em microscópio óptico sob luz normal. Partículas não foram observadas após varredura exaustiva das amostras com aumento de 10 ×. Para fins de comparação, a amostra LC (sem componente inorgânico), também foi analisada nas mesmas condições, apresentando o mesmo resultado. Portanto, o processo de síntese desenvolvido neste estudo não causou a formação de aglomerados ou partículas com tamanhos na faixa micrométrica, os quais seriam observados por microscopia óptica.

Pretende-se aplicar os sistemas desenvolvidos como pró-miméticos funcionais de enzimas capazes de ser convertidos em óxido de cério (IV) (mimético funcional de enzima) em resposta à presença de H₂O₂ como gatilho. Nesse sentido, uma grande área superficial do hidróxido de cério (III) seria altamente desejada, com o intuito de favorecer sua oxidação, visto que processos redox em partículas de óxidos e hidróxidos de cério ocorrem na sua superfície [71,91]. Portanto, a presença de partículas micrométricas seria um fator de exclusão de amostras pela reduzida razão entre área e volume. Como os resultados de microscopia óptica não permitiram excluir nenhuma amostra da série LC-NPx por esse critério, todas elas foram eleitas para as próximas etapas deste estudo.

Embora bastante improvável, buscou-se verificar se o precursor Ce(NO₃)₃ · 6H₂O ou o hidróxido de sódio poderiam ter causado modificação química do fitantriol durante a etapa de síntese de Ce(OH)₃ nos cristais líquidos. Para isso, as amostras da série LC-NPx e o controle LC (para fins de comparação) foram medidos quanto à absorção molecular na região do infravermelho (Figura 12). Como esperado, não há diferenças evidentes entre os espectros da série LC-NPx e o espectro da amostra LC. A presença tanto de água nas amostras quanto de grupo álcool no fitantriol foram responsáveis pela intensa banda de estiramento de –OH em torno de 3380 cm⁻¹. A água presente fica evidenciada pela deformação angular de H–O–H em 1643 cm⁻¹ nos espectros. Por sua vez, os modos vibracionais de estiramento (simétrico e assimétrico) de –CH (carbono sp₃) em 2861 e 2952 cm⁻¹ são características da cadeia alifática do fitantriol. A banda em 510 cm⁻¹ tipicamente associada ao modo vibracional de estiramento da ligação Ce-O de Ce(OH)₃ [109] não pode ser visualizado nos espectros, pois os mesmos

foram medidos em cristais de NaCl, que absorvem luz infravermelha em valores inferiores a 625 cm^{-1} (e, por este motivo, as medidas foram obtidas de 4000 a 600 cm^{-1}).

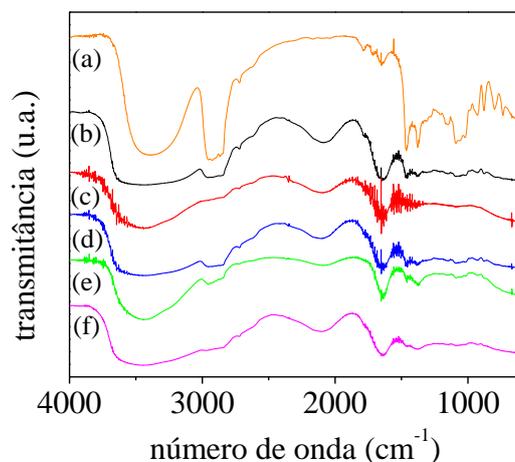


Figura 12. Espectros de absorção molecular na região do infravermelho de (a) fitantriol, (b) LC, (c) LC-NP_{2,5}, (d) LC-NP_{5,0}, (e) LC-NP_{7,5}, (f) LC-NP_{10,0} (amostras depositadas em cristal de NaCl).

Um possível contaminante nos materiais seria o sal dissociado de $\text{NaNO}_3(\text{aq})$ formado como subproduto de síntese (Figura 9). Uma das bandas mais características desse composto na região do infravermelho corresponde a 836 cm^{-1} , a qual não foi observada nos espectros das amostras (Figura 12). Isso pode indicar que o mesmo foi adequadamente removido na etapa de lavagem dos cristais líquidos com água ou que se encontra dissolvido na amostra em concentração inferior ao limite de detecção da técnica de absorção na região do infravermelho. Com o intuito de determinar a presença de nitrato nas amostras, foi realizada análise de nitrogênio total pelo método Kjeldahl. Não foram encontradas concentrações significativas de nitrogênio total tanto para LC (como esperado) quanto para as amostras da série LC-NP_x.

A visualização da forma e a obtenção da distribuição de tamanho das partículas foram realizadas através de microscopia eletrônica de transmissão. Para isso, foi necessário dispersar as amostras da série LC-NP_x em meio aquoso com auxílio de surfactante (polissorbato 80) a fim de serem depositadas em grades de cobre. Nenhum tipo de agente de contraste foi adicionado às grades. As nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_3$, devido à sua alta densidade eletrônica, possuem maior probabilidade de espalhar os elétrons do que o fitantriol. Com isso, regiões ricas em nanopartículas são visualizadas como áreas escuras. Estruturas eletrodensas típicas com dimensões nanométricas e forma esférica foram visualizadas em todas as amostras

(Figura 13). As amostras mostraram-se bastante homogêneas no que se refere a tamanho e forma das nanopartículas.

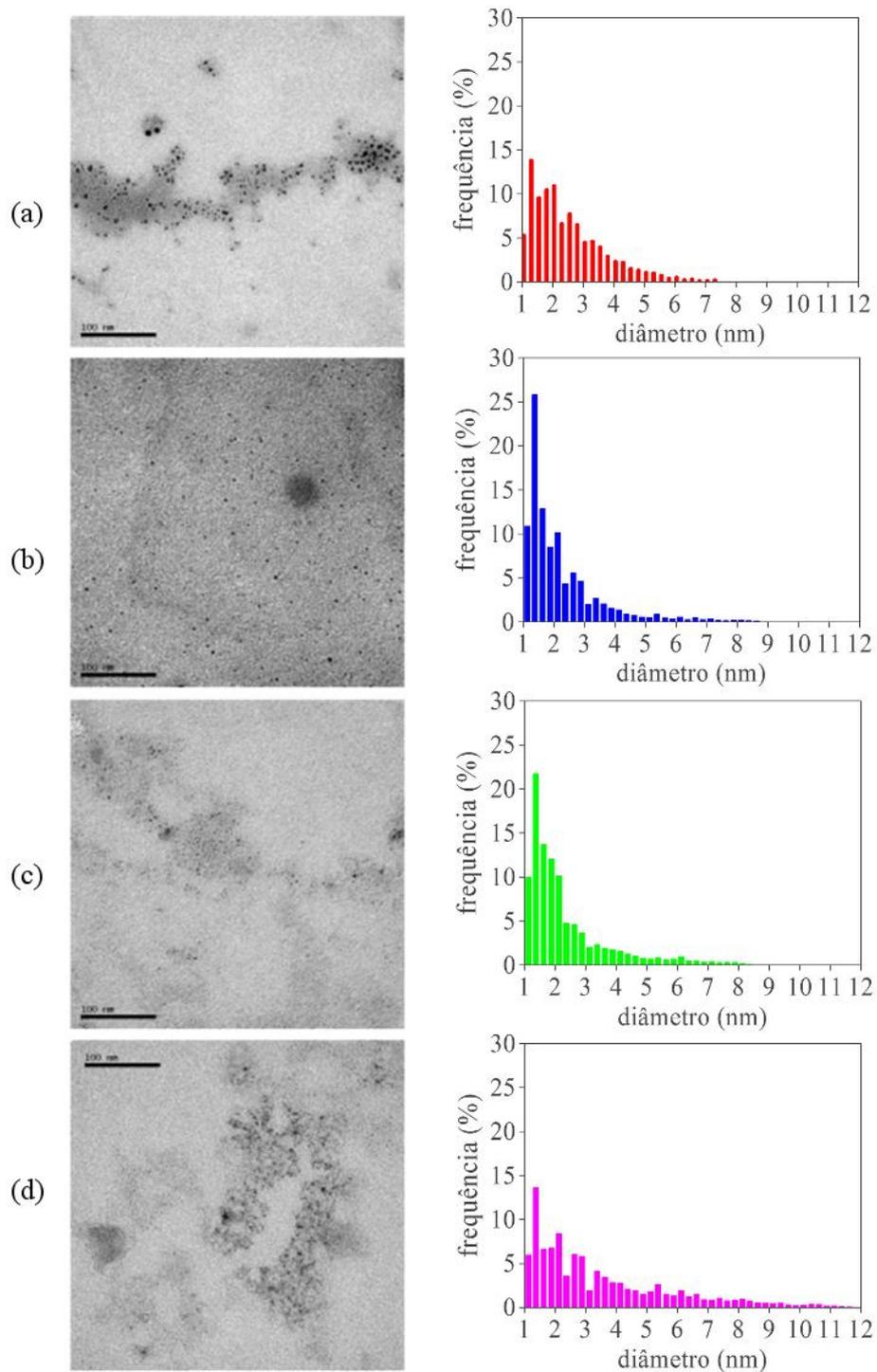


Figura 13. Imagens representativas de microscopia eletrônica de transmissão de dispersões obtidas a partir das amostras (a) LC-NP_{2,5}, (b) LC-NP_{5,0}, (c) LC-NP_{7,5}, (d) LC-NP_{10,0} (barra = 100 nm, magnificação de 300000 ×) e respectivas distribuições de diâmetro das nanopartículas (mínimo de 5000 partículas por amostra, *software*: ImageJ®).

É interessante notar que as nanopartículas concentraram-se em regiões na grade (Figura 13) nas quais é possível perceber a coexistência de uma película constituída por um composto de baixa densidade eletrônica, o qual poderia ser fitantriol. O fitantriol forma fases cúbicas bicontínuas reversas em excesso de água, cujos canais aquosos têm dimensão nanométrica. No entanto, essa autoassociação não é possível se a água for removida, pois são fases liotrópicas. Como as amostras são mantidas sob pressão reduzida durante as medidas de microscopia eletrônica de transmissão, a água é perdida e não é possível visualizar a estruturação do cristal líquido. Com isso, seria esperado visualizar o fitantriol remanescente, que é um líquido viscoso quando está puro, como uma película homogênea. A coexistência do fitantriol e das nanopartículas nas mesmas regiões das grades sugere uma interação entre ambos.

A partir de um conjunto de imagens de cada amostra, determinou-se a distribuição de diâmetro das nanopartículas, as quais foram escolhidas aleatoriamente. As distribuições de diâmetro (Figura 13) resultaram em valores médios entre 2 e 4 nm para todas as amostras (Tabela IV). Trata-se de diâmetro bastante reduzido, em particular para nanopartículas inorgânicas obtidas pelo método de precipitação.

Tabela IV. Diâmetros médios das nanopartículas de hidróxido de cério (III) presentes nas amostras da série LC-NP_x, obtidos por microscopia eletrônica de transmissão (*software*: ImageJ®).

Amostra	Número de partículas	Diâmetro médio (nm)
LC-NP _{2,5}	6990	3 ± 1
LC-NP _{5,0}	5037	2 ± 1
LC-NP _{7,5}	6841	2 ± 1
LC-NP _{10,0}	5148	4 ± 2

Logo após contato com a solução aquosa de NaOH no processo de síntese, a mistura de precursor de cério e fitantriol adquiriu aspecto ainda mais viscoso. Esta foi considerada uma evidência de autoassociação do fitantriol em água, pois se sabe que esta mistura apresenta um comportamento rico em termos de fases líquido-cristalinas liotrópicas [32,33] e que estas fases geralmente são mais viscosas que o líquido puro. Medidas de SAXS com fonte de luz síncrotron foram realizadas à temperatura ambiente para determinar a estrutura de fase dos sistemas.

Observou-se a presença de picos em todas as curvas (Figura 14). Além disso, as curvas de SAXS das amostras da série LC-NP_x apresentaram aumento da intensidade para q tendendo a zero, o que não ocorreu para a amostra LC. Esse resultado é compatível com a existência de nanopartículas na série LC-NP_x.

Cada pico nas curvas de SAXS é associado a um dos planos cristalográficos da cela unitária responsáveis pela difração de raios X. Para mesofases liotrópicas, a análise das posições relativas (q_n/q_1) dos picos de Bragg permite determinar a simetria cristalográfica. As amostras da série LC-NP_x e a amostra LC apresentaram picos de difração com posições relativas de $\sqrt{2}$, $\sqrt{3}$, $\sqrt{4}$, $\sqrt{6}$, $\sqrt{8}$ e $\sqrt{9}$, confirmando tratar-se de fase líquido-cristalina cúbica para todos os casos (Figura 14). Os picos associados aos índices de Miller (hkl) foram indexados respectivamente como (110), (111), (200), (211), (220), (221) e (300), os quais correspondem à fase cúbica bicontínua reversa (Q_{II}) com grupo espacial Pn3m.

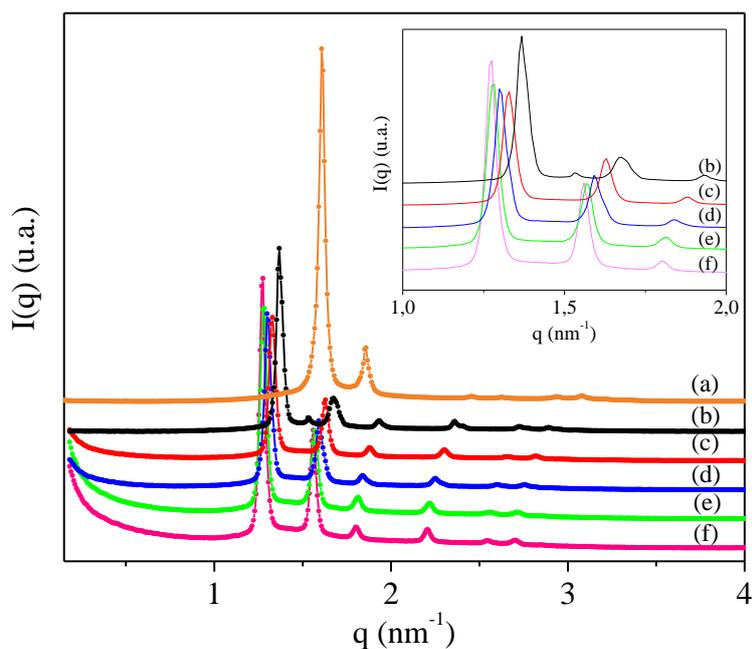


Figura 14. Curvas de espalhamento de raios X a baixos ângulos das amostras (a) fitantriol em água, (b) LC, (c) LC-NP_{2,5}, (d) LC-NP_{5,0}, (e) LC-NP_{7,5}, (f) LC-NP_{10,0} (temperatura ambiente). No detalhe, está evidenciada a região de 1 a 2 nm⁻¹ para a série LC-NP_x.

Os valores de q_n/q_1 estão relacionados aos parâmetros da cela unitária e ao espaçamento interplanar (d_{hkl}) para cada tipo de mesofase. O vetor de espalhamento q_{hkl} relaciona-se com a distância interplanar (Equação 4) como:

$$d_{hkl} = \frac{2\pi}{q_{hkl}} \quad (4)$$

Portanto, a distância interplanar (d_{hkl}) pode ser calculada a partir do valor de q máximo de cada pico. Sabendo-se o valor de d_{hkl} e os índices de Miller do plano cristalográfico para cada pico, é possível calcular os parâmetros da cela unitária. Como fases cúbicas apresentam parâmetros de cela unitária com o mesmo valor (a), pode-se aplicar a Equação 5.

$$\frac{1}{d_{hkl}} = \frac{\sqrt{h^2+k^2+l^2}}{a} \quad (5)$$

A partir da equação acima, fica evidente que a pode ser obtido a partir do inverso do coeficiente angular de d_{hkl}^{-1} em função de $\sqrt{h^2+k^2+l^2}$. Os valores de a neste estudo foram iguais a 6,5 nm (LC), 6,7 nm (LC-NP_{2,5}), 6,8 nm (LC-NP_{5,0}), 6,9 nm (LC-NP_{7,5}) e 7,0 nm (LC-NP_{10,0}). Confrontando-se os valores de LC em relação àqueles obtidos para a série LC-NPx, pode-se concluir que as nanopartículas de Ce(OH)₃ causam uma pequena expansão da rede do cristal líquido.

Seria esperado aumento da curvatura negativa das bicamadas se as nanopartículas estivessem localizadas entre as cadeias hidrofóbicas de fitantriol. Como consequência, o cristal líquido deveria sofrer transições para fases menos hidratadas. No entanto, o grupo espacial Pn3m foi mantido, com expansão da rede do cristal líquido, sinalizando aumento da hidratação do sistema. Dessa forma, levantou-se a hipótese de que tais resultados seriam decorrentes da localização das nanopartículas nos canais aquosos. O diâmetro do canal de água em uma fase cúbica bicontínua reversa (d_w) pode ser calculado a partir do seu raio (r_w) estimado (Equação 6) com base no parâmetro de rede (a) de superfícies mínimas, conforme descrito por Briggs e colaboradores [110]:

$$\begin{aligned} r_w \text{ para Ia3d} &= 0,248 a - l \\ r_w \text{ para Pn3m} &= 0,391 a - l \\ r_w \text{ para Im3m} &= 0,305 a - l \end{aligned} \quad (6)$$

onde l é o comprimento da monocamada. Este valor corresponde a 1,42 nm para o fitantriol [41]. O valor de diâmetro, calculado a partir de r_w , foi igual a 2,2 nm (LC), 2,4 nm (LC-NP_{2,5}), 2,5 nm (LC-NP_{5,0}), 2,5 nm (LC-NP_{7,5}) e 2,6 nm (LC-NP_{10,0}). Os valores de diâmetro dos canais aquosos são da mesma ordem de grandeza dos tamanhos médios

encontrados para as nanopartículas por microscopia eletrônica de transmissão (2-4 nm, conforme discutido anteriormente). Com isso, pode-se considerar plausível a hipótese de localização das nanopartículas nos canais aquosos dos cristais líquidos. Medidas de criomicroscopia eletrônica de transmissão poderiam confirmar efetivamente essa hipótese e sua realização é uma perspectiva para este estudo.

Fitantriol puro foi colocado em contato com água, visando a estruturação do material, e analisado por SAXS, para fins de comparação. Observou-se picos com posições relativas $\sqrt{6}$, $\sqrt{8}$, $\sqrt{14}$, $\sqrt{16}$, $\sqrt{20}$ e $\sqrt{22}$, correspondentes aos planos de difração (211), (220), (321), (400), (420) e (332) tipicamente associados à fase cúbica bicontínua reversa do tipo Ia3d (Figura 14). Comparando-se este resultado com aquele obtido para a amostra LC, conclui-se que o processo de lavagem na síntese teve influência na fase adotada pelo sistema. O valor de diâmetro a partir de r_w para a fase Ia3d (fitantriol+água) foi igual a 1,9 nm, o qual é próximo ao valor obtido para a amostra LC. A fase cubica Pn3m apresenta valor de curvatura menor que aquela da Ia3d [41]. Assim sendo, infere-se que o contato com $\text{NaOH}_{(aq)}$ causou aumento da hidratação do cristal líquido e indução de transição de fase. É importante registrar que as fases Ia3d e Pn3m estão muito próximas no diagrama de fase. Por isso, é razoável imaginar que mudanças sutis no sistema (ou seja, baixíssimas concentrações de Na^+ interagindo com algumas das moléculas de fitantriol ou a remoção de impurezas pelo processo de lavagem) são suficientes para induzir essa transição de fase [111].

Com o intuito de quantificar a fração de Ce(III) presente nas nanopartículas aprisionadas no cristal líquido (série LC-NP_x), foram realizadas medidas de XANES das amostras e de padrões na borda L_3 do Ce (Figura 15). Os espectros de XANES medidos na borda L_3 do Ce dos padrões de Ce(III) e Ce(IV) foram medidos por transmissão, enquanto que os espectros das amostras LC-NP_x foram medidos por fluorescência. O espectro de XANES do padrão de Ce(IV) é caracterizado pela presença de um dubleto após a borda de absorção (Figura 15b). Por outro lado, o padrão de Ce(III) apresenta um único máximo de intensidade na região em torno da borda de absorção (Figura 15a). Dessa forma, fica evidente que todas as amostras sintetizadas (Figura 15c-f) apresentam majoritariamente o estado de oxidação Ce(III), conforme esperado.

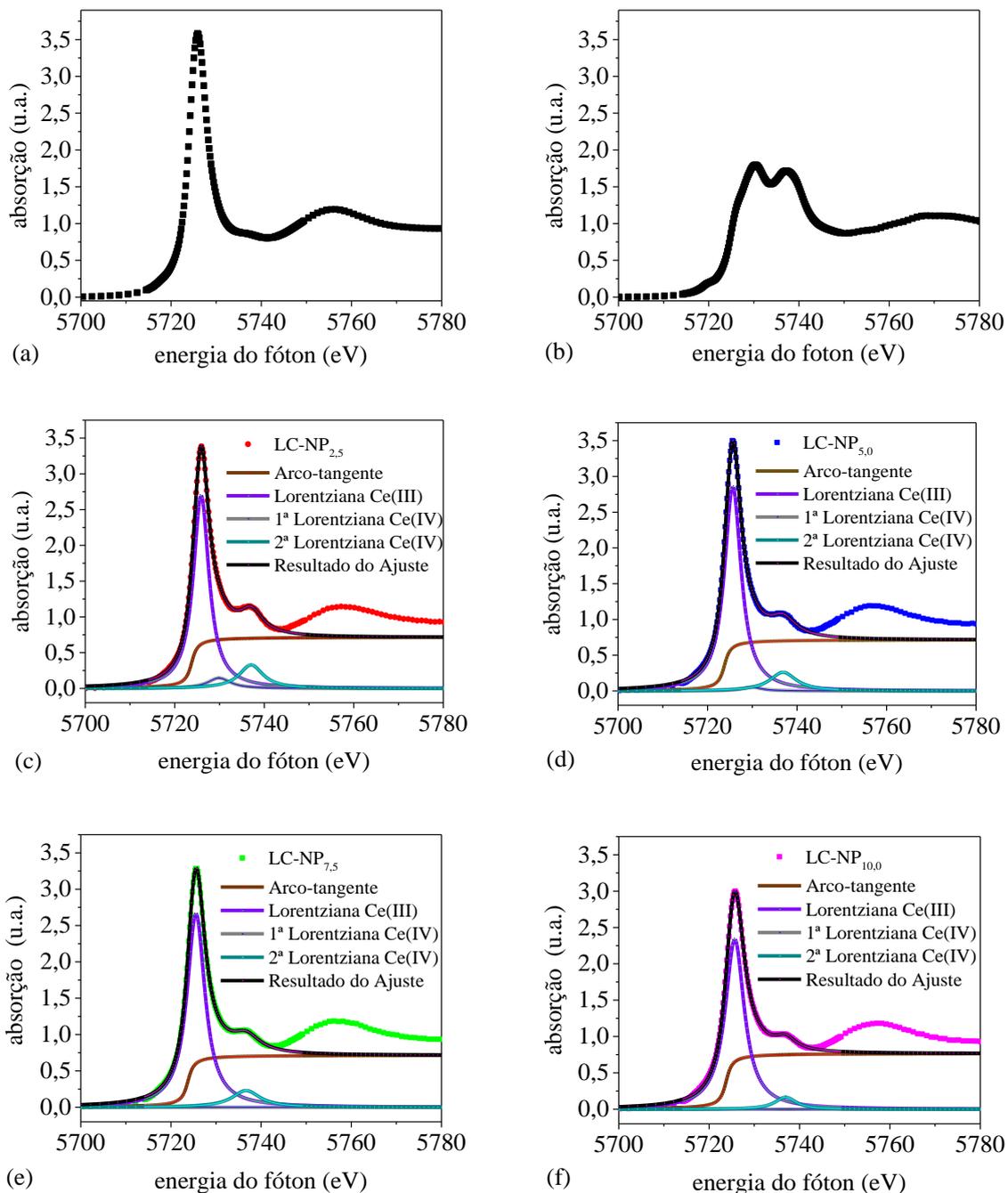


Figura 15. Espectros de XANES na borda L_3 do cério dos padrões (a) $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$, (b) CeO_2 , e das amostras (c) LC-NP_{2,5}, (d) LC-NP_{5,0}, (e) LC-NP_{7,5}, e (f) LC-NP_{10,0} sem tratamento (círculos fechados) e seu respectivo ajuste (linhas).

Com o intuito de quantificar o percentual de Ce(III), foi realizado ajuste matemático da região de XANES, o qual apresentou alta concordância com os dados experimentais, como evidenciado pelos valores de $R^2 > 0,999$. O ajuste da região de XANES permitiu quantificar o

percentual de Ce(III) nas nanopartículas, que correspondeu a 78 % (LC-NP_{2,5}), 86 % (LC-NP_{5,0}), 88 % (LC-NP_{7,5}) e 93 % (LC-NP_{10,0}).

O diâmetro médio das nanopartículas de Ce(OH)₃ manteve-se semelhante para todas as amostras da série LC-NP_x. Portanto, seria esperada maior concentração de nanopartículas nas amostras com o aumento da concentração de precursor de cério na síntese. Para verificar essa hipótese, as amostras foram analisadas por termogravimetria sob atmosfera oxidante. A princípio, seria possível determinar a concentração em massa de nanopartículas nas amostras a partir do resíduo cerâmico não-volatilizado a altas temperaturas por TGA [112]. No entanto, o valor teórico da massa desse resíduo (ou seja, que não considera perdas na lavagem) para as amostras do presente trabalho encontra-se próximo ao limite de quantificação do equipamento. De fato, a massa de resíduo cerâmico remanescente em temperaturas superiores a 400 °C (o qual, devido à atmosfera oxidante, provavelmente é CeO₂) [113] é inferior a aproximadamente 3 % (em relação à massa de fitantriol sem água) para todas as amostras. A partir das curvas de perda de massa em função da temperatura (Figura 16a), observa-se a perda inicial do excesso de água nas amostras a temperaturas menores que 100 °C. Entre 100 °C e cerca de 175 °C ocorre perda de massa que poderia ser associada à água confinada nos canais aquosos do cristal líquido. A perda de massa mais preponderante dos termogramas, até 300 °C, deve-se à degradação térmica do fitantriol.

Apesar de não ter sido possível determinar com confiabilidade a massa de nanopartículas inorgânicas na amostra a partir do resíduo cerâmico, fica evidente pelo resultado da primeira derivada dos termogramas (Figura 16b) que a concentração de precursor na síntese está relacionada a mudanças na estabilidade térmica do fitantriol em atmosfera oxidante. O evento térmico que corresponde à taxa máxima de perda de massa do fitantriol teve sua temperatura deslocada para menores valores de forma proporcional à concentração de precursor de cério utilizado na síntese, variando de 293 °C (fitantriol puro e amostra LC) a 263 °C (LC-NP_{10,0}). Considerando-se que as nanopartículas são constituídas por Ce(OH)₃, a atmosfera oxidante empregada no decorrer das medidas pode ter levado à sua conversão para CeO₂. Este composto, a altas temperaturas, catalisa reações de oxidação de compostos orgânicos na sua superfície [114]. A degradação térmica do fitantriol em atmosfera oxidante está necessariamente vinculada à sua oxidação a compostos voláteis (CO₂ e H₂O). Agentes capazes de catalisar a oxidação do fitantriol, tais como nanopartículas de CeO₂, permitiriam sua degradação em menores temperaturas. Sabe-se que processos de sinterização de CeO₂ (que é provavelmente formado no decorrer da medida) tipicamente ocorrem apenas em temperaturas superiores a 800 °C [115, 116]. Dessa forma, pode-se afirmar que o aumento no

número de nanopartículas nas amostras tem como consequência uma maior área de superfície total disponível para oxidação do fitantriol. Portanto, a redução sistemática da temperatura referente à taxa máxima de perda de massa de fitantriol deve estar correlacionada com o maior número de nanopartículas presentes na amostra. Este, por sua vez, está diretamente ligado à concentração de precursor empregado na síntese.

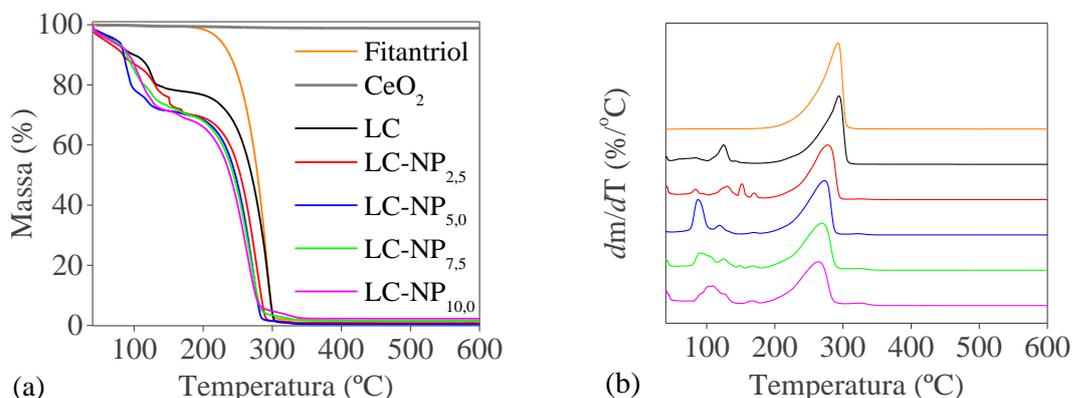


Figura 16. Curvas termogravimétricas de (a) percentual de massa na amostra e (b) sua primeira derivada (dm/dT) em função da temperatura, referentes a fitantriol, padrão de óxido de cério, e às amostras LC, LC-NP_{2,5}, LC-NP_{5,0}, LC-NP_{7,5} e LC-NP_{10,0} (atmosfera: ar).

O aumento da concentração de partículas nas amostras como função da maior concentração de precursor na síntese é corroborada pelos resultados apresentados no Anexo II desta dissertação. Foi realizada tentativa de extração das nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_3$, por meio de dissolução das amostras em etanol seguida de precipitação. Para uma mesma massa aproximada de cristal líquido, obteve-se uma quantidade crescente de pó na ordem $\text{LC-NP}_{2,5} < \text{LC-NP}_{5,0} < \text{LC-NP}_{7,5} < \text{LC-NP}_{10,0}$. Embora medidas de EDS tenham confirmado que os pós obtidos são constituídos essencialmente pelo elemento cério (Figura AII.2), não foi possível realizar inferências sobre o $\text{Ce}(\text{OH})_3$ a partir desses pós. Espectros de XANES indicaram razão Ce(III)/Ce(IV) no material extraído (Figura AII.3) mais baixa que aquela observada para as amostras em cristal líquido (Figura 15). Além disso, os difratogramas dos pós (Figura AII.4) são compatíveis com o padrão observado para CeO_2 . Portanto, a extração das nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ a partir dos cristais líquidos levou à sua oxidação. Esse conjunto de resultados demonstra o papel fundamental desempenhado pela estrutura líquido-cristalina como estabilizante do estado reduzido do cério nas nanopartículas. É importante ressaltar a importância estratégica dessa estabilização no que tange à potencial aplicação dos sistemas para síntese *on-demand* de $\text{CeO}_{(2-x)}$ no organismo. O $\text{Ce}(\text{OH})_3$, pelo seu caráter redutor, possui menor potencial de dano oxidativo a tecidos biológicos saudáveis que o $\text{CeO}_{(2-x)}$, porém as

condições fisiológicas (meio aquoso, pH 5-7) favorecem sua completa dissolução a $Ce^{3+}_{(aq)}$ [63]. Ao estabilizar a forma $Ce(OH)_3$ nanoparticulada no cristal líquido, espera-se tornar viável a utilização desses sistemas no sentido de que o cério fique retido na forma reduzida $Ce(OH)_3$ em condições fisiológicas e seja liberado na sua forma ativa $CeO_{(2-x)}$ em resposta a estresse oxidativo, em um mecanismo que poderia se assemelhar, no sentido mimético funcional, a um par pró-enzima/enzima.

5.2. SÍNTESE *ON-DEMAND* DE NANOPARTÍCULAS DE $CeO_{(2-x)}$ COMO MIMÉTICOS FUNCIONAIS DE SUPERÓXIDO DISMUTASE

Sabe-se que os níveis de H_2O_2 situam-se na faixa de 0,25 mM a 30 mM durante a resposta inflamatória de tecidos, enquanto que não costumam ultrapassar 5 μ M em tecidos saudáveis [98-101]. Além disso, esse composto é descrito na literatura como sendo capaz de induzir a formação de CeO_2 a partir de sais de Ce(III) [102]. Portanto, a prova de conceito quanto à responsividade dos sistemas contendo nanopartículas de $Ce(OH)_3$ frente a ambientes oxidantes foi buscada empregando-se H_2O_2 como gatilho. Com o intuito de simular simplificadaamente as condições encontradas em regiões de inflamação (meio ácido e sujeito a estresse oxidativo), propôs-se realizar os ensaios de responsividade das amostras da série LC-NPx em meio tamponado ácido (pH 5,5) [117]. Para fins de comparação, paralelamente foram realizados ensaios em tampão neutro (pH 7,4), compatível com a condição fisiológica do sangue em regiões saudáveis do organismo.

A adição de H_2O_2 à série LC-NPx (2,0 g) em 15 mL de meio tamponado (pH 5,5 e 7,4) resultou em mudança rapidamente identificável na cor em determinadas regiões mais externas das amostras, que passou do transparente amarelado para o vermelho-alaranjado. Sabe-se que a cor vermelho-alaranjada pode ser indicativo da formação de Ce(IV) complexado a álcoois [118] ou espécies reativas de oxigênio [119]. As amostras apresentaram-se homogêneas quanto à cor após transcorridas 12 h (Figura 17). Provavelmente, esse tempo prolongado está relacionado à difusibilidade do H_2O_2 do meio até o interior do cristal líquido, combinado com a acessibilidade das moléculas de H_2O_2 à superfície das nanopartículas recobertas por fitantriol. A amostra LC foi avaliada da mesma forma para fins de comparação. Mesmo em contato com H_2O_2 , a cor da amostra LC não sofreu alteração em relação à cor inicial. Com isso, fica evidente que a mudança de cor na série LC-NPx decorreu da oxidação do $Ce(OH)_3$ e provável complexação com espécies contendo oxigênio.

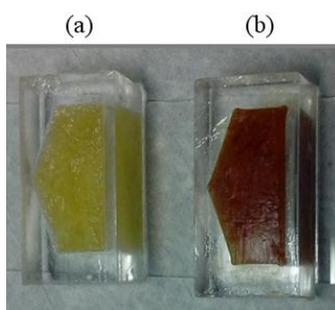


Figura 17. Fotografia da amostra LC-NP_{5,0} mantida (a) em tampão acetato pH 5,5 (0,1 M) ou (b) em tampão acetato pH 5,5 (0,1 M) contendo 120 mM de H₂O₂ (imagens obtidas após 12 h de contato).

A exposição das amostras da série LC-NP_x a meios tamponados com pH 5,5 e 7,4, contendo ou não o gatilho, foi monitorada por XANES no que se refere à indução de mudança no estado de oxidação do cério (Figuras 18 e 19). Após quantificação (ajustes não mostrados para melhor visualização das mudanças), é observada apenas leve diminuição do percentual de Ce(III) nas nanopartículas devido ao contato com os tampões (Tabela V). Portanto, os tampões não foram responsáveis por extensiva oxidação do Ce(OH)₃.

Tabela V. Percentual de Ce(III) nas amostras da série LC-NP_x conforme preparadas e após contato com meio tamponado na ausência e presença de H₂O₂ (120 mM) em tempos pré-determinados.

pH do tampão	Tempo de contato com H ₂ O ₂	Percentual de Ce(III) nas nanopartículas			
		LC-NP _{2,5}	LC-NP _{5,0}	LC-NP _{7,5}	LC-NP _{10,0}
-	-	78	86	88	93
5,5	0 h	68	67	65	68
	3 h	13	18	54	28
	12 h	5	2	10	8
7,4	0 h	-	75	-	-
	12 h	0	12	20	13

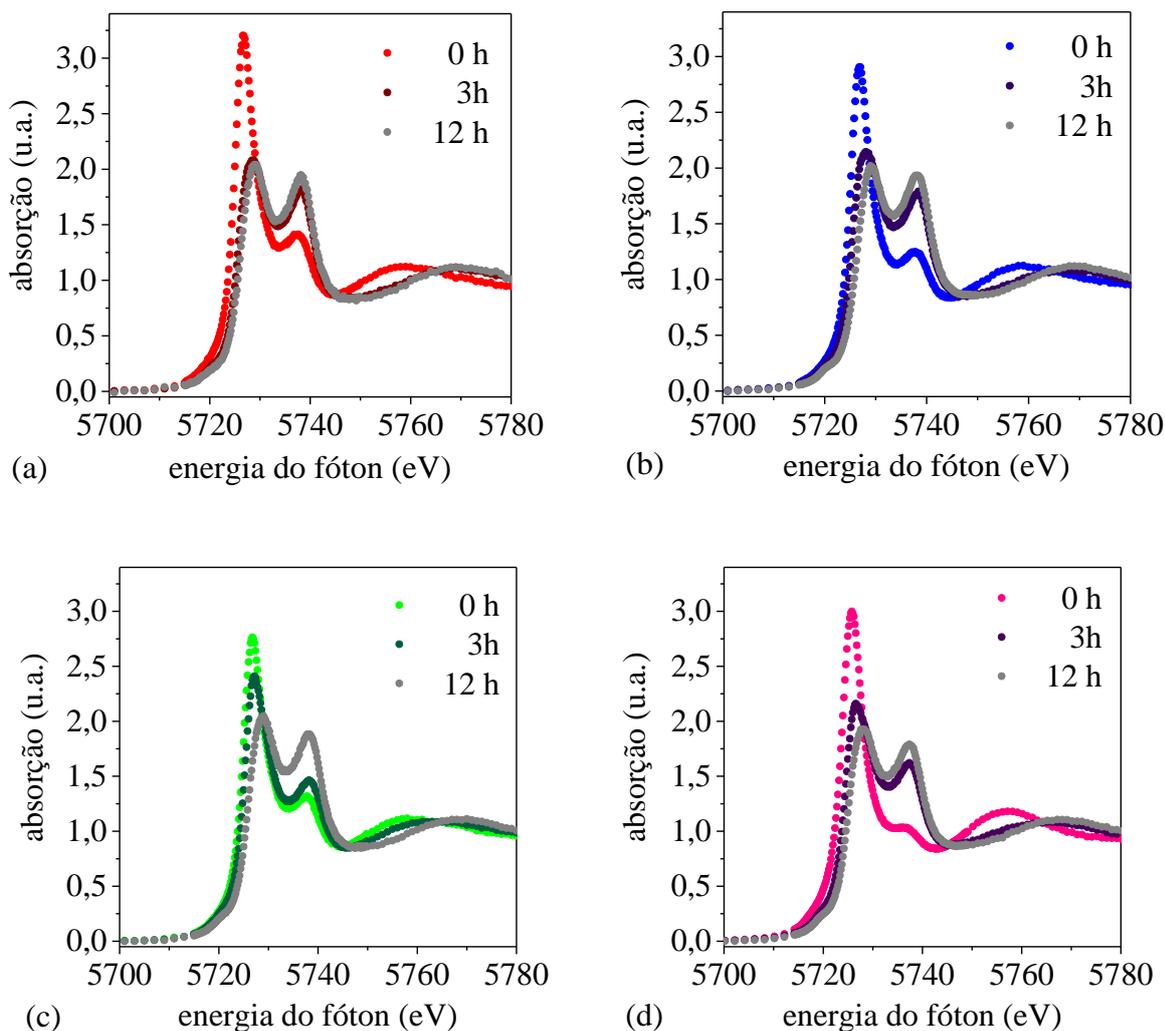


Figura 18. Espectros de XANES medidos na borda L_3 do Ce para as amostras em meio tamponado pH 5,5 (0,1 M): (a) LC-NP_{2,5}, (b) LC-NP_{5,0}, (c) LC-NP_{7,5} e (d) LC-NP_{10,0} após 3 e 12 h de contato com 120 mM de H_2O_2 . Os espectros das amostras em contato apenas com o tampão (0 h) também estão representados para fins de comparação.

A Figura 18 apresenta uma comparação do espectro de XANES na borda L_3 do Ce para diferentes tempos de contato de uma dada amostra com H_2O_2 em tampão pH 5,5. Observa-se claramente a mudança da região de XANES correspondente à conversão de Ce(III) para Ce(IV) em todas as amostras devido à ação do gatilho, porém com diferentes cinéticas de oxidação. Também é observado um deslocamento na energia da borda de absorção para valores maiores, o qual é característico do processo de oxidação. Ao final do processo de oxidação, após 12 h, é observado um percentual de Ce(III) de 5 % (LC-NP_{2,5}), 2 % (LC-NP_{5,0}), 10 % (LC-NP_{7,5}) e 8 % (LC-NP_{10,0}). Portanto, o gatilho foi efetivo em oxidar

o cério presente nas nanopartículas aprisionadas no cristal líquido em pH ácido. Os espectros de XANES na borda L_3 do Ce dos compostos CeO_2 e $Ce(OH)_4$, ambos com estado de oxidação Ce(IV), são bastante semelhantes na região da borda de absorção [120]. *A priori*, seria difícil distinguir ambos os compostos a partir unicamente das medidas de XANES. Porém, através da análise minuciosa da posição em energia das funções Lorentzianas associadas ao ajuste desses dois padrões e da posição em energia do máximo próximo de 5760 eV na região de EXAFS, pode-se observar um forte indicativo para a presença de CeO_2 em todas as amostras analisadas após oxidação por H_2O_2 .

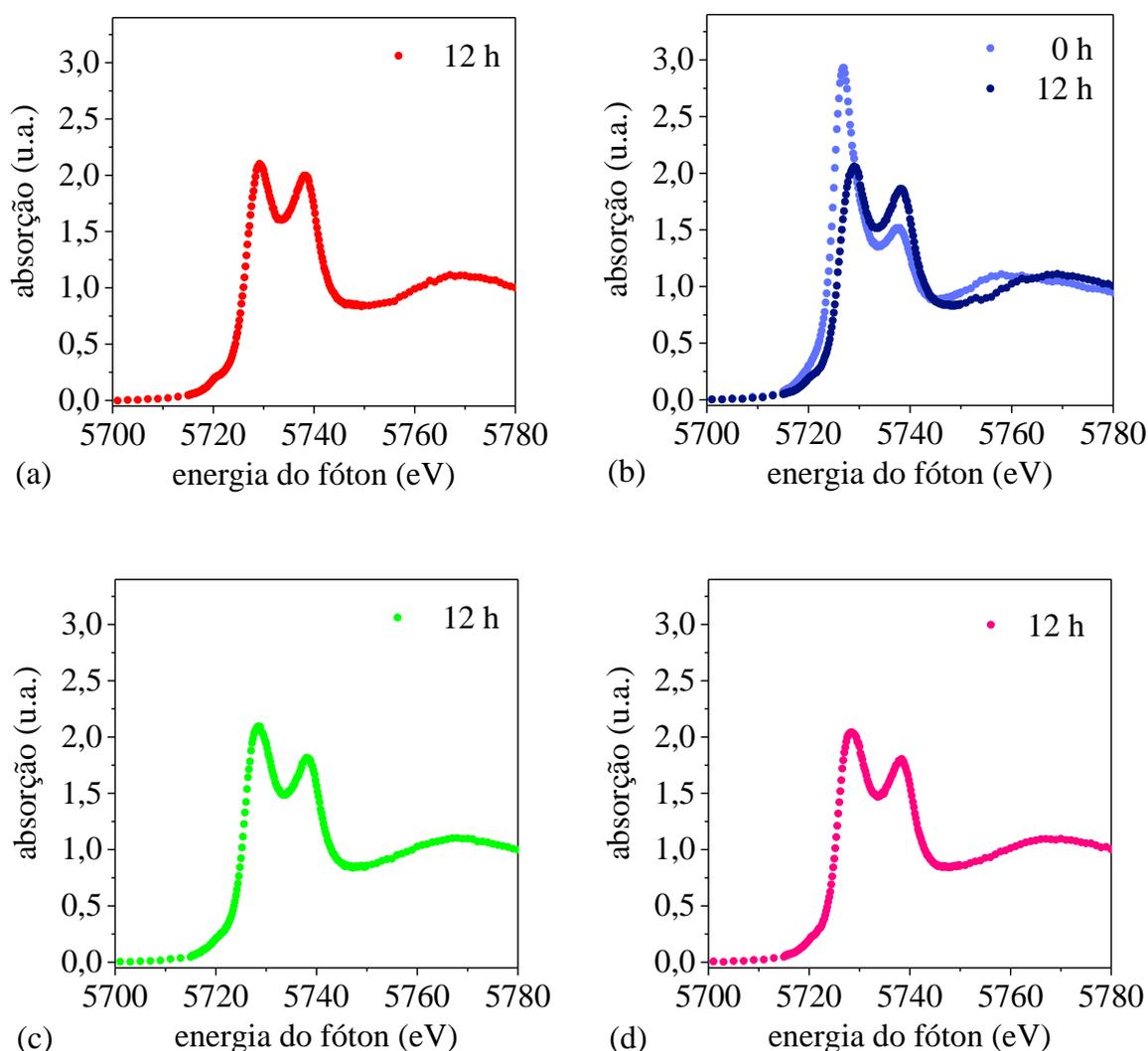


Figura 19. Espectro de XANES medidos na borda L_3 do cério para as amostras em meio tamponado pH 7,4 (0,1 M): (a) LC-NP_{2,5}, (b) LC-NP_{5,0}, (c) LC-NP_{7,5} e (d) LC-NP_{10,0} após 12 h de contato com 120 mM de H_2O_2 . O espectro da amostra LC-NP_{5,0} em contato apenas com o tampão (0 h) também está representado para fins de comparação.

Tal qual já observado para as medidas em meio ácido, observou-se também em meio neutro uma mudança na cor das amostras logo após adição de H_2O_2 . Da mesma forma, o aspecto foi bastante heterogêneo nas primeiras horas e medidas foram realizadas apenas após 12 h de contato com H_2O_2 . Nesse intervalo de tempo, observou-se espectros de XANES com percentual de Ce(III) correspondendo a 0 % (LC-NP_{2,5}), 12 % (LC-NP_{5,0}), 20 % (LC-NP_{7,5}) e 13 % (LC-NP_{10,0}). Portanto, em ambiente neutro, desde que o gatilho esteja presente, também ocorre a oxidação das nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ a $\text{CeO}_{(2-x)}$. Cabe salientar que a cinética de conversão de Ce(III) a Ce(IV) está relacionada à concentração de H_2O_2 [121]. Neste trabalho, empregou-se concentração superior (120 mM) àquela encontrada em meio biológico, como forma de otimizar os tempos de medida na linha de luz. É provável que a oxidação das nanopartículas *in vivo* em sítios inflamados a partir dos sistemas líquido-cristalinos venha a ocorrer de forma mais lenta devido à menor concentração de H_2O_2 neste meio.

Durante o processo de oxidação das nanopartículas de $\text{Ce}(\text{OH})_3$ a $\text{CeO}_{(2-x)}$ a partir dos cristais líquidos na presença dos gatilhos, foi possível observar não só a mudança de cor do cristal líquido, como também do meio externo, sugerindo a liberação das nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$ a partir do cristal líquido, conforme demonstrado na Figura 20. Após período suficientemente longo, ocorreu aglomeração das nanopartículas e precipitação.

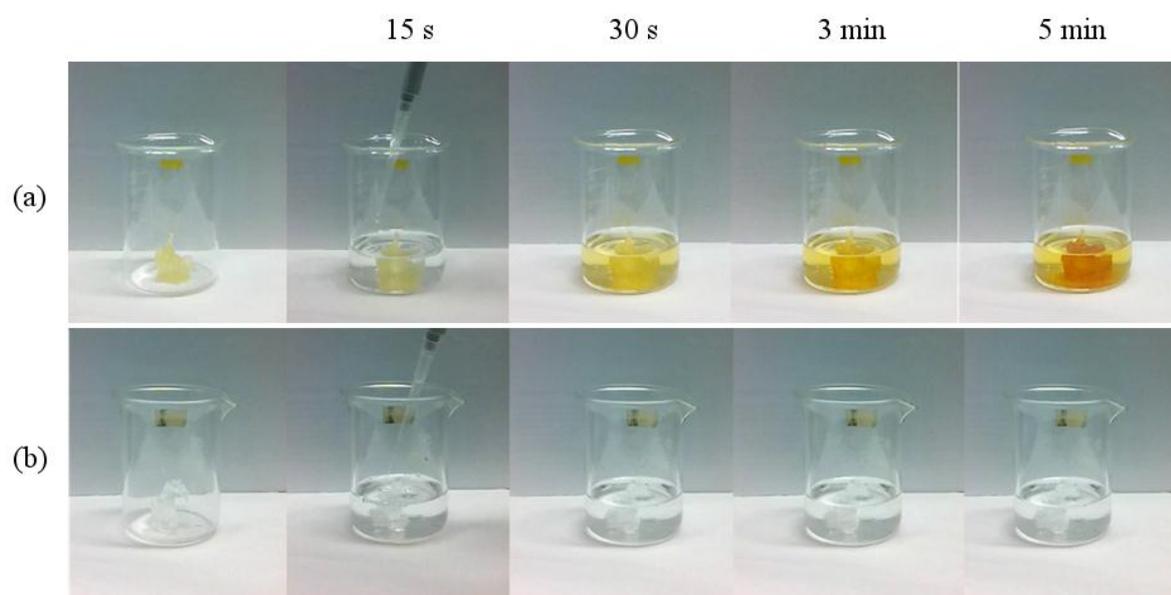


Figura 20. Imagens das amostras (a) LC-NP_{7,5} e (b) LC antes e após adição de H_2O_2 (120 mM) em tampão pH 5,5 (0,1 M) nos tempos 15 s, 30 s, 3 min e 5 min.

O material precipitado em tampão pH 5,5 contendo H_2O_2 (pois este é o pH aproximado do local de ação *in vivo* para o qual se planejou o sistema) foi analisado por TEM e XRD, sendo referenciado como ox-NP_{2,5}, ox-NP_{5,0}, ox-NP_{7,5} ou ox-NP_{10,0} conforme a amostra líquido-cristalina de origem (LC-NP_{2,5}, LC-NP_{5,0}, LC-NP_{7,5} ou LC-NP_{10,0}). A indexação das reflexões de Bragg nos difratogramas (Figura 21) é compatível com a presença de CeO_2 (Ce(IV)) (JCPDS 34-394), o qual apresenta a estrutura cristalina do tipo fluorita. Vale a pena ressaltar que a presença de vacâncias de oxigênio no óxido de cério não altera a simetria da estrutura cristalina desde que $x < 0,35$ em $CeO_{(2-x)}$. Assim, não se pode descartar a presença de $CeO_{(2-x)}$ ($x < 0,35$) a qual inclusive é bastante provável nesse caso. Considerando-se que um pequeno percentual de cério mantém-se reduzido como Ce(III), de acordo com os dados obtidos a partir dos espectros de XANES, trata-se de fato de $CeO_{(2-x)}$, onde $0 < x < 0,35$. As reflexões de Bragg nos perfis de XRD das amostras mostraram-se bastante alargadas, o que é indicativo de tamanho de cristalito bastante reduzido e/ou grande presença de defeitos tais como vacâncias de oxigênio na estrutura cristalina do óxido de cério.

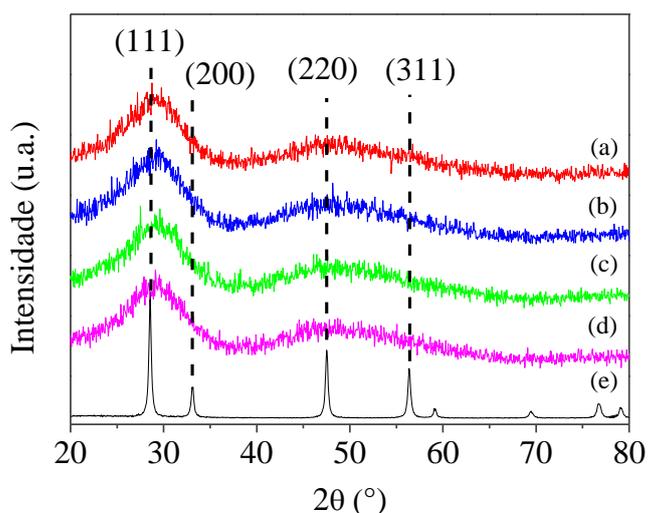


Figura 21. Difratogramas das amostras (a) ox-NP_{2,5}, (b) ox-NP_{5,0}, (c) ox-NP_{7,5}, (d) ox-NP_{10,0} e (e) padrão de CeO_2 .

A visualização das nanopartículas de $CeO_{(2-x)}$ precipitadas após reação entre $Ce(OH)_3$ e H_2O_2 em tampão pH 5,5 (série ox-NP_x) foi realizada por TEM. Para isso, as amostras foram dispersas em etanol e depositadas em grades de cobre. As imagens revelaram tratar-se de estruturas realmente muito pequenas (Figura 22), conforme já havia sido sugerido pelos resultados de XRD. A distribuição de tamanhos de partícula indicou diâmetros de cerca de 1,4 nm (Tabela VI). Isto é particularmente vantajoso por conferir menor toxicidade em

comparação com nanopartículas maiores [122]. Cabe ressaltar que as nanopartículas, nesse caso, foram medidas com o máximo de magnificação permitida no microscópio eletrônico de transmissão utilizado (500000 vezes). Ainda assim, devido ao tamanho reduzido das nanopartículas, em muitos casos foi difícil identificar de forma clara as nanopartículas existentes. Uma forma de solucionar essa questão seria utilizar um microscópio eletrônico de transmissão que opera em maior tensão, pois isso permitiria uma maior magnificação das imagens associada à maior resolução das mesmas (diminuição do comprimento de onda associado ao elétron). Porém, o uso de um microscópio operando em tensões maiores não é adequado para análise de materiais orgânicos (como é o caso do fitantriol que provavelmente reveste as nanopartículas de $CeO_{(2-x)}$), uma vez que o material pode ser facilmente degradado devido à transferência de energia do feixe de elétrons para a amostra.

Considerando-se que as nanopartículas de $Ce(OH)_3$ apresentaram diâmetros em torno de 2-4 nm, a formação de nanopartículas de $CeO_{(2-x)}$ de 1,4 nm é inicialmente contraintuitiva. Uma explicação possível reside nas diferenças dos grupos espaciais do $Ce(OH)_3$ ($P6_3/m$) e do $CeO_{(2-x)}$ ($Fm3m$) [60,123], que acarretariam em diferentes tamanhos de cela unitária. Pode ter ocorrido também a dissolução parcial da nanopartícula de $Ce(OH)_3$ em etapa prévia à cristalização na forma de $CeO_{(2-x)}$ durante o processo de oxidação ou ainda a fragmentação da partícula original, durante a oxidação. Embora este tenha sido um evento raro, algumas partículas maiores (na faixa aproximada de 8-15 nm) foram observadas nas amostras depositadas nas grades. O formato arredondado não permitiu afirmar tratar-se de aglomerados de partículas menores, mas sim de partículas bem definidas (dados não mostrados). É possível que uma pequena concentração de espécies de $Ce(IV)$ polimerizado tenha sido formada em função da natureza dos intermediários de reação envolvidos no processo de síntese [63].

Tabela VI. Diâmetros médios das nanopartículas de $CeO_{(2-x)}$, obtidos por microscopia eletrônica de transmissão (*software*: ImageJ®).

Amostra	Número de partículas	Média (nm)
ox-NP _{2,5}	1753	1,3 ± 0,2
ox-NP _{5,0}	1382	1,4 ± 0,3
ox-NP _{7,5}	1836	1,4 ± 0,4
ox-NP _{10,0}	1062	1,4 ± 0,3

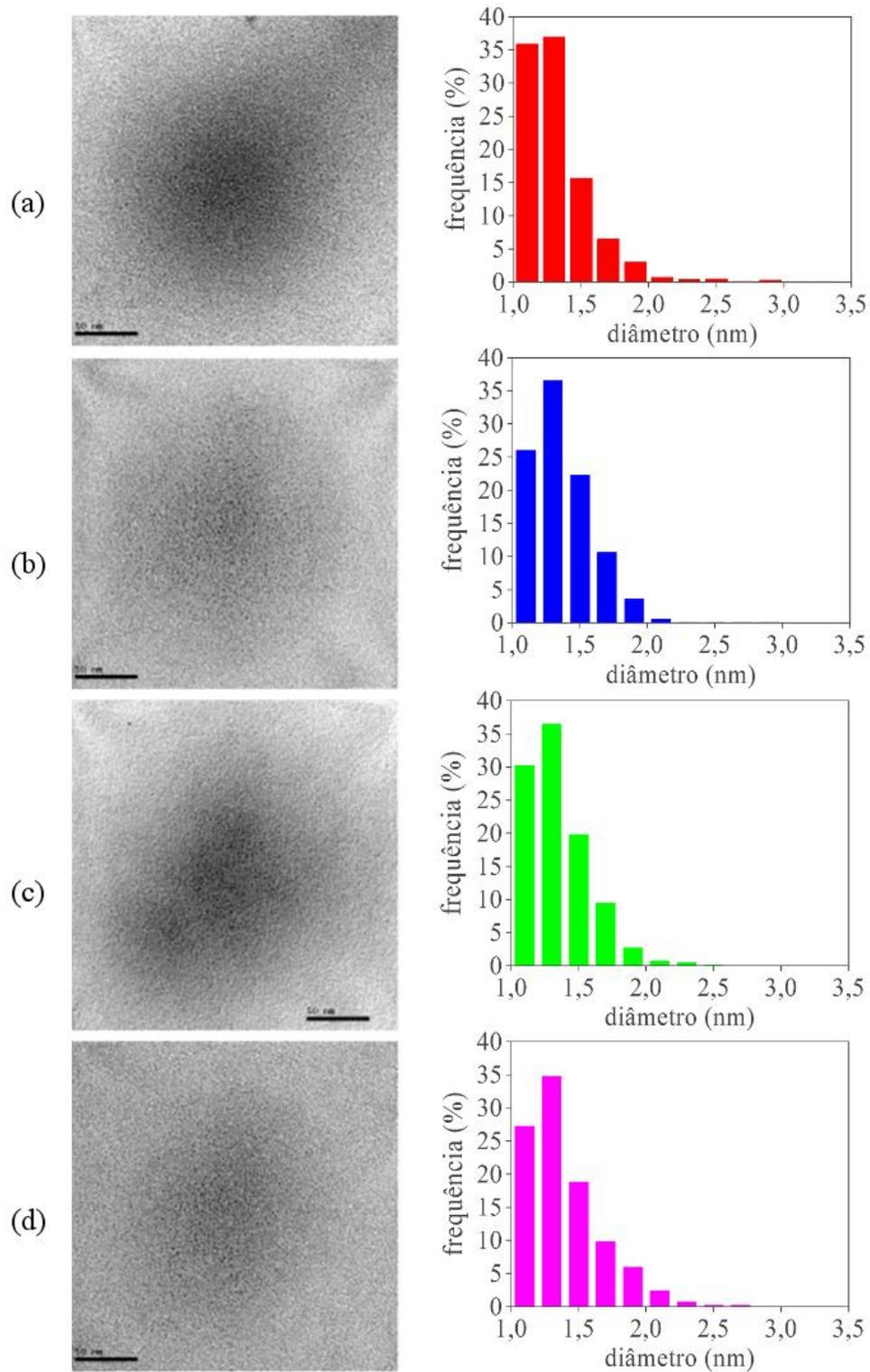


Figura 22. Imagens representativas de microscopia eletrônica de transmissão das amostras (a) ox-NP_{2,5}, (b) ox-NP_{5,0}, (c) ox-NP_{7,5}, (d) ox-NP_{10,0} (barra = 100 nm, magnificação de 300000 ×) e respectivas distribuições de diâmetro das nanopartículas (mínimo de 1000 partículas por amostra, *software*: ImageJ®).

Como mencionado anteriormente, a mudança de cor do meio aquoso em contato com as amostras da série LC-NP_x após adição de H₂O₂ (Figura 20) sugere liberação das nanopartículas de CeO_(2-x) a partir dos cristais líquidos. Portanto, este meio foi monitorado por espectroscopia na região do ultravioleta-visível em tempos pré-determinados na ausência e presença do gatilho (120 mM de H₂O₂). Sabe-se que Ce(III) apresenta bandas de absorção de em valores próximos a 230-260 nm. [81] Como esta banda se sobrepõe àquela do H₂O₂ (240 nm) [124], apenas as bandas de Ce(IV) foram consideradas nesta investigação quando H₂O₂ foi adicionado ao meio. Cabe mencionar que os valores de corte dos tampões (*cut off*), nos quais passa a ocorrer absorção dos mesmos, correspondem a 230 nm (tampão ácido acético/acetato de sódio) e 205 nm (tampão Tris·HCl/Tris).

Após 10 min de contato das amostras de cristal líquido (LC-NP_x) com H₂O₂ em meios tamponados com pH 5,5 (Figura 23) e pH 7,4 (Figura 24) foi possível observar o surgimento de banda larga em 380 nm. O surgimento dessa banda não ocorreu nos espectros da amostra LC ao longo das 24 h desse estudo, evidenciando que o resultado não decorre de influência da matriz de cristal líquido. O diâmetro das nanopartículas de CeO_(2-x) é suficientemente pequeno no início do experimento a ponto de não causar interferências devido ao espalhamento de luz na faixa de comprimentos de onda do estudo, sendo a absorção o principal fenômeno associado aos resultados apresentados. O aumento na intensidade da banda em 380 nm (associada à presença de Ce(IV)) corrobora que houve síntese *in situ* e liberação de CeO_(2-x) para o meio aquoso externo mesmo após curto período de exposição das amostras a H₂O₂. Após 1 h, em ambos os valores de pH, ocorreu deslocamento batocrômico do máximo de absorção para 400 nm e redução da absorbância dessa banda em relação àquela observada após 10 min. Esse comportamento pode ser indicativo do início de um processo de agregação das partículas. Em pH ácido e tempos maiores (12 e 24 h), houve redução ainda mais acentuada da intensidade de absorção dessa banda, provavelmente decorrente da precipitação das nanopartículas após aglomeração. Paralelamente, observou-se aumento na intensidade da banda em 300 nm, com maior destaque nos espectros das amostras LC-NP_{7,5} e LC-NP_{10,0}.

Em pH neutro e tempos maiores (12 e 24 h), a intensidade da banda de Ce(IV) em 380 nm não seguiu um padrão bem definido, sendo variável conforme a amostra medida. Por sua vez, observou-se o surgimento da banda de Ce(IV) em 300 nm em todos os casos. Cabe salientar que o comportamento de aglomeração e precipitação ocorrido neste estudo não deverá ser necessariamente observado da mesma forma *in vivo*, pois as condições empregadas *in vitro* foram comparativamente mais drásticas e não havia presença de proteínas séricas que pudessem revestir as nanopartículas.

Está bem estabelecido que, para ceria, os máximos de absorção nos comprimentos de onda na região ultravioleta-visível estão relacionados a processos de transferência de carga e transição interbanda relacionados aos diferentes estados de oxidação do elemento cerio [81]. Porém, é importante mencionar um estudo recente de Damatov e Mayer [119], que elucida os fenômenos associados ao surgimento dessas bandas na presença de H_2O_2 . A absorção em 280-300 nm é decorrente da oxidação do cério do estado Ce(III) para Ce(IV). Por sua vez, de acordo com os autores, a banda em 380 nm é originada por um processo diferente daquele relacionado à banda em 280-300 nm. Sua ocorrência deve-se à ligação de espécie reativa de oxigênio (como peróxido ou hidróperóxido) no Ce(IV) da superfície das nanopartículas. A ligação dessas espécies ao cério é responsável pela cor alaranjada observada nas amostras após adição de H_2O_2 (Figura 20). O fenômeno de absorção, neste caso, decorre de banda de transferência de carga ligante-para-metal.

Oleato de sódio foi empregado como revestimento das nanopartículas no estudo mencionado [119] e os autores verificaram que a formação das espécies reativas de oxigênio na superfície do ceria foi concomitante à liberação de oleato para o meio externo. A ligação competitiva entre espécies reativas de oxigênio e fitantriol na superfície das nanopartículas poderia ser sugerida também para o presente trabalho, pela semelhança entre as duas moléculas orgânicas. No entanto, mais investigações devem ser realizadas para confirmar essa hipótese.

No presente estudo, a ocorrência da banda em 300 nm e concomitante diminuição da intensidade de absorção em 380 nm (Figuras 23 e 24) após tempos prolongados (12 e 24 h) sinaliza a presença de $\text{CeO}_{(2-x)}$ disperso no meio aquoso e sugere a redução na concentração de espécies reativas de oxigênio ligadas à superfície das nanopartículas. Essas espécies reativas de oxigênio podem ter sido convertidas a outras espécies mais estáveis em tempos prolongados, desorvendo-se da fração de nanopartículas que permanece em solução.

O conjunto de dados obtidos a partir das medidas de absorção no UV-visível, juntamente com os resultados de XRD, permitem afirmar que nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$ foram sintetizadas na presença de H_2O_2 como gatilho, sendo liberadas para o meio aquoso, com posterior agregação e precipitação. Considerando-se que o cristal líquido permaneceu avermelhado ao longo de todo o experimento de liberação, pode-se concluir que parte das nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$ manteve-se aprisionada no cristal líquido ao invés de difundir para o meio externo. Além disso, a cinética de reação e de liberação das nanopartículas é influenciada pelo pH do meio.

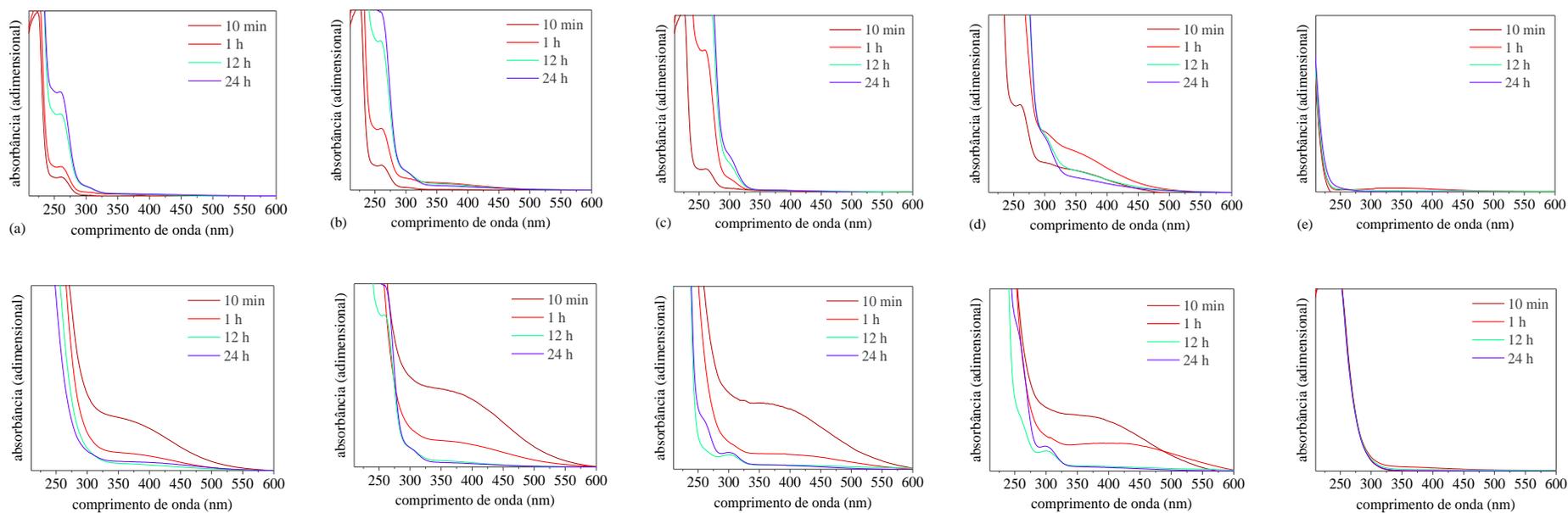


Figura 23. Espectros de absorção na região do ultravioleta-visível do meio aquoso tamponado (pH 5,5) após 10 min, 1 h, 12 h e 24 h em contato com as amostras (a) LC-NP_{2,5}, (b) LC-NP_{5,0}, (c) LC-NP_{7,5}, (d) LC-NP_{10,0} e (e) LC. Os espectros superiores foram obtidos após contato com o tampão, enquanto que os espectros inferiores respectivos foram obtidos após contato com tampão contendo 120 mM de H₂O₂.

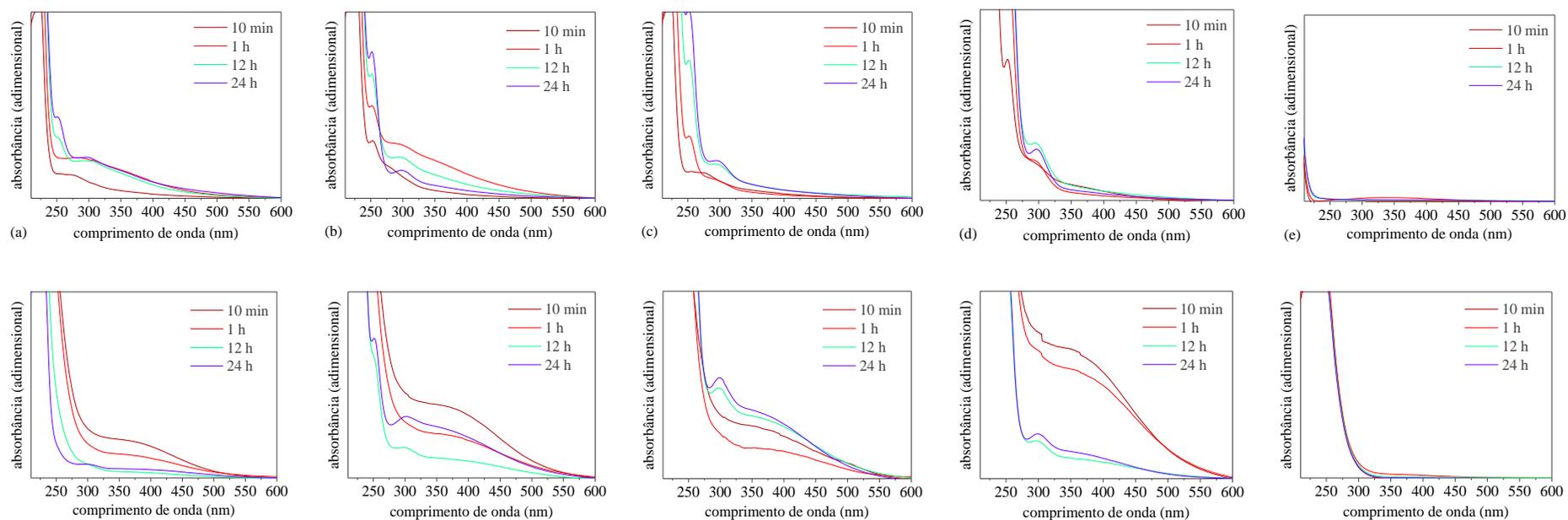


Figura 24. Espectros de absorção na região do ultravioleta-visível do meio aquoso tamponado (pH 7,4) após 10 min, 1 h, 12 h e 24 h em contato com as amostras (a) LC-NP_{2,5}, (b) LC-NP_{5,0}, (c) LC-NP_{7,5}, (d) LC-NP_{10,0} e (e) LC. Os espectros superiores foram obtidos após contato com o tampão, enquanto que os espectros inferiores respectivos foram obtidos após contato com tampão contendo 120 mM de H₂O₂.

Para fins de comparação, os mesmos tempos de contato das amostras com tampão foram avaliados na ausência do gatilho. Em pH ácido (Figura 23), uma banda de absorção de intensidade moderada foi observada em 260 nm, a qual está associada a mecanismo de transferência de carga do tipo $O^{2-} \rightarrow Ce^{3+}$ em ceria. É provável que, no presente estudo, esta banda esteja relacionada a um fenômeno envolvendo elétrons do Ce(III) oriundo de nanopartículas de $Ce(OH)_3$. Para cada amostra em particular, observou-se aumento na intensidade dessa banda ao longo do tempo. Comparando-se os espectros das diferentes amostras em cada tempo determinado, observa-se que o aumento da concentração inicial de nanopartículas de $Ce(OH)_3$ no cristal líquido (de LC-NP_{2,5} a LC-NP_{10,0}) é proporcional à intensidade da banda em 260 nm. Uma banda menos intensa em 300 nm também foi identificada nos espectros de todas as amostras, estando sobreposta a outra banda alargada com máximo em cerca de 350 nm. A intensidade dessas bandas sobrepostas, que provavelmente estão relacionadas à liberação de espécie contendo Ce(IV) para o meio aquoso, atinge seu máximo em 1 h, sofrendo redução de intensidade em tempos mais prolongados. Bandas de absorção em 260 nm (Ce(III)), 300 e 350 nm (Ce(IV)) também foram observadas nos espectros das amostras mantidas em tampão neutro (Figura 24). Embora a estrutura líquido-cristalina seja eficiente em manter nanopartículas de cério majoritariamente no seu estado reduzido ($Ce(OH)_3$) mesmo em condições compatíveis com o ambiente fisiológico (como demonstrado pelos resultados anteriores desta dissertação), os espectros de absorção no ultravioleta-visível sugerem que uma fração dessas nanopartículas é prematuramente liberada para o meio aquoso. Propor formas de reduzir (ou impedir completamente) essa liberação visando aplicações biológicas é uma das perspectivas deste trabalho. Como anteriormente demonstrado por XANES, uma pequena fração de cério nas amostras LC-NP_x está no estado oxidado Ce(IV) mesmo sem adição de H_2O_2 aos tampões (Tabela V), o que explicaria a observação das bandas de absorção em 300 e 350 nm indicativas de espécie contendo Ce(IV) no meio aquoso. Conforme discutido anteriormente (Figura 11), esta espécie pode corresponder a $Ce(OH)_2^{2+}$, formada devido à ação oxidante de O_2 naturalmente dissolvido no meio. Por estarem em equilíbrio, não é possível descartar a contribuição da conversão da espécie $Ce(OH)_2^{2+}$ a $Ce^{3+}_{(aq)}$ no aumento da intensidade de absorção em 260 nm em tempos prolongados.

A ação de H_2O_2 como gatilho da síntese *on-demand* de nanopartículas de $CeO_{(2-x)}$ a partir dos sistemas líquido-cristalinos desenvolvidos neste trabalho foi claramente demonstrada a partir dos resultados descritos nesta dissertação. Logo após sua síntese *in situ* no interior do cristal líquido, as nanopartículas de $CeO_{(2-x)}$ são liberadas para o meio externo.

Com o objetivo de determinar o potencial biomédico destas nanopartículas, foram realizados ensaios *in vitro* de atividade de SOD. Para isso, as nanopartículas precipitadas (série ox-NP_x) foram dispersas em solução aquosa contendo o surfactante polissorbato 20. Devido ao seu caráter hidrofóbico, não foi possível dispersá-las diretamente em água. Isso provavelmente está relacionado ao revestimento de fitantriol que se manteve na sua superfície mesmo após oxidação pela ação de H₂O₂.

Concentrações crescentes das nanopartículas foram adicionadas ao meio reacional tamponado (50 mM de glicina, pH 10,2). Solução de adrenalina (incolor) foi preparada e imediatamente adicionada ao meio. Esta molécula sofre auto-oxidação ao ser adicionada ao meio alcalinizado exposto a O₂. O mecanismo da auto-oxidação é radicalar (duas oxidações de um elétron sequenciais), com formação de ânion radical superóxido (2 Eq.) no processo. A presença de ânion radical superóxido aumenta consideravelmente a taxa de formação de adrenocromo (de cor laranja) a partir da adrenalina em comparação com a taxa observada logo no início da reação (Figura 25). Por isso, sua degradação por um composto determinado adicionado ao meio resulta em menores taxas de formação de adrenocromo.

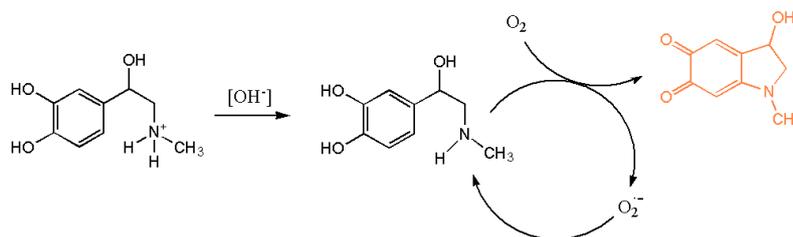


Figura 25. Esquema simplificado da reação de auto-oxidação da (-)-adrenalina em meio aquoso tamponado (pH 10,2) exposto ao ar, com formação de ânion radical superóxido e adrenocromo (laranja).

A taxa de formação de adrenocromo é determinada a partir de sua detecção espectroscópica ($\lambda_{\text{max}} = 485 \text{ nm}$) ao longo de um tempo pré-determinado, servindo como indicativo indireto da formação concomitante de ânion radical superóxido. A enzima SOD, bem como sistemas que mimetizam sua atividade, são capazes de dismutar o ânion radical superóxido gerado nessa reação. Ao impedir a atuação de ânion radical superóxido na auto-oxidação da adrenalina, ocorre redução considerável na taxa de formação de adrenocromo.

A determinação do percentual de inibição de formação de adrenocromo como medida da atividade de SOD deve ser feito de forma comparativa com controles (SOD de origem natural ou antioxidantes com atividade bem estabelecida). Como a dismutação do ânion

radical superóxido forma O_2 e H_2O_2 e este último interfere na taxa de auto-oxidação da adrenalina, adiciona-se a enzima catalase ao meio para degradá-lo logo após ser formado.

Observou-se inibição de até cerca de 50 % e 80 % da formação de adrenocromo nos ensaios de atividade de SOD (Figura 26) utilizando-se 0,05 mg/mL e 0,25 mg/mL das amostras ox-NP_x. Isso demonstrou que as nanopartículas desenvolvidas neste trabalho foram capazes de captar e degradar o ânion radical superóxido formado pela auto-oxidação da adrenalina. Não se observou diferenças consideráveis entre as amostras quanto aos percentuais de inibição de formação de adrenocromo. Isso já era esperado, em virtude da semelhança química entre as amostras da série ox-NP_x. A atividade de mimético de SOD das nanopartículas ox-NP_x foi comparável àquela obtida para nanopartículas de CeO_2 padrão. Ao contrário das amostras da série ox-NP_x, o padrão de CeO_2 não é revestido por fitantriol. Dessa forma, os resultados permitem concluir que o revestimento orgânico não é um fator capaz de afetar a reatividade das nanopartículas frente a ânion radical superóxido como substrato.

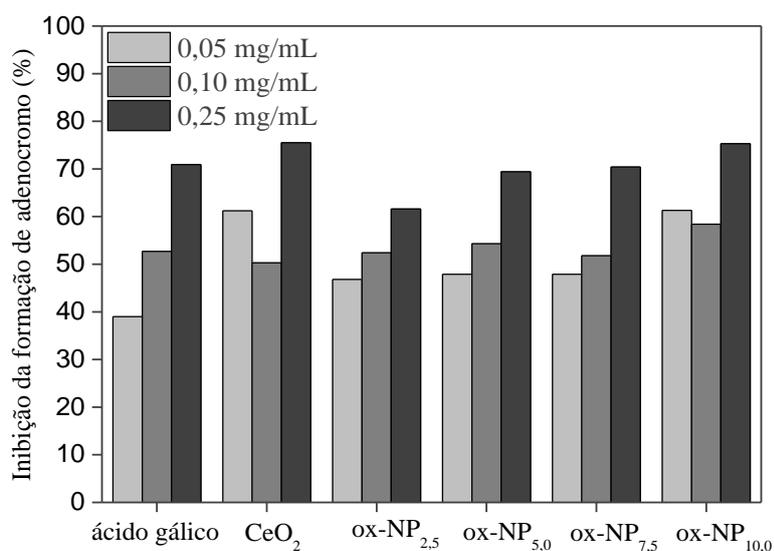


Figura 26. Medida da atividade de superóxido dismutase a partir do percentual de inibição da formação de adrenocromo decorrente da auto-oxidação catalítica de (-)-adrenalina em tampão aquoso alcalino (pH 10,2), considerando-se um tempo de reação de 15 min. Ácido gálico foi empregado como controle positivo. As amostras foram avaliadas em três concentrações (0,05; 0,10 e 0,25 mg mL⁻¹).

O comportamento das nanopartículas no que se refere à inibição da formação de adrenocromo foi comparável àquela das soluções de ácido gálico, que é um antioxidante

polifenólico classicamente empregado como controle positivo neste estudo. Portanto, as nanopartículas de $\text{CeO}_{(2-x)}$ sintetizadas *in situ* em resposta à presença de H_2O_2 , a partir do cristal líquido contendo $\text{Ce}(\text{OH})_3$, atuam como miméticos funcionais da enzima SOD de forma semelhante, independentemente da quantidade inicial de precursor de cério empregada na etapa de síntese. Nesse sentido, a utilização da menor concentração de precursor na síntese é suficiente para obter sistemas responsivos com alta atividade de SOD.

6. CONCLUSÃO

Nesta dissertação de mestrado, foram desenvolvidos sistemas líquido-cristalinos liotrópicos contendo nanopartículas capazes de atuar como miméticos da enzima superóxido dismutase em resposta a ambiente oxidante. Técnicas avançadas foram empregadas para caracterizar os sistemas quanto às suas propriedades eletrônicas e estruturais.

A estratégia de síntese *in situ* em cristal líquido desenvolvida neste trabalho permite obter nanopartículas com alta razão Ce(III)/Ce(IV) e tamanho controlado inferior a 5 nm. O alto teor de Ce(III) está relacionado à formação de nanopartículas de Ce(OH)₃, que mantiveram-se incorporadas nos canais aquosos do cristal líquido. O interesse em sintetizar nanopartículas de Ce(OH)₃ baseou-se no seu menor potencial de dano a tecidos saudáveis em relação a compostos com baixa razão Ce(III)/Ce(IV). Embora a literatura aponte que Ce(OH)₃ dissolve-se completamente em água sob condições compatíveis com a fisiológica, foi possível manter esse composto na forma nanoparticulada devido ao papel crucial exercido pela estrutura líquido-cristalina.

Demonstrou-se que as nanopartículas de Ce(OH)₃ em cristal líquido foram oxidadas a CeO_(2-x) na presença de peróxido de hidrogênio como gatilho. Devido ao seu alto teor de Ce(IV), CeO_(2-x) constituiria a forma ativa capaz de mimetizar a ação da superóxido dismutase, o que não ocorre para Ce(OH)₃. Portanto, foi possível propor que sistemas contendo nanopartículas de Ce(OH)₃ atuaram como pró-enzimas funcionais sintéticas de CeO_(2-x). Este é um conceito novo na literatura, colocando o presente estudo na fronteira do conhecimento na área de miméticos funcionais de enzimas. As nanopartículas de CeO_(2-x) sintetizadas *on-demand* apresentaram tamanho reduzido e foram gradativamente liberadas para o meio externo aquoso. Sua atividade de superóxido dismutase ficou evidenciada em ensaios de atividade enzimática realizados *in vitro*.

Embora possa ser qualificado como uma contribuição no âmbito da ciência básica, este estudo de mestrado construiu as bases para futuras investigações relacionadas à aplicação farmacológica dos sistemas líquido-cristalinos contendo Ce(OH)₃ nanoparticulado para o tratamento de doenças onde há depleção de superóxido dismutase. Para isso, estratégias de dispersão dos sistemas líquido-cristalinos em meio aquoso devem ser desenvolvidas, visando possibilitar sua administração no organismo.

Os resultados obtidos neste estudo abrem a perspectiva de utilização dos sistemas na síntese *in vivo* de miméticos funcionais de superóxido dismutase em resposta a ambiente

oxidante. Esta é uma ideia inovadora, que pode culminar em uma nova classe de sistemas inteligentes que sejam adaptáveis às necessidades do organismo do paciente ao serem sintetizadas apenas no local de ação, mediante a presença de um estímulo químico.

7. REFERÊNCIAS

1. Em: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1987/> Acesso em julho de 2017.
2. Yoon, J.; Knobler, C.B.; Maverick, E.F.; Cram, D.J. *Chem. Commun.* **1997**, *14*, 1303.
3. Dietrich, B.; Lehn, J.M.; Sauvage, J.P. *Tetrahedron Lett.* **1969**, *10*, 2889.
4. Pedersen, C.J. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 7017.
5. Em: <<https://www.webofknowledge.com>> Acesso em julho de 2017.
6. Em: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2016/> Acesso em julho de 2017.
7. Barnes, J.C.; Mirkin, C.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 620.
8. Lehn, J.-M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 89.
9. Lehn, J.-M. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 151.
10. Breslow, R. *Science.* **1982**, *218*, 532.
11. Riley, D. P. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2573.
12. Xie, J.; Zhang, X.; Wang, H.; Zheng, H.; Huang, Y.; Xie, J. *Trends Analyt. Chem.* **2012**, *39*, 114.
13. Heinz, H.; Pramanik, C.; Heinz, O.; Ding, Y.; Mishra, R.K.; Marchon, D.; Flatt, R.J.; Estrela-Lopis, I.; Llop, J.; Moya, S.; Ziolo, R.F. *Surf. Sci. Rep* **2017**, *72*, 1.
14. Myint, K.H.; Brown, J.R.; Shim, A.R.; Wyslouzil, B.E.; Hall, L.M. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 11582.
15. Sadhale, Y.; Shah, J.C. *Int. J. Pharm.* **1999**, *191*, 51.
16. Sadhale, Y.; Shah, J.C. *Int. J. Pharm.* **1999**, *191*, 65.
17. Ginsburg, G.S.; Atkinson, D.; Small, D.M. *Prog. Lipid Res.* **1984**, *23*, 135.
18. Lubensky, T.C. *Science* **2000**, *23*, 2146.
19. Wöhrle, T.; Wurzbach, I.; Kirres, J.; Kostidou, A.; Kapernaum, N.; Litterscheidt, J.; Haenle, J.C.; Staffeld, P.; Baro, A.; Giesselmann, F.; Laschat, S. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1139.
20. van 't Hag, L.; Gras, S.L.; Conn, C.E.; Drummond, C.J. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2705.
21. Barauskas, J.; Johnsson, Markus; Tiberg, F. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1615.
22. Cullis, P.R.; Hope, M.J.; Tilcock, C.P.S. *Chem. Phys. Lipids*, **1986**, *40*, 127.
23. Lombardo, D.; Kiselev, M.A.; Magazù, S.; Calandra, P. *Adv. Cond. Matter Phys.* **2015**, *151683*, 1.

24. Shah, J.C.; Sadhale, Y.; Chilukuri, D.M. *Adv. Drug Deliv. Rev* **2001**, *47*, 229.
25. Lee, K.W.Y.; Nguyen, T.-H.; Hanley, T.; Boyd, B.J.; *Int. J. Pharm.* **2009**, *365*, 190.
26. Chang, D.P.; Nylander, T. In: *Self-Assembled Supramolecular Architectures: Lyotropic Liquid Crystals*. Garti, N.; Somasundaran, P.; Mezzenga, R. (Eds.); John Wiley & Sons: New Jersey, 2012, p. 289.
27. Yaghmur, A.; Kriechbaum, M.; Amenitsch, H.; Steinhart, M.; Laggner, P.; Rappolt, M. *Langmuir* **2010**, *26*, 1177.
28. Nguyen, T.H.; Hanley, T.; Porter, C.J.; Boyd, B.J. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2011**, *1*, 429.
29. Tyler, A.I.I.; Barriga, H.M.G.; Parsons, E.S.; McCarthy, N.L.C.; Ces, O.; Law, R.V.; Seddon, J.M.; Brooks, N.J. *Soft Matter* **2015**, *11*, 3279.
30. Ganem-Quintanar, A.; Quintanar-Guerrero, D.; Buri, P. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2000**, *26*, 809.
31. Kulkarni, C.V.; Wachter, W.; Iglesias-Salto, G; Engelskirchen, S. Ahualli, S.; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 3004.
32. Nguyen, T.H.; Hanley, T.; Porter, C.J.; Boyd, B.J. *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, *62*, 856.
33. Dong, Y-D.; Larson, I.; Hanley, T.; Boyd, B.J. *Langmuir* **2006**, *22*, 9512.
34. Shen, Y.; Greaves, T.L.; Kennedy, D.F.; Weerawardena, A.; Kirby, N.; Song, G.; Drummond, C.J. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 21321.
35. Poletto, F.S.; Lima, F.S.; Lundberg, D.; Nylander, T.; Loh, W. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2016**, *147*, 210.
36. Lee, K.W.; Nguyen, T.H.; Hanley, T.; Boyd, B.J. *Int J Pharm.* **2009**, *365*, 190.
37. Akhlaghi, S.P.; Ribeiro, I.R.; Boyd, B.J.; Loh, W. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2016**, *145*, 845.
38. Mezzenga, R.; Meyer, C.; Servais, C.; Romoscanu, A.I.; Sagalowicz, L.; Hayward, R.C. *Langmuir* **2005**, *21*, 3322.
39. Chapman, D.; Williams, R.M.; Ladbrooke, B.D. *Chem. Phys. Lipids* **1967**, *1*, 445.
40. Glatter, O.; Kratki, O. *Small angle X-ray scattering*. Academic Press: Londres, 1982.
41. Barauskas, J.; Landh, T. *Langmuir* **2003**, *19*, 9562.
42. Dong, Y-D.; Dong, A.W.; Larson, I.; Rappolt, M.; Amenitsch, H.; Hanley, T.; Boyd, B.J. *Langmuir* **2008**, *24*, 6998.
43. Campbell, C.T.; Peden, C.H.F. *Science* **2005**, *309*, 713.
44. Fernández-García, M.; Rodríguez, J.A. *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, John Wiley & Sons: Hoboken, **2011**.
45. Celardo, I.; Pedersen, J.Z.; Traversa, E.; Ghibelli, L. *Nanoscale* **2011**, *3*, 1411.

46. Solanki, P.R.; Kaushik, A.; Agrawal, V.V.; Malhotra, B.D. *NPG Asia Mater.* **2011**, *3*, 17.
47. Buzby, S.; Franklin, S.; Shah, S.I. In: *Synthesis, Properties, and Applications of Oxide Nanomaterials*. Rodriguez, J.A.; Fernández-García, M (Eds.), John Wiley & Sons: Hoboken, 2006, p. 119.
48. Wender, H.; Gonçalves, R.V.; Feil, A.F.; Migowski, P.; Poletto, F.S.; Pohlmann, A.R.; Dupont, J.; Teixeira, S.R. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 16362.
49. Apesteguy, J.C.; Kurlyandskaya, G.V.; Celis, J.P.; Safronov, A.P.; Schegoleva, N.N. *Mater. Chem. Phys.* **2015**, *161*, 243.
50. Hasnidawani, J.N; Azlina, H.N.; Norita, H.; Bonnia, N.N.; Ratim, S.; Ali, E.S. *Procedia Chem.* **2016**, *19*, 211.
51. Wongwailikhit, K.; Horwongsakul, S. *Mater. Lett.* **2011**, *65*, 2820.
52. Li, C.; Liu, H.; Yang, J. *Nanoscale Res. Lett.* **2015**, *10*, 144.
53. Samanta, B.; Yan, H.; Fischer, N.O.; Shi, J.; Jerry, D.J.; Rotello, V.M. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 1204.
54. Szlezak, M.; Nieciecka, D.; Joniec, A; Pękała, M.; Gorecka, E.; Emo, M.; Stébé M. J.; Krysiński, P.; Bilewicz, R. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 2796.
55. Vallooran, J.J.; Bolisetty, S.; Mezzenga, R. *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 3932.
56. Beddoes, C.M.; Berge, J.; Bartenstein, J.E.; Lange, K.; Smith, A.J.; Heenan, R.K.; Briscoe, W.H. *Soft Matter* **2016**, *12*, 6049.
57. Venugopal, E.; Bhat, S.K.; Vallooran, J.J.; Mezzenga, R.; *Langmuir* **2011**, *27*, 9792.
58. Dellinger, T.M.; Braun, P.V. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 2201.
59. Em: <<http://www.rsc.org/periodic-table/element/58/ce>> Acesso em julho de 2017.
60. Mogensen, M.; Sammes, N.M.; Tompsett, G.A. *Solid State Ion.* **2000**, *129*, 63.
61. Tsunekawa, S.; Sahara, R.; Sahara, Kawazoe, Y.; Ishikawa, K. *Surf. Sci.* **1999**, *152*, 53.
62. Pourbaix, M. *Atlas of Electrochemical Equilibria in Aqueous Solutions*; National Association of Corrosion Engineers: Houston, 1974.
63. Hayes, S.A.; Yu, P.; O'Keefe, T.J.; O'Keefe, M.J.; Stoffer, J.O. *J. Electrochem. Soc.* **2002**, *149*, C623.
64. Della Mea, G.B.; Matte, L.P.; Thill, A.S.; Lobato, F.O.; Benvenuti, E.V.; Arenas, L.T.; Jürgensen, A.; Hergenröder, R.; Poletto, F.; Bernardi, F. *Applied Surf. Sci.* **2017**, *422*, 1102.
65. Zhang, C.; Grass, M.E.; McDaniel, A.H.; DeCaluwe, S.C.; Gabaly, F.E.; Liu, Z.; McCarty, K.F.; Farrow, R.L.; Linne, M.A.; Hussein, Z.; Jackson, G.S.; Bluhm, H.; Eichhorn, B.W. *Nature Mat.* **2010**, *9*, 944.

66. Karakoti, A.S.; Singh, S.; Kumar, A.; Malinska, M.; Kuchibhatla, S.V.N.T.; Wozniak, K.; Self, W.T.; Seal, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14144.
67. Yuan, Q.; Duan, H.-H.; Li, L.-L.; Sun L.-D.; Zhang, Y-W.; Yan, C-H. *J. Colloid Interface Sci* **2009**, *335*, 151.
68. Karakoti, A.S.; Kuchibhatla, S.V.N.T.; Babu, K.S.; Seal, S. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 17232.
69. Hassanzadeh-Tabrizi, S.A.; Mazaheri, M.; Aminzare, M.; Sadrnezhad, S.K. *J. Alloys Compd.* **2010**, *491*, 499.
70. Heckman, K.L.; de Coteau, W.; Estevez, A.; Reed, K.J.; Costanzo, W.; Sanford, D.; Leiter, J.C.; Clauss, J.; Knapp, K.; Gomez, C.; Mullen, P.; Rathbun, E.; Prime, K.; Marini, J.; Patchefsky, J.; Patchefsky, A.S.; Hailstone, R.K.; Erlichman, J.S. *ACS Nano* **2013**, *7*, 10582.
71. Lee, S.S.; Song, W.; Cho, M.; Puppala, H.L.; Nguyen, P.; Zhu, H.; Segatori, L.; Colvin, V.L. *ACS Nano* **2013**, *7*, 9693.
72. Abellan, P.; Moser, T.H.; Lucas, I. T.; Grate, J.W.; Evans, J.E.; Browning, N.D. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 3831.
73. Cushing, B.L.; Kolesnichenko, V.L.; O'Connor, C.J. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3893.
74. Perez, J.M.; Asati, A.; Nath, S.; Kaittanis, C. *Small* **2008**, *4*, 552.
75. Hussain, S.; Kodavanti, P.P.; Marshburn, J.D.; Janoshazi, A.; Marinakos, S.M.; George, M.; Rice, A.; Wiesner, M.R.; Garantziotis, S. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2016**, *12*, 2139.
76. Zazzera, L.; Mader, B.; Ellefson, M.; Eldridge, J.; Loper, S.; Zabasajja, J.; Qian, J. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 13427.
77. Kurian, M.; Kunjachan, C. *Int. Nano Lett.* **2014**, *4*, 73.
78. Hüfner, S. *Photoelectron Spectroscopy: Principles and Applications*; Springer-Verlag:Berlin, 2003.
79. Stern, E.A. In: *X-Ray Absorption*; Koningsberger, D.C.; Prins, R. (Eds.); John Wiley and Sons:Nova Iorque, 1988.
80. Heckert, E.G.; Karakoti, A.S.; Seal, S.; Self, W.T. *Biomaterials* **2008**, *29*, 2705.
81. Secerov, B.; Andric, Z.; Abazovic, N.; Krsmanovic, R.; Mitric, M.; Montene, A; Dramicanin, M.D. *Acta Chim. Slov.* **2008**, *55*, 486.
82. Bensalem, A.; Muller, J. C.; Faraday, Bozon-Verduraz, F. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1992**, *88*, 153.
83. Oberley, T.D. *Am. J. Pathol.* **2002**, *160*, 403.

84. Misra, M.K.; Sarwat, M.; Bhakuni, P.; Tuteja, R.; Tuteja, N. *Med Sci Monit.* **2009**, *15*, RA209.
85. Bennett, S.; Grant, M.M.; Aldred, S. *J Alzheimers Dis.* **2009**, *17*, 245.
86. Mateen, S.; Moin, S.; Khan, A.Q.; Zafar, A.; Fatima, N. *PLoS One.* **2016**, *11*, e0152925.
87. Kruman, I.I.; Pedersen, W.A.; Springer, J.E.; Mattson, M.P. *Exp. Neurol* **1999**, *160*, 28.
88. Abreu, I.A.; Cabelli, D.E. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1804*, 263.
89. Celardo, I.; de Nicola, M.; Mandoli, C.; Pedersen, J.Z.; Traversa, E.; Ghibelli, L. *ACS Nano.* **2011**, *5*, 4537.
90. Korsvik, C.; Patil, S.; Seal, S.; Self, W.T. *Chem. Commun.* **2007**, *10*, 1056.
91. Celardo, I.; Pedersen, J.Z.; Traversa, E.; Ghibelli, L. *Nanoscale* **2011**, *3*, 1411.
92. Sehgal, A.; Lalatonne, Y.; Berret, J.-F.; Morvan, M. *Langmuir* **2005**, *21*, 9359.
93. Corbo, C.; Molinaro, R.; Parodi, A.; Furman, N.E.T., Salvatore, F.; Tasciotti, E. *Nanomedicine* **2016**, *11*, 81.
94. Andreescu, D.; Bülbül, G.; Özel, R.E; Hayat, A.; Sardesai, N.; Andreescu, S. *Environ. Sci.: Nano* **2014**, *1*, 445.
95. Sayle, T.X.; Molinari, M.; Das, S.; Bhatta, U.M.; Möbus, G.; Parker, S.C.; Seal, S.; Sayle, D.C. *Nanoscale* **2013**, *5*, 6063.
96. Uttara, B.; Singh, A.V.; Zamboni, P.; Mahajan, R.T. *Neuropharmacology* **2009**, *7*, 65.
97. Mura, S.; Nicolas, J.; Couvreur, P. *Nature Materials* **2013**, *12*, 991.
98. Liu, J.; Pang, Y.; Zhu, Z.; Wang, D.; Li, C.; Huang, W.; Zhu, X; Yan, D. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1627.
99. Ren, C.; Chu, L.; Huang, F.; Yang, L.; Fan, H.; Liu, J.; Yang, C. *RSC Adv.* **2017**, *7*, 1313.
100. Halliwell, B.; Clement, M.V; Long, L.H. *FEBS Lett.* **2000**, *486*, 10.
101. Forman, H.J.; Bernardo, A.; Davies, K.J.A. *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, *603*, 48.
102. Shlafer, M.; Brosamer, K.; Forder, J.R.; Simon, R.H.; Ward, P.A.; Grum, C.M. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1990**, *22*, 83.
103. Bradstreet, R.B. *Anal. Chem.* **1954**, *26*, 185.
104. Sayers, D.E.; Bunker, B.A. In: *X-Ray Absorption*; Koningsberger, D.C.; Prins, R. (Eds.); John Wiley and Sons: Nova Iorque, 1988.
105. Takahasi, Y.; Sakami, H.; Nomura, M. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *468*, 345.
106. Misra, H.P; Fridovicci, I. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 3170.
107. Charbgo, F.; Ahmad, M.B.; Darroudi, M. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 1401.
108. Roiter, Y.; Ornatska, M.; Rammohan, A.R.; Balakrishnan, J.; Heine, D.R.; Minko, S. *Nano Lett.* **2008**, *8*, 941.

109. Fang, Z.; Thanthiriwatte, K.S.; Dixon, D.A.; Andrews, L.; Wang, X. *Inorg. Chem.* **2016**, *55*, 1702.
110. Briggs, J.; Caffrey, M. *Biophys. J.* **1994**, *67*, 1594.
111. do Amaral, L.Q. *Braz. J. Phys.* **2002**, *32*, 540.
112. Atakan, V.; Chen, C.-W.; Paul, R.; Riman, R.E. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 6626.
113. Bumajdad, A.; Eastoe, J.; Mathew, A. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009**, *147-148*, 56.
114. Trovarelli, A. *Catal. Rev. Sci. Eng.* **1996**, *38*, 439.
115. Zhou, Y.C.; Rahaman, M.N. *J. Mater. Res.* **1993**, *8*, 1680.
116. Bedekar, V.; Chavan, S.V.; Goswami, M.; Kothiyal, G.P.; Tyagi, A.K. *J. Alloys Compd.* **2008**, *459*, 477.
117. Steen, K.H.; Steen, A.E.; Reeh, P.W. *J Neurosci.* **1995**, *15*, 3982.
118. Doyle, M.P. *J. Chem. Educ.* **1974**, *51*, 131.
119. Damatov, D.; Mayer, J.M. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 10281.
120. Figueiredo, W.T. *Elucidation of catalytic events at atomic level in Cu_xNi_{1-x}/CeO_2 ($0 < x < 1$) nanoparticles applied to the reverse water-gas shift (RWGS) reaction.* Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.
121. Chen, F.; Shen, X.; Wang, Y.; Zhang, J. *Appl Catal B* **2012**, *121-122*, 223.
122. Chen, Y.S.; Hung, Y.C.; Liao, I.; Huang, G.S. *Nanoscale Res. Lett.* **2009**, *4*, 858.
123. Dillin, D. R.; Milligan, W. O.; Williams, R. J. *J. Appl. Cryst.* **1973**, *6*, 492.
124. Li, Y.; Schellhorn, H.E. *J. Biomol. Tech.* **2007**, *18*, 185.

ANEXOS

ANEXO I

PREPARAÇÃO DE TAMPÕES E SOLUÇÕES

Preparação do tampão ácido acético/acetato de sódio 0,1 M (pH 5,5)

Em béquer contendo 40 mL de água MilliQ®, adicionou-se 4,1 mL de solução previamente preparada de NaOH 1 M e 280 µL de ácido acético glacial. O pH foi determinado empregando-se pHmetro calibrado na faixa ácida. Se necessário, foram adicionadas alíquotas de solução aquosa de NaOH 1 M ou ácido acético 1 M até atingir o pH 5,5 ($\pm 0,1$) a 25 °C. A solução foi transferida para balão volumétrico e o volume final foi ajustado a 50 mL com água MilliQ®.

Preparação do tampão Tris·HCl/Tris 0,1 M (pH 7,4)

Em béquer contendo 80 mL de água MilliQ®, dissolveu-se 0,6054g de tris(hidroximetil)aminometano. Após dissolução, adicionou-se alíquotas de solução aquosa de HCl 1 M previamente preparada, até atingir o pH 7,4 ($\pm 0,1$) a 25 °C. O pH foi determinado empregando-se pHmetro calibrado na faixa ácida. Após esse procedimento, a solução foi transferida para balão volumétrico e o volume foi completado a 100 mL com água MilliQ®.

Preparação do tampão glicina 50 mM (pH 10,2)

Em cerca de 40 mL de água MilliQ®, dissolveu-se 0,187g de glicina. A solução foi transferida para balão volumétrico e o volume foi ajustado a 50 mL com água MilliQ®. A solução tamponada teve seu pH verificado em pHmetro, ajustando-se o valor (se necessário) a 10,2 ($\pm 0,1$) adicionando-se alíquotas de NaOH 1 M. O tampão foi congelado e mantido ao abrigo da luz. Seu pH foi verificado após descongelamento, momentos antes de sua utilização nos ensaios de atividade de SOD.

Preparação da solução de (-)-adrenalina 60 mM (pH 2,0) empregada nos ensaios de atividade de SOD

Pesou-se 0,109 g de (-)-adrenalina e diluiu-se mesma em solução aquosa de H₂SO₄. A mistura foi transferida para balão volumétrico e o volume final foi ajustado a 10 mL com água MilliQ®. O pH da solução, determinado em pHmetro calibrado na faixa ácida, foi ajustado a 2,0 ($\pm 0,1$) pela adição de alíquotas de HCl 1 M. O tampão foi armazenado ao abrigo da luz, em geladeira, sendo descongelado apenas minutos antes de sua utilização. O surgimento de cor rósea na solução é indicativo de oxidação e, nesses casos, não deve ser utilizado.

ANEXO II

EXTRAÇÃO DA PORÇÃO INORGÂNICA DAS AMOSTRAS DA SÉRIE LC-NP_x E CARACTERIZAÇÃO DOS PÓS OBTIDOS

Método de extração da porção inorgânica das amostras da série LC-NP_x

As nanopartículas sintetizadas em meio líquido-cristalino (conforme descrito no item 4.2.1 da Parte Experimental desta dissertação), foram extraídas imediatamente após a síntese, através da dissolução do sistema em 10 mL de etanol absoluto. A dispersão foi mantida sob agitação por 8 h, à temperatura ambiente. Após esse período, a mistura foi transferida para tubo de vidro tipo Falcon e mantida em repouso por 12 h. A seguir, foi realizada centrifugação a 3500 rpm por 15 min. O pó precipitado foi separado por decantação, lavado com nova alíquota de 8 mL de etanol absoluto e centrifugado nas mesmas condições anteriormente descritas. Este processo foi repetido três vezes. O sobrenadante apresentou coloração amarela, que foi gradativamente diminuindo de intensidade a cada novo ciclo de extração. Ao término das extrações com etanol, o precipitado foi lavado com 8 mL de água MilliQ® e centrifugado por 15 min a 3500 rpm. O precipitado remanescente foi mantido em dessecador sob pressão reduzida por 12 h para secagem. Observou-se uma quantidade comparativamente maior de pó a partir das amostras de cristal líquido preparadas empregando-se concentrações mais elevadas de precursor de cério, na ordem LC-NP_{10,0} > LC-NP_{7,5} > LC-NP_{5,0} > LC-NP_{2,5}. Todos os pós apresentaram coloração amarelada (Figura AII.1).



Figura AII.1 – Fotografias dos pós obtidos via extração a partir das amostras LC-NP_x em duas etapas do processo: (a) precipitados obtidos após a lavagem com água, (b) pós secos sob pressão reduzida.

Caracterização das nanopartículas em pó por espectroscopia de emissão de raios X com energia dispersiva (EDS – *Energy Dispersive Spectroscopy*)

Os pós obtidos a partir da extração das amostras da série LC-NP_x foram depositados em fita-carbono aderida a porta-amostra de alumínio e medidos em equipamento de microscopia eletrônica de varredura EVO MA10 (Zeiss®, Alemanha) acoplado a um detector de raios X característicos com janela ultrafina (EDS; mod. x-act, Oxford Instruments®, Reino Unido) para determinação da análise química elementar. As medidas semi-quantitativas foram realizadas avaliando-se 5 regiões em cada amostra. Os dados foram tratados através do software INCA (Oxford Instruments®, Reino Unido).

A técnica de microanálise por EDS acoplada a microscopia eletrônica de varredura permitiu verificar a presença do elemento cério em todas as amostras. Outros elementos pesados não foram detectados. Na Figura AII.2 é possível visualizar um espectro de EDS típico das amostras (LC-NP_{2,5}). Considerando-se que fitantriol (que contém oxigênio e carbono) pode ter permanecido aderido às nanopartículas, o resultado não foi considerado sob uma perspectiva quantitativa. Cabe salientar que o elemento sódio não foi observado por essa técnica, reforçando que a eventual contaminação das amostras com NaNO₃(aq) não é relevante.

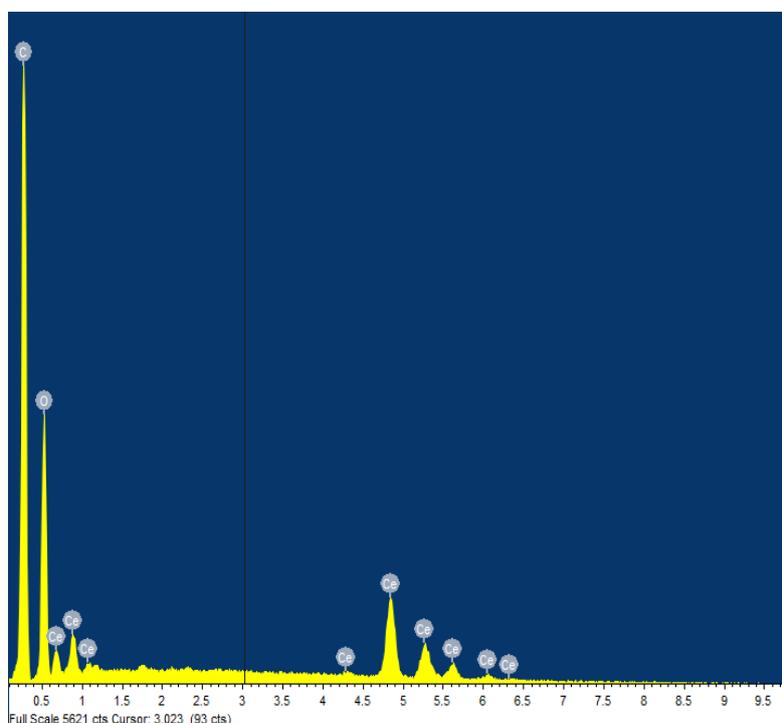


Figura AII.2 – Espectro de EDS da área medida de pó extraído a partir da amostra LC-NP_{2,5}.

Caracterização das nanopartículas em pó por espectroscopia de absorção de raios X (XAS – *X-Ray Absorption Spectroscopy*)

Os pós (12 mg) extraídos das amostras da série LC-NP_x foram dispersos em isopropanol (aproximadamente 5 mL) com auxílio de banho de ultrassom e a suspensão foi vertida em funil acoplado a sistema de filtração a vácuo com membrana de 400 *mesh*. Ao término da filtração, os pós permaneceram compactados à membrana de forma homogênea.

As membranas contendo pós de nanopartículas foram inseridas em porta-amostra e medidas na linha de luz XAFS2 do LNLS em modo transmitância na borda L₃ do Ce (5723 eV) à temperatura ambiente no modo transmissão. Foi utilizado um detector de estado sólido de Ge com 15 elementos G-15 SSD. As medidas foram realizadas na região de XANES no intervalo de 5675 eV a 5780 eV com passo de energia de 0,2 eV na região da borda de absorção durante 4 s/ponto. Entre duas e quatro varreduras foram medidas com o objetivo de aumentar a razão sinal/ruído da medida. Os dados foram ajustados a modelo matemático conforme descrito no item 4.2.10 desta dissertação.

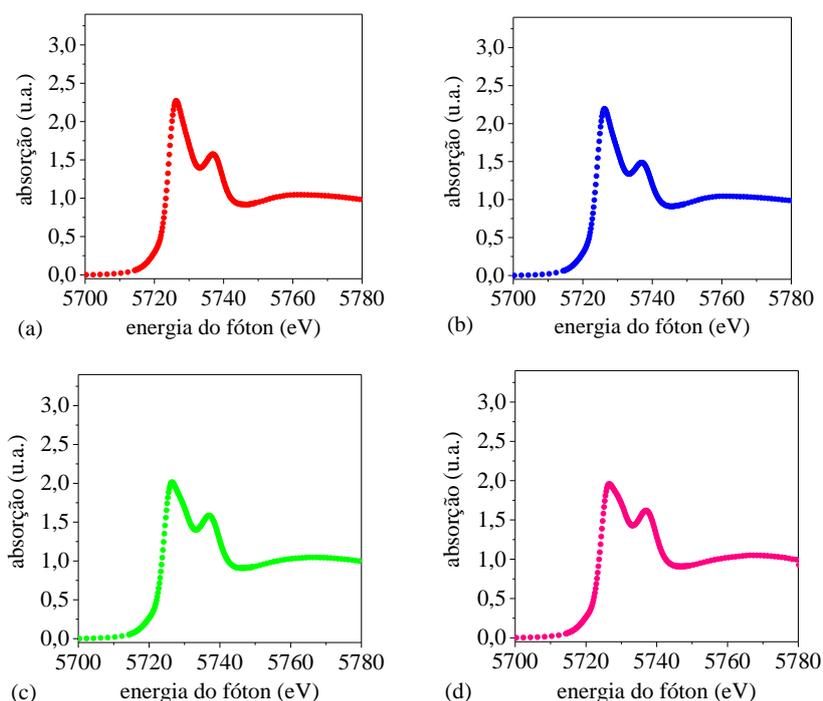


Figura AII.3 – Espectros de XANES na borda L₃ do Ce de nanopartículas extraídas a partir das amostras (a) LC-NP_{2,5}, (b) LC-NP_{5,0}, (c) LC-NP_{7,5} e (d) LC-NP_{10,0}.

A análise da região de XANES indica que as nanopartículas extraídas com etanol representam um caso intermediário aos padrões de Ce(III) e Ce(IV) da Figura 15. O ajuste

matemático (não mostrado) permitiu quantificar o percentual de Ce(III) nas nanopartículas, que correspondeu a 41 % (LC-NP_{2,5}), 54 % (LC-NP_{5,0}), 31 % (LC-NP_{7,5}) e 22 % (LC-NP_{10,0}).

Difração de raios X (XRD – *X-Ray Diffraction*) das nanopartículas em pó

Os pós obtidos por extração a partir das amostras LC-NP_x foram depositados na superfície de membranas de 400 *mesh*, por filtração, conforme descrito para o procedimento anterior. As membranas contendo amostra foram medidas em difratômetro convencional Siemens D500 operado a 40 kV e 17,5 mA e radiação de Cu-K α com comprimento de onda de 1,5405 Å. Empregou-se passo de 0,05° e intervalo de ângulo 2 θ de 20° a 80°. Cada ponto foi medido durante 1s. Foram utilizados os padrões de referência do software PCPDFWIN, versão 2.1, a partir da base de dados JCPDS-ICDD. Para fins de comparação, CeO₂ comercial (padrão) foi igualmente medido.

A indexação das reflexões de Bragg permitiu identificar a estrutura cristalina das amostras. Em todos os casos (Figura AII.4), obteve-se estrutura do tipo fluorita, compatível com aquela observada para o CeO₂. O alargamento dos picos de difração está relacionado ao tamanho reduzido dos cristalitos.

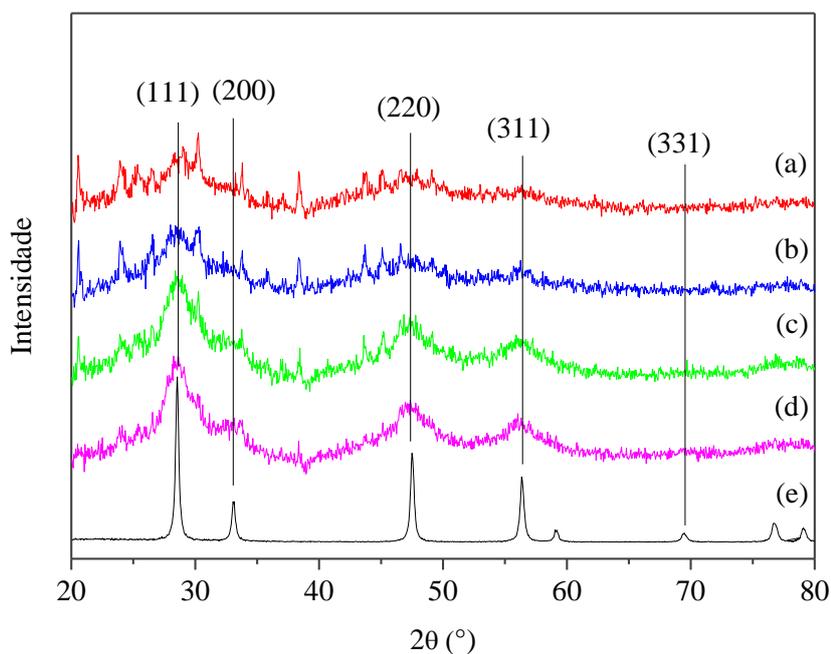


Figura AII.4 - Difratogramas dos pós de nanopartículas extraídos a partir de (a) LC-NP_{2,5}, (b) LC-NP_{5,0}, (c) LC-NP_{7,5}, (d) LC-NP_{10,0} e (e) padrão de CeO₂ (experimental)