



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



**Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Sílica como
Nanocarreador do Composto RM78 e Investigação de sua Atividade
Anticolinesterásica**

Marcio Fernandes da Silva

Orientador: Prof. Dr. Heberton Wender Luiz dos Santos

Campo Grande – Maio de 2018



Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Sílica como Nanocarreador do Composto RM78 e Investigação de sua Atividade Anticolinesterásica

Marcio Fernandes da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais – Nível de Mestrado – da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais (área de concentração: Física e Química de Materiais).

Orientador: Prof. Dr. Heberton Wender Luiz dos Santos

Campo Grande – Maio de 2018



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SECRETARIA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL.

FICHA CATALOGRÁFICA

Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Sílica como Nanocarreador do Composto RM78 e Investigação de sua Atividade Anticolinesterásica

Marcio Fernandes da Silva

Orientador:

Prof. Dr. Heberton Wender Luiz dos Santos

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Materiais – Nível de Mestrado – da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais (área de concentração: Física e Química de Materiais)

Aprovada por: _____

Dr. Heberton Wender Luiz dos Santos

Dr. Marco Antônio Utrera Martinez

Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques

Dr. Cícero Rafael Cena da Silva

Campo Grande – Maio de 2018

“Nada é permanente, exceto a mudança.”

Heráclito

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Marcos e Lucécia, aos meus avós Jairo e Ada, ao meu tio Paulo, por serem exemplos de vitória e conquista para mim e pelo constante apoio e presença na minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter concedido dois anos de muito aprendizado;

A minha família pelo constante apoio e presença; especialmente nos últimos dois anos

Aos Srs. Stéphanou Andrade e Renan Nakasato que permanecem me ajudando sendo grandes amigos;

Aos amigos do laboratório Luiz Gomez, Adailton Nogueira, Luiz Affonso, Francielle Stelo, Kelly Farias e Luiz Felipe por me ajudarem com o trabalho e pelos momentos de descontração (que foram muitos);

Ao professor Heberton Wender pela orientação (tanto como professor quanto como pessoa);

Aos professores Além-Mar Bernardes, Samuel de Oliveira, Anderson Caires, João Vitor, Cícero Rafael, Marco Utrera (INQI) e Jeandre Augusto (INBIO) por contribuírem cada um a sua maneira na construção do meu conhecimento;

Aos colegas do Laboratório de Óptica e Fotônica (INFI), do Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos (INBIO) e Laboratórios de Pesquisa V e VI (INQUI) por colaborarem com boa parte da execução do trabalho;

A CAPES pelo apoio financeiro concedido.

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) atinge cerca de 5% da população de idosos do planeta e segundo projeções esse valor tende a aumentar substancialmente até 2050. A DA é um tipo de demência que se caracteriza pela perda sináptica e morte neuronal em várias regiões cerebrais. Apesar de existirem compostos que apresentam potencial farmacológico contra a DA, ainda há alguns obstáculos a serem vencidos: efeitos colaterais e insolubilidade no meio biológico. Como proposta de solução para o problema da insolubilidade apresentam-se os materiais nanoestruturados que podem ser utilizados como suporte para compostos orgânicos. Destacam-se nesse meio de aplicações biológicas as nanopartículas de sílica (SiO_2NPs), cuja excelente biocompatibilidade e estabilidade química as tornam ótimas candidatas para atuarem como suporte para compostos orgânicos. Este trabalho apresenta o estudo da síntese de SiO_2NPs através do método de Stöber modificado, bem como suas caracterizações, avaliação da estabilidade coloidal e testes da influência das SiO_2NPs na atividade enzimática da proteína acetilcolinesterase (AChE). As partículas sintetizadas apresentaram tamanhos que vão de 60 até aproximadamente 300 nm, e baixa dispersividade. Os testes enzimáticos foram feitos com as NPs que apresentaram tamanho de ~ 150 nm e uma boa estabilidade coloidal, avaliada qualitativamente. A atividade enzimática na presença das SiO_2NPs pura revelou o valor de 0,1330 mg/mL como sendo a concentração máxima antes de as SiO_2NPs apresentarem interferência na atividade enzimática. Nos testes na presença das $\text{SiO}_2\text{-RM78NPs}$ – onde 2,2% da massa do compósito corresponde ao RM78 – comparado ao grupo controle, não houve inibição da atividade enzimática como era esperado. Futuros estudos deverão ser realizados visando melhor entender a influenciadas SiO_2NPs nos testes enzimáticos.

Palavra chave: doença de Alzheimer; nanopartículas de sílica; acetilcolinesterase.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) reaches about 5% of global elder population and projections says this number tends to grow substantially until 2050. AD is a kind of dementia characterized by synaptic lost and neuronal death in several brain regions. Although there are compounds that present potential pharmacological activity against AD, there are some barriers to overcome: collateral effects and biological insolubility. Proposed as a solution for the insolubility issue there are nanostructured materials that can be used as organic compounds support. Heading the biological applications silica nanoparticles (SiO_2NPs), whose excellent biocompatibility and chemical stability makes it a great deal for organic compound support. This work presents the study of synthesis of SiO_2NPs through a modified Stöber method, as well the characterizations, colloidal stability and the SiO_2NPs influence over the acetylcholinesterase (AChE) enzymatic activity analysis. The so synthesized particles presented sizes within the range of 60 to 300 nm and low dispersivity. The enzymatic tests were performed with the NPs that presented a size of ~ 150 nm and good colloidal stability, qualitatively analyzed. The enzymatic activity in the presence of SiO_2NPs revealed 0,1330 mg/mL as the maximum concentration before the SiO_2NPs shows interference over the enzymatic activity. The tests in the presence of $\text{SiO}_2\text{-RM78NPs}$ – where 2,2% from the composite mass corresponds to RM78 – compared to the control group, there was no inhibition on the enzymatic activity as expected. Future studies shall be performed intended to better understand the SiO_2NPs influence over the enzymatic tests.

Key-words: Alzheimer's disease; silica nanoparticles; acetylcholinesterase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da hidrólise (condensação) durante o processo de síntese das partículas de sílica.....	pág. 20
Figura 2 – Tipos de condensação que ocorrem durante a síntese das partículas de sílica. Condensação gerando álcool (em cima); condensação gerando água (em baixo).....	pág. 21
Figura 3 – Anatomia encefálica simplificada.....	pág. 21
Figura 4 – Principais regiões do encéfalo e suas subdivisões.....	pág. 22
Figura 5 – Os diferentes tipos de sinapses. A: sinapse elétrica; B: sinapse química.....	pág. 23
Figura 6– Esquema do teste enzimático utilizado. À esquerda o procedimento padrão do método de Ellman. À direita o procedimento realizado conforme a alteração proposta por Dingova e Dominika.....	pág. 26
Figura 7 – Estrutura molecular do composto RM78.....	pág. 26
Figura 8 – Descrição do procedimento padrão empregado para a síntese das nanopartículas bem como os volumes de reagentes utilizados na a síntese.....	pág. 29
Figura 9 – Procedimentos para as sínteses de otimização dos parâmetros de reação. a) variação de EtOH; b) variação de TEOS; c) variação de NH ₄ OH.....	pág. 30
Figura 10 – Mol de reagentes e tempos empregados na síntese das SiO ₂ NPs (à esquerda) e das SiO ₂ -NH ₂ NPs (à direita).....	pág. 31
Figura 11 – O volume de água, massa de amostra e os tempos empregados no procedimento para o estudo da estabilidade coloidal das amostras.....	pág. 35
Figura 12 – Procedimento para a adsorção do composto RM78 nas SiO ₂ NPs.....	pág. 36
Figura 13 – MEV das partículas sintetizadas com diferentes volumes de EtOH. A: amostra am08 (8mL EtOH; B: amostra am10 (10 mL EtOH); C: amostra am12 (12 mL EtOH); D: amostra am14 (14 mL EtOH).....	pág. 39
Figura 14 – Histogramas das partículas sintetizadas com diferentes volumes de EtOH. Onde d _M = diâmetro médio. A: amostra am08 (8 mL EtOH); B: amostra am10 (10 mL EtOH); C: amostra am12 (12 mL EtOH); D: amostra am14 (14 mL EtOH).....	pág. 40
Figura 15 – MEV das partículas sintetizadas com diferentes volumes de TEOS. A: amostra am280 (280 µL TEOS; B: amostra am330 (330 µL TEOS); C: amostra am380 (380 µL TEOS); D: amostra am430 (430 µL TEOS).....	pág. 41

Figura 16 – Histogramas das partículas sintetizadas com diferentes volumes de TEOS. Onde d_M = diâmetro médio. A: amostra am280 (280 μ L TEOS); B: amostra am330 (330 μ L TEOS); C: amostra am380 (380 μ L TEOS); D: amostra am430 (430 μ L TEOS).....	pág. 42
Figura 17 – MEV das partículas sintetizadas com diferentes volumes de NH_4OH . A: amostra am470 (470 μ L NH_4OH); B: amostra am520 (520 μ L NH_4OH); C: amostra am570 (570 μ L NH_4OH); D: amostra am620 (620 μ L NH_4OH).....	pág. 43
Figura 18 – Histogramas das partículas sintetizadas com diferentes volumes de NH_4OH . Onde d_M = diâmetro médio. A: amostra am470 (470 μ L NH_4OH); B: amostra am520 (520 μ L NH_4OH); C: amostra am570 (570 μ L NH_4OH); D: amostra am620 (620 μ L NH_4OH).....	pág. 44
Figura 19 – Comparação (qualitativa) da estabilidade coloidal das amostras. À esquerda a amostra am08, no centro está a amostra am570 e à direita está amostra am620.....	pág. 45
Figura 20 – Microscopia das SiO_2NPs . Ao lado seu histograma contendo a normalização (gaussiana) que fornece o diâmetro médio das partículas.....	pág. 46
Figura 21 – MEV das $SiO_2-RM78NPs$. Ao lado seu histograma contendo a gaussiana que fornece o diâmetro médio das partículas.....	pág. 47
Figura 22– DLS das SiO_2NPs . As medidas (feitas em triplicata) confirmaram a natureza nanométrica das partículas bem como seu baixo índice de dispersão. A técnica serve como complemento às medidas de MEV.....	pág. 48
Figura 23– DLS das SiO_2-NH_2NPs . As medidas (feitas em triplicata) confirmam a natureza nanométrica das partículas bem como sua baixa dispersividade. A técnica serve como um complemento às medidas de MEV.....	pág. 49
Figura 24 – DLS das $SiO_2-RM78NPs$. As medidas (realizadas em triplicata) confirmam sua natureza nanométrica e seu baixo índice de dispersão. A técnica serve como um complemento às medidas de MEV.....	pág. 50
Figura 25 – Estudo da estabilidade coloidal. Solução a 4 mg/mL de SiO_2-NH_2NPs em água deionizada após aproximadamente 2h.....	pág. 51
Figura 26 – Absorção em 281,8 nm da RM78 (esquerda); Curva de calibração construída a partir dos dados de absorção (direita).....	pág. 51
Figura 27 – Absorção apresentada pelo sobrenadante da solução para adsorção de RM78 na superfície das SiO_2NPs	pág. 53

Figura 28 – FTIR das SiO ₂ NPs e seus picos de absorção característicos.....	pág. 54
Figura 29 – Comparação das medidas de FTIR das SiO ₂ NPs e SiO ₂ -RM78NPs. A linha preta representando as SiO ₂ NPs e a linha tracejada representando as SiO ₂ -RM78NPs.....	pág. 55
Figura 30 – Medida de P ζ das SiO ₂ NPs. As medidas foram realizadas em triplicata.....	pág. 56
Figura 31 – Medida de P ζ das SiO ₂ -RM78NPs. As medidas foram feitas em triplicata.....	pág. 57
Figura 32 – Termogravimetria das SiO ₂ NPs. Na imagem estão destacadas as seções em que há perda de massa bem como a perda de massa total até 950 °C.....	pág. 58
Figura 33 – Termogravimetria das SiO ₂ -RM78NPs. Na imagem estão destacadas seções em que há perda de massa bem como a perda de massa total até 950 °C.....	pág. 59
Figura 34 – Atividade da enzima AChE sobre as quatro regiões encefálicas (córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e estriado), reunidas como uma única amostra na presença de SiO ₂ NPs (SP) ou SiO ₂ -RM78NPs (SC). Os dados foram analisados através da análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida pelo teste <i>post hoc</i> de Dunnett, onde os resultados foram considerados significativos quando P \leq 0,05.....	pág. 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: A otimização dos parâmetros de síntese foi feita através da realização de diversas sínteses. Na tabela estão a identificação das amostras e a quantidade (em Mol) dos reagentes para cada síntese realizada.....	pág. 38
Tabela 2: Diâmetro médio das partículas sintetizadas com diferentes volumes de EtOH bem como seus respectivos valores de dispersão (c_v).....	pág. 40
Tabela 3: Diâmetro médio das partículas sintetizadas com diferentes volumes de TEOS bem como seus respectivos valores de dispersão (c_v).....	pág. 42
Tabela 4: Diâmetro médio das partículas sintetizadas com diferentes volumes de NH_4OH bem como seus respectivos valores de dispersão (c_v).....	pág. 44

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACh – acetilcolina

AChE – acetilcolinesterase

AcSCh – acetiltiocolina

APP – proteína precursora amilóide (*Amiloyd Precursor Protein*)

APTESE – 3-aminopropiltriétoxissilano

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

BChE – butirilcolinesterase

ChAT – colina-acetiltransferase

c_v – coeficiente de variação

DA – doença de Alzheimer

DAE – doença de Alzheimer esporádica

DAF – doença de Alzheimer familiar

DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering*)

d_M – diâmetro médio

DTNB – ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

EtOH – etanol

FTIR – Espectroscopia Vibracional no Infravermelho por Transformada de Fourier

iso-OMPA – tetraisopropil pirofosforamida

NH₄OH – hidróxido de amônio

NPs – nanopartículas

one-way ANOVA – análise de variância de uma via

P ζ – Potencial Zeta

RM78–N-benzil-2-((2E)-2-[1-(4-

hidroxifenil)etilideno]hidrazinil} carbonil)hidrazinacarboxamida

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

SiO₂NPs – nanopartículas de sílica

SNC – sistema nervoso central

SNP – sistema nervoso periférico

TEOS – tetraetilortossilicato

TFK – tampão fosfato

TG – Termogravimetria

ThT – Tioflavina T

TNB – ácido 2-nitro-tiobenzóico

UV-VIS – Espectroscopia na Região do Ultravioleta e Visível

β A – peptídeo beta amilóide

σ – desvio padrão

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	V
AGRADECIMENTOS	VI
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS	XIII
SUMÁRIO	XV
1. INTRODUÇÃO	18
2. Revisão da Literatura	20
2.1. Síntese da sílica	20
2.2. A doença de Alzheimer	21
2.2.1. Breve fisiologia e anatomia do Encéfalo	21
2.2.2. A sinapse	23
2.2.3. Etiologia e fisiopatologia da DA	24
2.2.4. Sintomas da DA	25
2.3. Teste enzimático	25
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivos gerais	27
3.2. Objetivos específicos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. Materiais	28
4.2. Síntese das nanopartículas	28
4.2.1. Síntese padrão	28
4.2.2. Otimização das condições de síntese	29
4.2.3. Síntese das Nanopartículas	30
4.3. Métodos de Caracterização	31
	16

4.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	31
4.3.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	32
4.3.3. Espectroscopia na região do Ultravioleta e do Visível (UV-Vis)	32
4.3.4. Espectroscopia Vibracional de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	33
4.3.5. Potencial Zeta ($P\zeta$)	33
4.3.6. Análise Termogravimétrica (TG)	33
4.4. Estudo da Estabilidade Coloidal	34
4.5. Preparação dos homogenatos encefálicos	35
4.6. Procedimento para a adsorção do RM78 nas SiO_2 NPs	35
4.7. Quantificação da atividade enzimática	36
4.8. Análise estatística	37
4.8.1. Contagem e estimativa do tamanho médio das partículas	37
4.8.2. Análise estatística dos testes enzimáticos	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	38
5.1.1. Estudo da influência da variação de EtOH no resultado da síntese	38
5.1.2. Estudo da variação da concentração de TEOS	40
5.1.3. Estudo da variação da concentração de NH_4OH	42
5.2. Análise qualitativa da estabilidade coloidal	44
5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	46
5.3.1. Sílica aminofuncionalizada (SiO_2-NH_2)	46
5.3.2. Sílica contendo RM78 (SiO_2-RM78)	46
5.4. Medidas de DLS	47
5.4.1. DLS da sílica pura (SiO_2)	47
5.4.2. DLS da sílica aminofuncionalizada (SiO_2-NH_2)	48
5.4.3. DLS da sílica com RM78 (SiO_2-RM78)	49

5.5. Estudo qualitativo da estabilidade coloidal das NPs	50
5.5.1. Estudo da estabilidade das SiO ₂ NPs	50
5.5.2. Estudo da estabilidade das SiO ₂ -NH ₂ NPs	50
5.6. Espectrometria no UV-Vis do compósito SiO ₂ -RM78	51
5.7. Espectroscopia no infravermelho (FTIR)	53
5.7.1. Sílica pura (SiO ₂)	53
5.7.2. Sílica carregada com RM78 (SiO ₂ -RM78)	54
5.8. Potencial Zeta	55
5.8.1. P ζ das SiO ₂ NPs	55
5.8.2. Potencial Zeta das SiO ₂ -RM78NPs	56
5.9. Termogravimetria	57
5.9.1. Análise térmica das SiO ₂ NPs	57
5.9.2. Análise térmica das SiO ₂ -RM78NPs	58
5.10. Estudo da atividade enzimática	59
6. CONCLUSÃO	61
7. REFERÊNCIAS	62

1. INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) atinge cerca de 5% das pessoas com idade entre 65 e 74 anos e essa população de idosos ao redor do mundo tem crescido substancialmente nos últimos anos [1,2]. Há projeções demográficas prevendo que por volta de 2050 a população de idosos será de aproximadamente dois bilhões de pessoas e, em vista disso é de grande importância estudar essa patologia [2]. A DA é a causa de 60 – 70 % dos casos de demência, age cronicamente e torna-se mais grave com o passar do tempo [3]. Estima-se que existam mais de 26 milhões de pessoas acometidas pela DA. Em média, a expectativa de vida dos pacientes é de 8 a 10 anos [1,3].

A DA caracteriza-se histopatologicamente pela grande perda sináptica e morte neuronal em diversas regiões encefálicas. As principais são: córtex cerebral, cerebelo e hipocampo [4]. Essas regiões apresentam problemas funcionais devido à produção do peptídeo β -Amilóide (β A), que por ser insolúvel (intra e extracelular) acaba se tornando um problema por se acumular e impedir o desenvolvimento correto das funções celulares [5]. A presença do β A compromete o funcionamento do sistema colinérgico, responsável pela síntese do neurotransmissor acetilcolina (ACh). A concentração de ACh é reduzida devido ao aumento na taxa de hidrólise (atividade colinesterásica) realizada pela enzima acetilcolinesterase (AChE). Juntamente com a presença do β A essa redução na concentração da ACh manifesta-se principalmente pelas conhecidas perda de memória e dificuldade de adquirir novas memórias [6].

Atualmente existem alguns compostos que potencialmente possuem atividade anticolinesterásica que podem melhorar a situação cognitiva de uma pessoa acometida pela DA. Apesar disso, esses compostos também apresentam alguns efeitos colaterais, como por exemplo: alta hepatotoxicidade, desconfortos gastrointestinais, náuseas, dentre outros. A intensidade dos efeitos colaterais intensifica-se conforme a tolerância de cada paciente, conforme afirma Engelhardt, Elias, et al. (2005) [7,8]. Dessa maneira é necessária a busca por novos compostos que sejam simultaneamente eficazes no tratamento e que apresentem pouco (ou nenhum) efeito adverso. A princípio a eficácia de novos compostos é avaliada em testes *in vitro*, de modo que o composto apresentado neste trabalho será estudado dessa maneira. Entretanto o composto em questão não apresenta a solubilidade requerida para ser estudado, sendo assim, não é possível avaliar diretamente sua possível atividade anticolinesterásica.

Como proposta para resolver o problema apresentado no parágrafo anterior tem-se os materiais nanoparticulados. Com o rápido avanço da medicina e da nanotecnologia, tornou-se possível incorporar componentes biológicos a nanomateriais dando origem a novos métodos de diagnósticos e tratamentos de patologias [9]. Uma das propostas para o tratamento da DA está no emprego de nanopartículas (NPs) como suporte para compostos com potencial para o tratamento da DA. Em relação às NPs, diversas composições são exploradas na literatura e as principais são: TiO_2 , SiO_2 e ZnO [10]. As partículas de SiO_2 apresentam boa biocompatibilidade e em escala nanométrica também apresentam boa estabilidade térmica, grande área superficial e uma boa estabilidade coloidal em meio aquoso [11,12]. A estabilidade química das nanopartículas de sílica (SiO_2 NPs) é tal que é possível modificar sua superfície com diversos grupos funcionais de modo a torná-la multifuncional. Além disso, as SiO_2 NPs ainda podem servir como suporte para compostos orgânicos e moléculas bioativas [11].

Napierska et al. 2009 estudaram a toxicidade de SiO_2 NPs amorfas monodispersas com tamanhos variando de 16 até 355 nm. Foi detectada uma citotoxicidade fortemente dependente do tamanho das NPs. As partículas menores apresentaram uma toxicidade significativamente maior e afetaram as células expostas mais rapidamente [12]. Yuet al. também examinaram a citotoxicidade das SiO_2 NPs amorfas e verificaram que com o diâmetro variando no intervalo de 30 a 48 nm houve maior citotoxicidade do que quando as dimensões variavam entre 118 e 535 nm [13]. De maneira semelhante, Nabeshiet et al. 2010 estudaram a dependência da citotoxicidade com o tamanho das amostras de SiO_2 NPs amorfas nas faixas de 70, 100 e 300 nm. Os testes revelaram que as menores partículas apresentaram maior citotoxicidade e inibiram a proliferação celular [14].

Como exemplo da aplicabilidade biomédica direta e indireta das SiO_2 NPs, há o caso de partículas nanométricas de óxido de ferro recobertas com SiO_2 e Tioflavina T (ThT), onde o ThT é um corante fluorescente não tóxico que se liga ao βA relatado por Tsolakis, Apostolos C., et al., 2017. O trabalho ainda confirma o potencial de seu compósito para algumas aplicações: mapeamento magnético, mapeamento por fluorescência *drug delivery*[15]. Também foi relatado que SiO_2 NPs funcionalizadas podem atuar tanto na detecção quanto na remoção de íons Cu^{2+} . Esses íons exercem influência na patogênese de doenças como a Síndrome de Menkes, Doença de Wilson e DA [16]. Y. Zhang et al. 2010 conseguiram carregar SiO_2 NPs com o composto Telmisartan. A adsorção foi confirmada por estudo de adsorção de nitrogênio [17]. Yang, Lecong et al. 2016 demonstraram o bom

desempenho das SiO₂NPs contendo clioquinol (um quelante de metal) em inibir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas ROS são resultado da presença de íons metálicos que ajudam na formação de agregados βA – um dos principais indicativos da DA [18].

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Síntese da sílica

A sílica tem proeminente posição na pesquisa científica devido a suas diversas aplicações. Stöber et al. em 1968 relataram um método pioneiro para a síntese de partículas nanométricas [19]. O método baseia-se numa solução contendo um silicato (geralmente o tetraetilortossilicato, TEOS – Si(OR)₄), álcool e um catalisador (ácido ou básico). As reações se dão pelo surgimento de um grande número de partículas primárias através de nucleação num período chamado período de indução, onde a solução se encontra supersaturada. Essas partículas primárias se agregam para formar partículas estáveis. Após o período de indução qualquer partícula primária formada será consumida no processo de crescimento das partículas estáveis. Isso resulta em partículas altamente monodispersas e esféricas [20].

As reações que regem esse processo são a hidrólise e a condensação. No processo de hidrólise, acontece a substituição de um grupo etóxi por uma hidroxila no silicato, como indicado na Figura 1:

Figura 1 – Representação da hidrólise (condensação) durante o processo de síntese das partículas de sílica.



Fonte – Paik, Un Gyu, et al., 2011 [21].

Imediatamente o produto intermediário formado, Si(OR)₃OH, sofre condensação. A condensação pode ser de dois tipos (Figura 2):

- 1) Alcoólica: o intermediário Si(OR)₃OH reage com uma molécula de TEOS formando pontes siloxano e álcool;
- 2) Aquosa: o intermediário Si(OR)₃OH reage com outra molécula de Si(OR)₃OH formando pontes siloxano e água;

Figura 2 – Tipos de condensação que ocorrem durante a síntese das partículas de sílica. Condensação gerando álcool (em cima); condensação gerando água (em baixo).



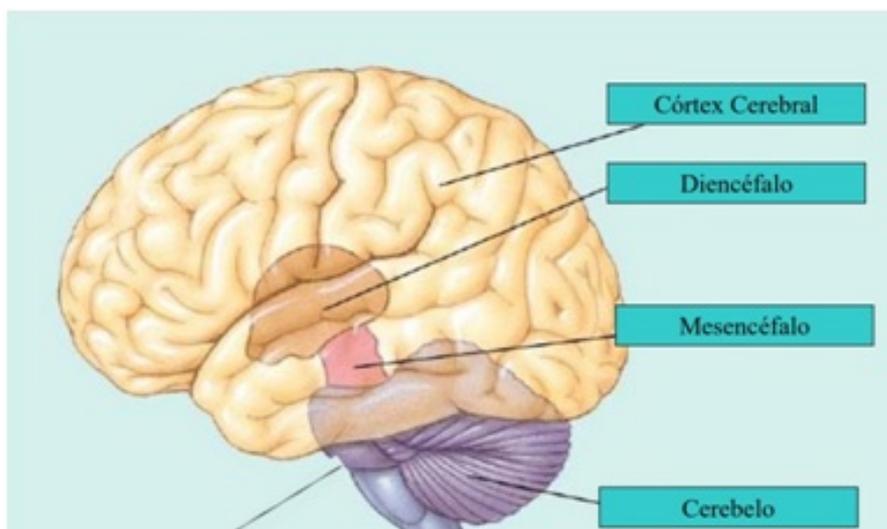
Fonte – Paik, Un Gyu, et al., 2001 [21].

2.2. A doença de Alzheimer

2.2.1. Breve fisiologia e anatomia do Encéfalo

O sistema nervoso produz e regula todos os aspectos funcionais do corpo humano, checando constantemente o meio interno e externo do corpo [22]. No que concerne a segmentação, o sistema nervoso pode ser dividido em: Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico (SNP). O SNC é aquele que se localiza dentro da cavidade craniana e do canal vertebral – o encéfalo e a medula espinhal, respectivamente. Já o SNP é aquele que se localiza fora daquele sistema – nervos e terminações nervosas [23].

Figura 3 – Anatomia encefálica simplificada.



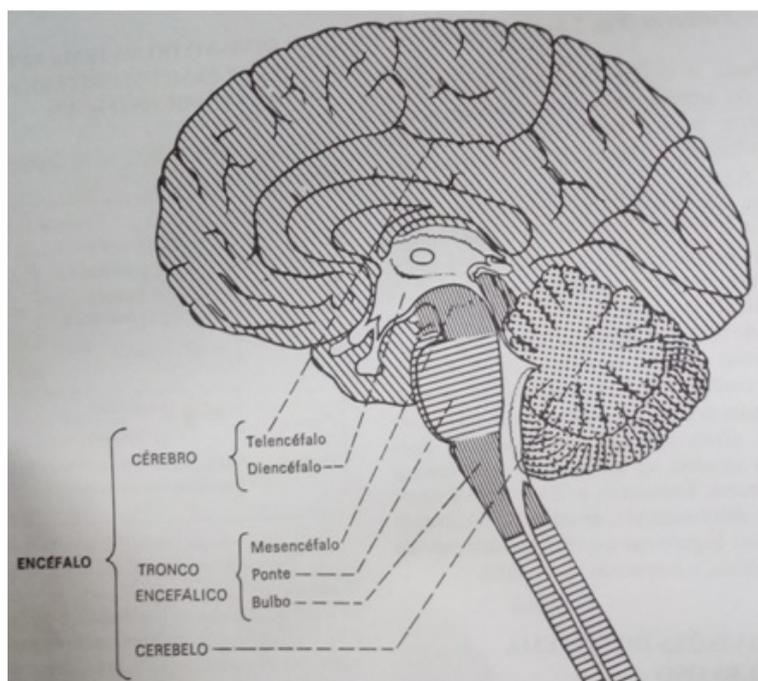
Fonte – Machado, A.. Neuroanatomia Funcional. 2º Ed.. Livraria Atheneu Editora. 2º Ed., 1993 [23].

O encéfalo pode ser dividido como apresentado na Figura 3. O córtex cerebral consiste de uma fina camada de substância cinzenta que varia de 1,5 a 3 mm de espessura. Essa camada, apesar da pouca espessura, contém 70% de todos os neurônios do cérebro [24].

Os neurônios que exercem funções semelhantes encontram-se reunidos em áreas corticais: motora, sensorial e associativa. A associação das mais diversas áreas corticais constitui a base para numerosas funções do cérebro, como por exemplo, o raciocínio lógico e criatividade [24].

O cerebelo é outra importante região encefálica. É responsável principalmente pelo processamento de informações vindas do aparelho vestibular e é considerado como parte do sistema motor. Ele coordena os movimentos harmoniosos, intencionais e sinérgicos. Essa coordenação é realizada com o auxílio do telencéfalo, como indicado na Figura 4 [24,25]

Figura 4 – Principais regiões do encéfalo e suas subdivisões.



Fonte – Machado, A.. Neuroanatomia Funcional. 2º Ed.. Livraria Atheneu Editora. 2º Ed., 1993.[23].

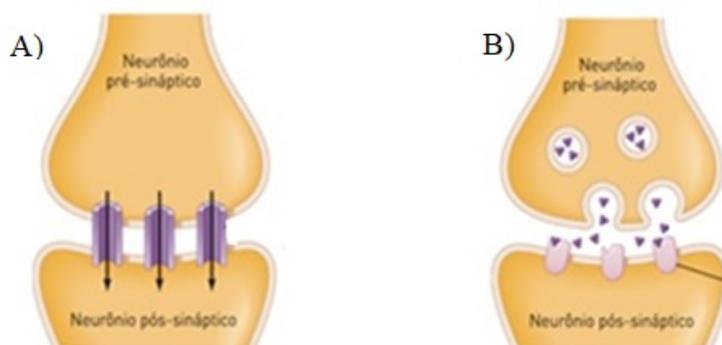
O hipocampo – que é parte do sistema límbico – possui importantes funções psíquicas relacionadas com o comportamento e memória. Além disso, os estímulos provenientes do sistema límbico influenciam diversas funções orgânicas subordinadas ao sistema nervoso autônomo (ex.: aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca) [24,23].

O tronco encefálico localiza-se entre a medula e o diencéfalo, na parte anterior ao cerebelo conectando a medula espinal com outras estruturas encefálicas. Na sua constituição estão corpos de neurônios agrupados em núcleos e fibras nervosas agrupadas em feixes denominados tratos, fascículos e lemniscos. No tronco encefálico estão importantes centros de controle respiratório e cardíaco [26]

2.2.2. A sinapse

Sinapse é o local onde as terminações axônicas se aproximam para a troca de informações. Esse espaço que separa as terminações dos neurônios chama-se fenda sináptica. As sinapses podem ser de dois tipos: elétrica ou química, assim como está esquematizado na Figura 5. No caso elétrico a comunicação entre as células ocorre basicamente através da troca de íons na fenda sináptica.

Figura 5 – Os diferentes tipos de sinapses. A: sinapse elétrica; B: sinapse química.



Fonte – Fonte – MOYES, C. D.; SCHULTE, P. M. Princípios de Fisiologia Animal. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 792p [27].

Quando a sinapse é química – o que constitui a maioria das sinapses interneuronais – a comunicação entre os elementos ocorre através da liberação de substâncias químicas, os chamados neurotransmissores [22]. No neurônio pré-sináptico o neurotransmissor é sintetizado. Ele é liberado na fenda sináptica e se difunde até o neurônio pós-sináptico onde a informação é entregue. Assim que o neurotransmissor é liberado novamente na fenda sináptica ele é hidrolisado e seu produto é reutilizado no neurônio pré-sináptico para sintetizar o neurotransmissor novamente, dando início a um novo ciclo. Os neurotransmissores mais conhecidos cuja manutenção se baseia nesse ciclo de síntese-hidrólise são: serotonina, dopamina, noradrenalina, adrenalina e a ACh [28,29].

No caso da ACh seu ciclo envolve duas enzimas: colina-acetiltransferase (ChAT) e a AChE. No neurônio pré-sináptico a ChAT catalisa a síntese de ACh. Após a informação ser passada para o neurônio pós-sináptico, ao ser liberada na fenda sináptica novamente, a ACh é hidrolisada pela AChE. Dos produtos dessa hidrólise – colina e acetato – a colina é transportada novamente para o neurônio pré-sináptico de modo a ser reutilizada numa nova síntese, reiniciando seu ciclo [30].

2.2.3. Etiologia e fisiopatologia da DA

Inicialmente a DA afeta a memória de curto prazo (região do hipocampo) e se estende para as áreas corticais de associação [31]. A princípio, pode-se diferenciar a DA de duas maneiras: a DA Familiar (DAF) e a DA Esporádica (DAE). No grupo da DAF estão pessoas acometidas pela doença antes dos 65 anos de idade. Já no grupo da DAE encontram-se pessoas acometidas pela doença após os 65 anos de idade. As características patológicas cerebrais incluem atrofia cortical, extensas perdas neuronais e depósitos fibrilares intra e extracelulares. Os depósitos intracelulares são os chamados emaranhados neurofibrilares e os depósitos extracelulares são conhecidos como placas senis [32,33].

O acúmulo do peptídeo β A (também conhecido como placas senis) é resultado de uma falha na hidrólise da Proteína Precursora Amilóide (APP) que é uma glicoproteína presente nas membranas neurais [5]. Ela pode ser hidrolisada por duas rotas distintas: a rota não-amiloidogênica e a rota amiloidogênica. Essas rotas diferem no que concerne a qual enzima irá realizar a hidrólise e em que região da proteína a hidrólise vai ocorrer. Na rota não-amiloidogênica o produto da quebra é solúvel e o organismo consegue lidar com o produto da hidrólise. Porém na rota amiloidogênica (que ocorre em neurônios disfuncionais) o produto dessa hidrólise passa por um segundo processo de hidrólise gerando o peptídeo β A. Como o β A é insolúvel no meio biológico ele começa a se acumular no meio extracelular dando origem as placas senis – a chamada teoria da cascata amilóide [34]. A presença das placas senis compromete o funcionamento do sistema colinérgico, de modo a desequilibrar a taxa de síntese/hidrólise da ACh, levando à diminuição de sua concentração na fenda sináptica [6]. Além disso, o aumento na concentração de β A leva ao desequilíbrio nos processos de (des)fosforilação da proteína Tau no interior da celular neuronal. Essa proteína é responsável pela estabilidade dos microtúbulos do citoesqueleto das células neuronais. A proteína Tau então sofre uma hiperfosforilação, o que faz com que ela perca sua afinidade com os microtúbulos e se acumule no corpo dos neurônios. Isso desestabiliza o citoesqueleto neuronal e prejudica ainda mais a transmissão neuronal [32]. Por fim, além da presença das placas senis no meio extracelular apresentarem alta toxicidade para as sinapses, a redução na concentração da ACh e a hiperfosforilação da proteína Tau acabam por comprometer a atividade neuronal [35, 6].

2.2.4. Sintomas da DA

Em termos dos processos atômico/moleculares citados anteriormente, os resultados são em geral a atrofia de regiões corticais onde se acumulam os β A. Essas são as regiões relacionadas com a memória, aprendizado e à emoção [34].

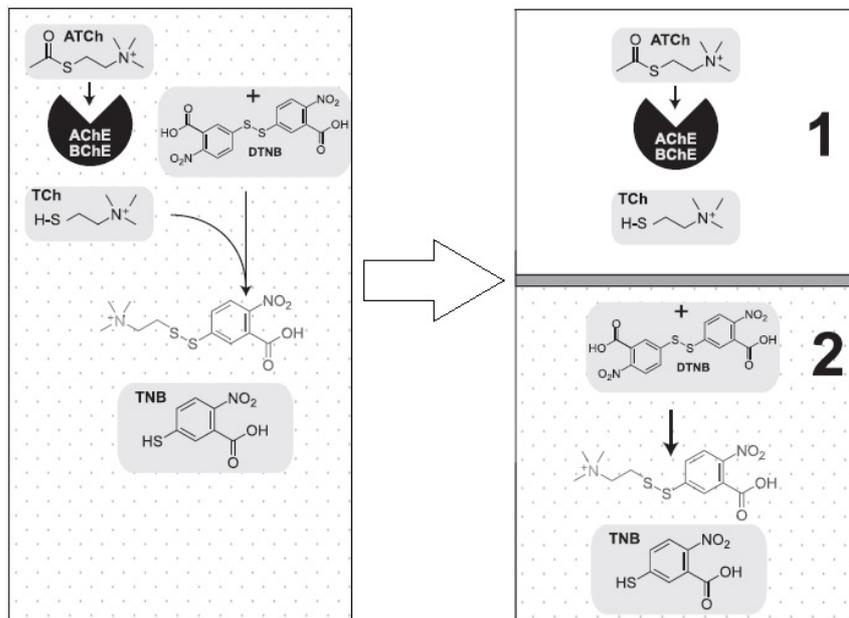
Portanto problemas de cognição (perda de memória recente, problemas para adquirir novos conhecimentos, dificuldade de julgamento e organização), depressão, desorientação espacial, problemas na comunicação, prejuízo das tarefas motoras, etc são fortes indícios de que a DA está em curso [36].

2.3. Teste enzimático

Para se estudar a atividade enzimática da AChE emprega-se o método de Ellman. Este método faz uso de um substrato de acetiltiocolina (AcSCh). Então se prepara um sistema de reação contendo AChE, AcSCh e DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)), tampão fosfato e iso-OMPA. A hidrólise da AcSCh realizada pela AChE gera como produto a tiocolina. Em seguida o grupo tiol (-SH) presente na tiocolina reage com o DTNB formando como produto o ácido 2-nitro-tiobenzóico (TNB), de coloração amarela. Portanto, o desempenho da AChE em hidrolisar AcSCh é medido de maneira indireta de acordo com a coloração amarela da solução – que se deve ao TNB formado – em unidades de $\mu\text{Mol de AcSCh/h/mg de proteína}$. Essa coloração é medida através da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 412 nm [37].

Apesar de ser rápido, preciso e barato, o teste de Ellman possui algumas limitações. O DTNB é sensível a luz, os grupos tiol (SH) podem interferir nas medidas e pode não ser possível medir atividades enzimáticas muito baixas. Com o intuito de eliminar algumas das limitações do método de Ellman, Dingova, Dominika et. al. 2014 propuseram a separação das duas reações que regem o ensaio de Ellman em duas etapas distintas [37]. Na primeira etapa a AcSCh é hidrolizada pela AChE produzindo tiocolina (sem a presença do DTNB). A segunda etapa consiste dos seguintes procedimentos: a) interromper a atividade da AChE através da adição ao meio de reação de um composto com atividade anticolinesterásica conhecida e b) na geração do TNB através da reação da tiocolina – formada na primeira etapa – com o DTNB adicionado ao meio de reação. O esquema de reação está apresentado na Figura 6.

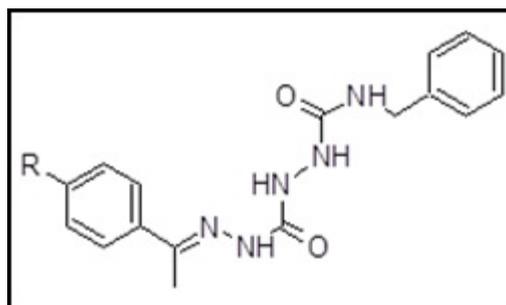
Figura 6 - Esquema do teste enzimático utilizado. À esquerda o procedimento padrão do método de Ellman. À direita o procedimento realizado conforme a alteração proposta por Dingova e Dominika.



Fonte – Dingova, Dominika et. al. 2014 [38].

A capacidade do composto RM78 de inibir a enzima AChE será investigada através desse método. A estrutura molecular do RM78 está representada na Figura 7.

Figura 7 – Estrutura molecular do composto RM78.



Fonte – INBIO, UFMS.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

O presente trabalho tem como objetivo a síntese, caracterização e aplicação de SiO₂NPs como suporte para o composto RM78 e investigação de sua atividade anticolinesterásica.

3.2. Objetivos específicos

- Síntese de NPs monodispersas de SiO₂ e SiO₂-NH₂;
- Caracterização das propriedades morfológicas, químicas e ópticas dos nanomateriais por MEV, DLS, UV-Vis, FTIR, Pζ, TG e estudo qualitativo de sua estabilidade coloidal;
- Avaliação da influência das SiO₂NPs sobre a atividade enzimática da AChE;
- Estudo quantitativo da adsorção do composto RM78 na superfície da sílica;
- Estudo da influência do compósito SiO₂-RM78 sobre a atividade enzimática da AChE.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

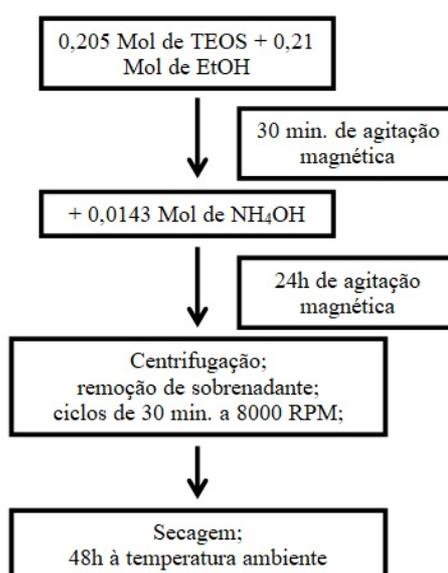
As nanopartículas foram sintetizadas pelo método de Stöber modificado a partir dos seguintes reagentes: Tetraetilortossilicato (TEOS) da marca Fluka com 98% de pureza, etanol (EtOH) da marca Dinâmica Química Contemporânea Ltda. com 99,5% de pureza, hidróxido de amônio (NH₄OH) da marca Dinâmica Química Contemporânea Ltda (o grau de pureza varia de 28 a 30%) e 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES). Já o fármaco utilizado – RM78, sintetizado no Laboratório de Bioquímica Geral e de Microorganismos da UFMS[38] –é um novo composto que faz parte da família de compostos que apresentam amplo perfil farmacológico de grande interesse industrial, farmacêutico e biológico. Dentre suas propriedades conhecidas pode-se mencionar: antioxidante, antiviral, antifúngica e diversas outras [39,40].

4.2. Síntese das nanopartículas

4.2.1. Síntese padrão

A rota sintética utilizada para a obtenção das partículas de sílica foi a mesma empregada na literatura [41]. O fluxograma está apresentado na Figura 8 em maior detalhe.

Figura 8– Descrição do procedimento padrão empregado para a síntese das NPs e seus valores (em Mol) utilizados na síntese.



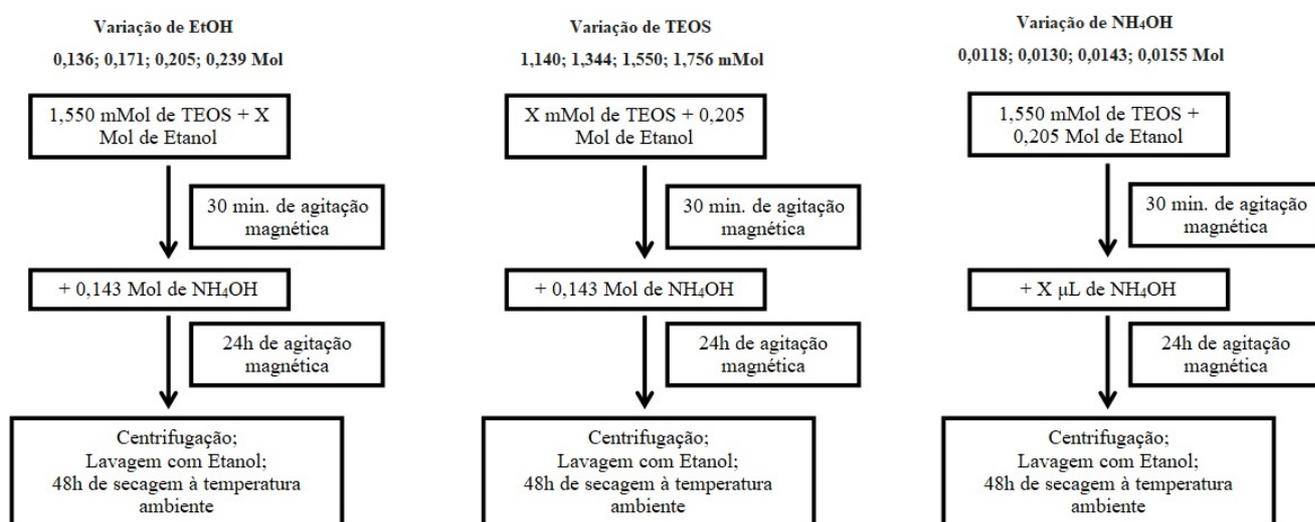
Fonte – Próprio autor.

4.2.2. Otimização das condições de síntese

Com o intuito de conhecer a influência dos reagentes no resultado da síntese e também para se obter a amostra mais adequada para o presente trabalho, foram realizadas sínteses com diferentes volumes dos reagentes (os demais parâmetros da síntese como temperatura, pressão, dentre outros, foram mantidos constantes). Variou-se o volume de um reagente por vez, mantendo-se os demais constantes.

Foram realizadas sínteses com variações: TEOS (1,140; 1,344; 1,550; 1,756 mMol), EtOH (0,136; 0,171; 0,205; 0,239 Mol) e NH_4OH (0,0118; 0,0130; 0,0143; 0,0155 Mol), como ilustrado em maiores detalhes no fluxograma da Figura 9.

Figura 9 – Procedimentos para as sínteses de otimização dos parâmetros de reação. a) variação de EtOH; b) variação de TEOS; c) variação de NH_4OH .

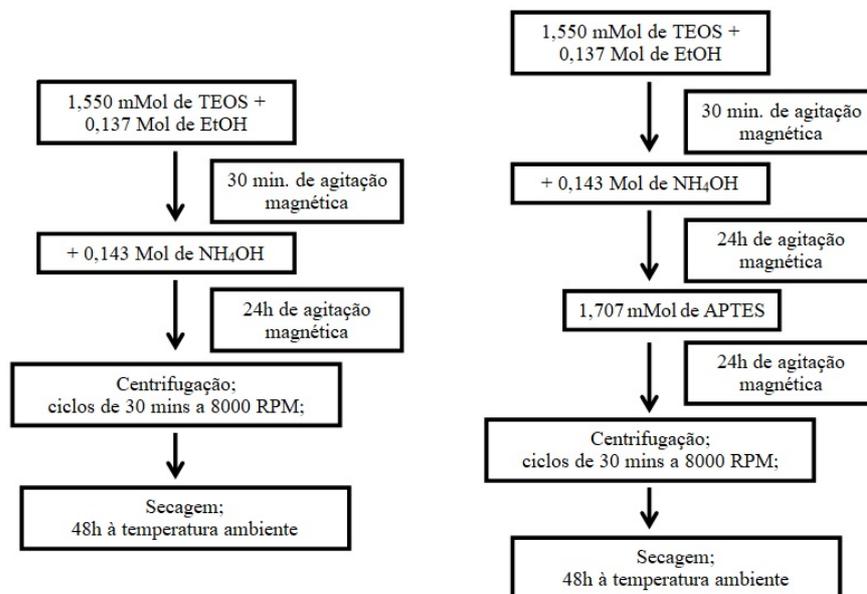


Fonte – Próprio autor.

4.2.3. Síntese das Nanopartículas

Foram sintetizadas amostras de SiO_2NPs pura e $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{NPs}$. As $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{NPs}$ também foram realizadas segundo reportado em [41]. Na Figura 10 está o fluxograma dos procedimentos para a síntese de cada uma das amostras de NPs.

Figura 10 – Mol de reagentes e tempos empregados na síntese das SiO_2NPs (à esquerda) e das $\text{SiO}_2\text{-NH}_2\text{NPs}$ (à direita).



Fonte – Próprio autor.

4.3. Métodos de Caracterização

4.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura fornece imagens constituídas pela contagem de elétrons gerados pela interação de um feixe de elétrons e a amostra. Os elétrons de baixa energia (< 50 eV; elétrons secundários) influenciam na alta resolução da imagem formada. Já os elétrons retroespalhados (> 50 eV) por serem gerados muito próximos à superfície fornecem informações a respeito da topografia da amostra [42]

As imagens de MEV foram obtidas através de um equipamento da marca Jeol JSM-6380 LV operando com 20 kV no Laboratório Multiusuário do Instituto de Física da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (MULTILAM). As SiO_2 NPs e SiO_2 - NH_2 NPs foram suspensas em álcool isopropílico *via* ultrassom por 5 minutos e em seguida recobertas com uma fina camada de Au *via* sputtering por 5 minutos em vácuo de 200 mTorr em um equipamento Denton Vacuum Desk III. As SiO_2 -RM78NPs foram suspensas em água deionizada *via* ultrassom durante 5 minutos e em seguida foram recobertas com uma fina camada de Au sob as mesmas condições que as SiO_2 NPs e SiO_2 - NH_2 NPs. As amostras foram analisadas em suporte de silício e as ampliações utilizadas nas imagens foram de 10K, 20K, 30K, 50K. Para cada uma das amostras as contagens foram realizadas a partir de 4 imagens geradas por MEV e a quantidade de diâmetros contada foi em média de 150.

4.3.2. Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

As análises de DLS foram feitas de modo a se encontrar o valor do diâmetro médio das partículas. Isso é feito através da determinação do diâmetro hidrodinâmico das partículas em suspensão pelo espalhamento da luz decorrido do movimento Browniano das partículas. Essa técnica também fornece informações a respeito da distribuição de tamanhos das partículas através do índice de polidispersividade (PdI), que se refere a variedade do tamanhos da amostra relativo à sua distribuição por intensidade. Os valores de PdI variam entre 0 e 1 e quanto menor for esse valor mais monodispersa será a amostra[43]. As medidas foram realizadas em um equipamento Zetasizer Nano ZS da marca Malvern no Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. O ensaio foi realizado em três varreduras com cada uma possuindo duração de 1 min.

4.3.3. Espectroscopia na região do Ultravioleta e do Visível (UV-Vis)

As absorções na região do ultravioleta e no visível dependem da estrutura eletrônica de uma molécula e, devido à sobreposição com subníveis rotacionais e vibracionais, seu aspecto é de uma banda larga. O centro da banda de absorção corresponde ao comprimento de onda da radiação cuja energia é igual à necessária para promover uma transição eletrônica na molécula.

O processo se inicia quando a luz passa através da amostra e uma parte promove a transição eletrônica (absorção), onde a outra parte é transmitida. A luz transmitida pode ser expressa tanto como transmitância quanto como absorbância. A transmitância é dada pela relação entre as intensidades de luz incidente e transmitida: $T = I/I_0$ e a absorbância relaciona-se com a transmitância pela seguinte relação matemática: $A = \log(1/T) = -\log(T)$. Porém a maneira mais comum de avaliar o espectro de UV-Vis é através da lei de Lambert-Beer que relaciona o caminho que a luz percorre na amostra (b), a concentração (c) e a absorvidade (ϵ , uma propriedade da amostra) com a absorbância pela seguinte equação [44]:

$$A = bc\epsilon = \log(I_0/I)$$

As medidas foram feitas no Laboratório de Óptica e Fotônica (LOF) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul em um equipamento PerkinElmer modelo Lambda 265 utilizando comprimento de onda no intervalo de 200 a 900 nm.

4.3.4. Espectroscopia Vibracional de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A técnica de FTIR é empregada para a identificação de grupos funcionais. Quando um material é exposto à radiação infravermelha e a frequência da radiação incidente torna-se igual à frequência de vibração da molécula, transições vibracionais/rotacionais podem ocorrer no material. A faixa do espectro eletromagnético empregada na técnica corresponde à do infravermelho médio – 2,5 até 25 μm . O espectro de infravermelho apresenta no eixo da abscissa a posição de seus picos/bandas localizados por seu valor de número de onda ($\bar{\nu}$), obtido a partir do comprimento de onda da radiação utilizada pela seguinte relação matemática:

em unidades de cm^{-1} [44]. As medidas foram realizadas por refletância total atenuada (ATR – *Attenuated Total Reflection*) com 10 varreduras num equipamento Spectrum 100 da marca PerkinElmer, do Laboratório de Óptica e Fotônica (LOF) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

4.3.5. Potencial Zeta (P ζ)

O potencial Zeta (P ζ) mede o potencial no plano de cisalhamento entre a superfície das partículas e o meio circundante (no caso água). As medidas foram realizadas através da introdução de uma suspensão da amostra dispersa em água em uma cuba contendo dois eletrodos, onde as partículas com carga tendem a se mover na direção do eletrodo com carga oposta. No entanto, a viscosidade do meio se opõe a esse movimento e, então, quando essas forças se equilibram a velocidade das partículas (mobilidade eletroforética) é constante. Logo, a partir da medida da mobilidade eletroforética, pode-se obter o valor do potencial ζ [45]. As medidas foram realizadas em um equipamento Zetasizer Nano ZS da marca Malvern, no Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

4.3.6. Análise Termogravimétrica (TG)

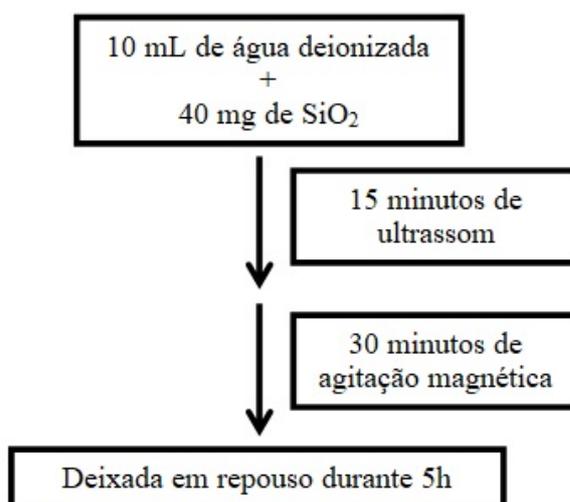
A técnica fornece informações acerca da composição e estabilidade térmica. Os métodos termogravimétricos podem ser divididos em: isotérmico, quase-isotérmico e dinâmico. No método isotérmico a variação de massa da amostra é registrada em função do tempo em dada temperatura fixa. Para o método quase-isotérmico no momento em que a amostra começa a perder massa a temperatura é mantida constante até que a massa se estabilize e quando isso ocorre o aquecimento é retomado. Esse procedimento se repete em cada etapa da decomposição térmica. No procedimento de termogravimetria dinâmico a perda de massa da amostra é registrada continuamente à medida que a temperatura aumenta a uma razão constante ou linear [46]. No presente trabalho o método empregado foi o dinâmico. As

medidas foram realizadas em atmosfera de ar sintético, com um aumento de temperatura de 10 °C por minuto até 900 °C em um aparelho *TA Instruments* e modelo TGA Q50, no Instituto de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

4.4. Estudo da Estabilidade Coloidal

De modo a testar a atividade do compósito SiO₂-RM78 é bastante importante que as SiO₂NPs sejam solúveis em meio aquoso e apresentem uma boa estabilidade coloidal – no mínimo 5h (tempo de realização do teste de atividade enzimática). Satisfeitas essas condições, o teste enzimático poderá ser realizado da maneira correta. Para investigar a estabilidade coloidal das amostras em água de maneira qualitativa, um béquer de 50 mL contendo 10 mL de água deionizada foi utilizado. Em seguida, 40 mg de amostra foram pesadas e adicionadas ao béquer com água. O béquer contendo a solução foi sonificado por 15 minutos e em seguida foi submetido a 30 minutos de agitação magnética. Terminadas as etapas de homogeneização, a solução foi deixada em repouso durante 5h. O esquema segue apresentado na Figura 11. Ao término das 5 h, cada amostra foi fotografada e avaliada qualitativamente quanto aos precipitados formados e quanto à turbidez da solução.

Figura 11 – O volume de água, massa de amostra e os tempos empregados no procedimento para o estudo da estabilidade coloidal das amostras.



Fonte – Próprio autor.

4.5. Preparação dos homogenatos encefálicos

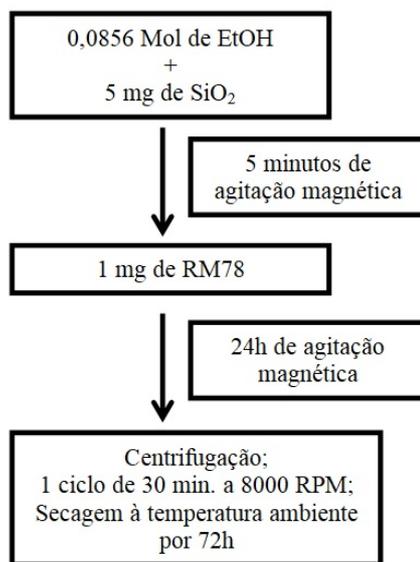
O encéfalo foi removido e lavado com tampão Tris HCl para evitar a contaminação por AChE sanguínea. O cerebelo, estriado, hipocampo e córtex foram cada um removidos e

transferidos para tubos de ensaio com tampão Tris HCl e homogeneizados em Potter de vidro. O processo de centrifugação dos homogenatos foi constituído de um ciclo de 15 minutos a 2500 RPM. Os sobrenadantes foram utilizados para os testes enzimáticos.

4.6. Procedimento para a adsorção do RM78 nas SiO₂NPs

O método de adsorção empregado foi semelhante ao proposto por Shen, Jianan, et al. 2011 [47]. Foram separados 5 mg de SiO₂NPs que, em seguida, foram suspensas em 0,0856 Mol de EtOH num béquer de 10 mL. O béquer contendo a solução alcoólica de SiO₂NPs foi mantido sob agitação magnética durante 5 minutos. Transcorrido esse período, 1 mg de RM78 foi adicionado à solução, obtendo-se uma solução a 0,2 mg/mL de RM78. A nova solução foi mantida em agitação magnética durante 24h e, em seguida, centrifugada a 8000 RPM durante 30 minutos. O sobrenadante foi separado e guardado para posterior estudo e a amostra decantada foi mantida na capela a temperatura ambiente para secagem durante 3 dias. O fluxograma do procedimento está representado na Figura 12.

Figura 12: Procedimento para a adsorção do composto RM78 na superfície das SiO₂NPs. O procedimento foi baseado no modelo proposto por Shen, Jianan, et al. 2011.



Fonte - Próprio autor

4.7. Quantificação da atividade enzimática

Nos homogenatos obtidos, além da AChE, pode haver a presença da butirilcolinesterase (BChE) nos homogenatos. Essa proteína também tem a capacidade de hidrolisar o substrato de AcCSh, o que levaria a informações imprecisas a respeito da

atividade da AChE, visto que não é possível distinguir a atividade das enzimas. Então se faz uso do composto iso-OMPA de modo a inibir a atividade da BChE.

Inicialmente o procedimento envolve a preparação do “branco”: uma solução contendo tampão fosfato (TFK), água, iso-OMPA e amostra da enzima AChE. Esta solução foi sujeita a uma incubação de 30 minutos. Em seguida é adicionada a essa solução o substrato de AcSCh e a nova solução é levada para incubação por 10 minutos. Após essas etapas adiciona-se Neostigmina e DTNB. A Neostigmina é o composto anticolinesterásico empregado para finalizar a primeira etapa do teste. O DTNB é adicionado para que a tiocolina formada passe por mais uma reação de modo a formar o ânion amarelo 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB). A concentração desse ânion é diretamente proporcional a atividade da AChE. A leitura dos dados fornecidos pelos testes foi realizada em uma Leitora Automática de Microplacas de 96 Poços TP-READER-BASIC no INBIO, UFMS.

4.8. Análise estatística

4.8.1. Contagem e estimativa do tamanho médio das partículas

Foi feita a estimativa do tamanho individual de várias partículas através do software ImageJ. Com esses valores foi construído um histograma no qual uma Gaussiana foi fitada de modo a se obter o valor do diâmetro médio das partículas (d_M) e seu desvio padrão (σ); feito com o auxílio do software Origin Lab 8.5. Conhecendo esses valores, foi possível obter o valor da dispersão da distribuição de tamanhos, dado pela razão d_M/σ (também conhecido como coeficiente de variação, c_v). Esse procedimento foi feito para todas as amostras com base em 4 imagens geradas por MEV como mencionado na seção 4.3.1.

4.8.2. Análise estatística dos testes enzimáticos

Os resultados obtidos através dos ensaios enzimáticos *in vitro* foram analisados através da análise de Variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett. A análise de variância compara as médias de diferentes grupos independentes (no caso as diferentes concentrações de SiO₂NPs e SiO₂-RM78NPs empregadas) com a média do grupo controle (sistema de reação sem as NPs).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na PARTE I, são apresentados os resultados que servem de base para a escolha da síntese que fornece a amostra mais adequada para ser empregada no auxílio do estudo da atividade enzimática. As amostras foram obtidas a partir da variação de parâmetros esquematizada na Figura 9. Na PARTE II, após a escolha da síntese mais adequada – representada na Figura 10 –, são apresentados os resultados das demais etapas.

PARTE I

5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Estão apresentados na Tabela 1 os volumes das sínteses realizadas com o intuito de otimizar as condições de síntese.

Tabela 1: A otimização dos parâmetros de síntese foi feita através da realização de diversas sínteses. Na tabela estão a identificação das amostras e a quantidade (em Mol) dos reagentes para cada síntese realizada.

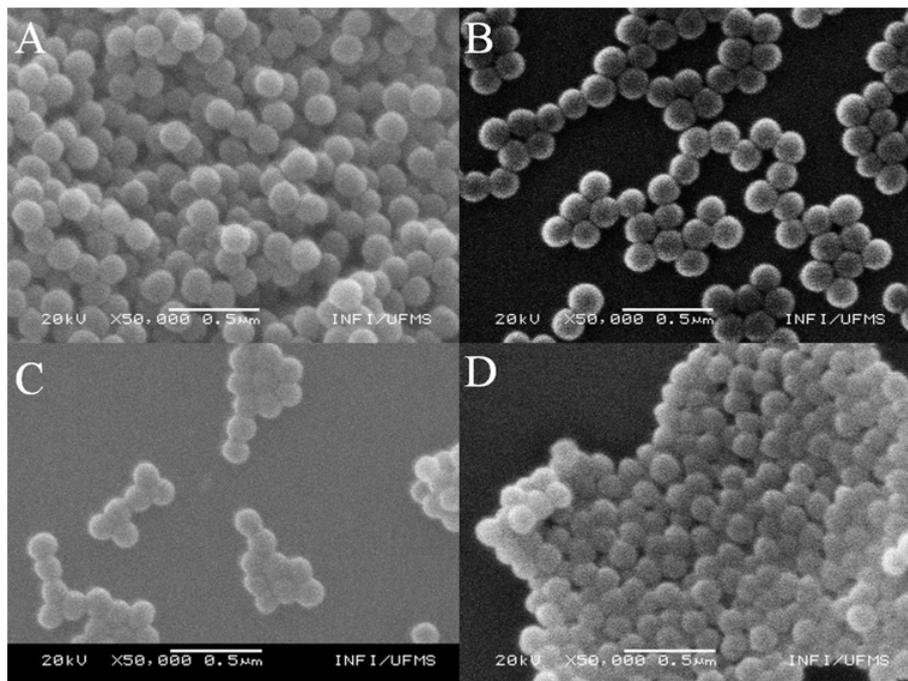
NOME DA AMOSTRA	EtOH (Mol)	TEOS (10^{-3} Mol)	NH ₄ OH (Mol)
am08	0,137	1,550	0,014
am10	0,171	1,550	0,014
am12	0,205	1,55	0,014
am14	0,239	1,550	0,014
am280	0,205	1,143	0,014
am330	0,205	1348	0,014
am380	0,205	1,348	0,014
am430	0,205	1,757	0,014
am470	0,205	1,348	0,012
am520	0,205	1,348	0,013
am570	0,205	1,348	0,014
am620	0,205	1,348	0,015

Fonte – Próprio autor.

5.1.1. Estudo da influência da variação de EtOH no resultado da síntese

Como pode ser visto na Figura 13, as partículas sintetizadas com diferentes concentrações de EtOH – mantendo-se o número de Mols dos demais reagentes constantes – apresentam natureza nanométrica e geometria esférica.

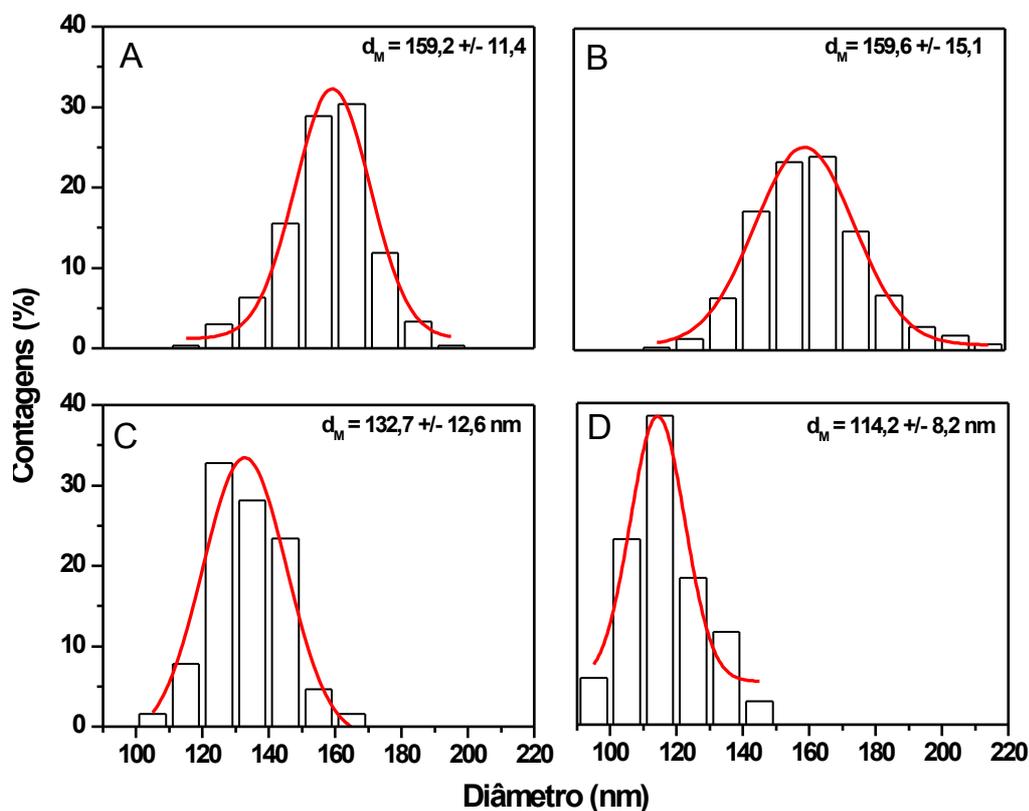
Figura 13 – MEV das partículas sintetizadas com diferentes volumes de EtOH. A: amostra am08 (0,136 Mol EtOH); B: amostra am10 (0,171 Mol EtOH); C: amostra am12 (0,205 Mol EtOH); D: amostra am14 (0,239 Mol EtOH).



Fonte – MULTILAM, UFMS.

Contudo, como pode ser observado nos histogramas da Figura 14, o tamanho das NPs variou. Segundo Ismail Ibrahim et al. 2010, isso se deve ao fato de que para diferentes volumes de EtOH para o mesmo volume de TEOS, significa também uma variação de concentração de TEOS [48]. Conforme o volume de EtOH aumenta isso leva a uma diminuição na concentração de TEOS. Dessa maneira os processos de hidrólise e condensação acontecem mais lentamente, tal que o período de nucleação é maior e ocorre a formação de mais núcleos, de modo que as partículas formadas são menores [20]. A Tabela 2 apresenta os diâmetros médios ao lado de seus respectivos valores de sigma.

Figura 14 – Histogramas das partículas sintetizadas com diferentes volumes de EtOH. Onde d_m = diâmetro médio. A: amostra am08 (0,136 Mol EtOH); B: amostra am10 (0,171 Mol EtOH); C: amostra am12 (0,205 Mol EtOH); D: amostra am14 (0,239 Mol EtOH).



Fonte – Próprio autor.

Tabela 2: Diâmetro médio das partículas sintetizadas com diferentes volumes de EtOH bem como seus respectivos valores de dispersão (c_v).

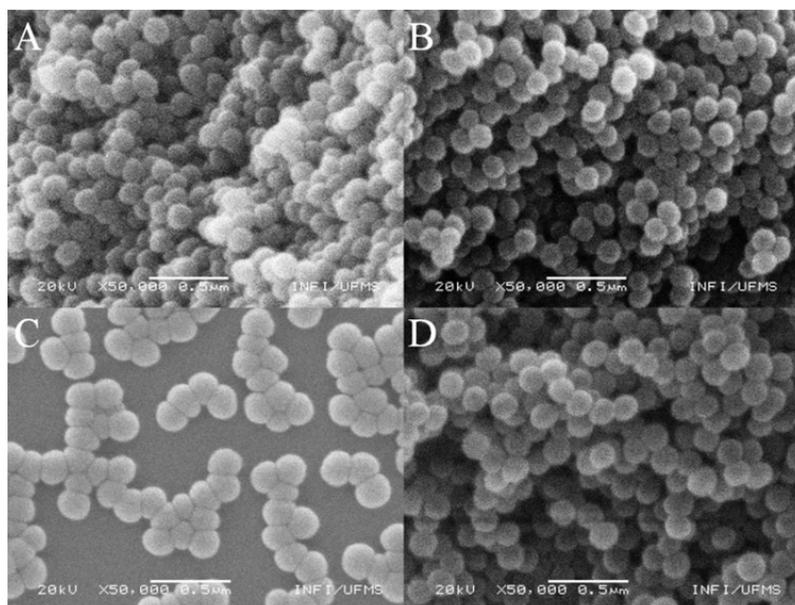
AMOSTRA	DIÂMETRO MÉDIO (nm)	DISPERSÃO (%)
am08	$159,2 \pm 11,4$	7,1
am10	$159,6 \pm 15,1$	9,4
am12	$132,7 \pm 12,6$	9,4
am14	$114,2 \pm 8,2$	7,1

Fonte – Próprio autor.

5.1.2. Estudo da variação da concentração de TEOS

Nesta etapa, foram preparadas amostras utilizando 04 valores diferentes de Mols de TEOS. A Figura 15 revela que em sua maior parte as partículas conservam sua geometria esférica. As partículas são novamente nanométricas, apesar de que nem todas apresentam uniformidade na sua geometria.

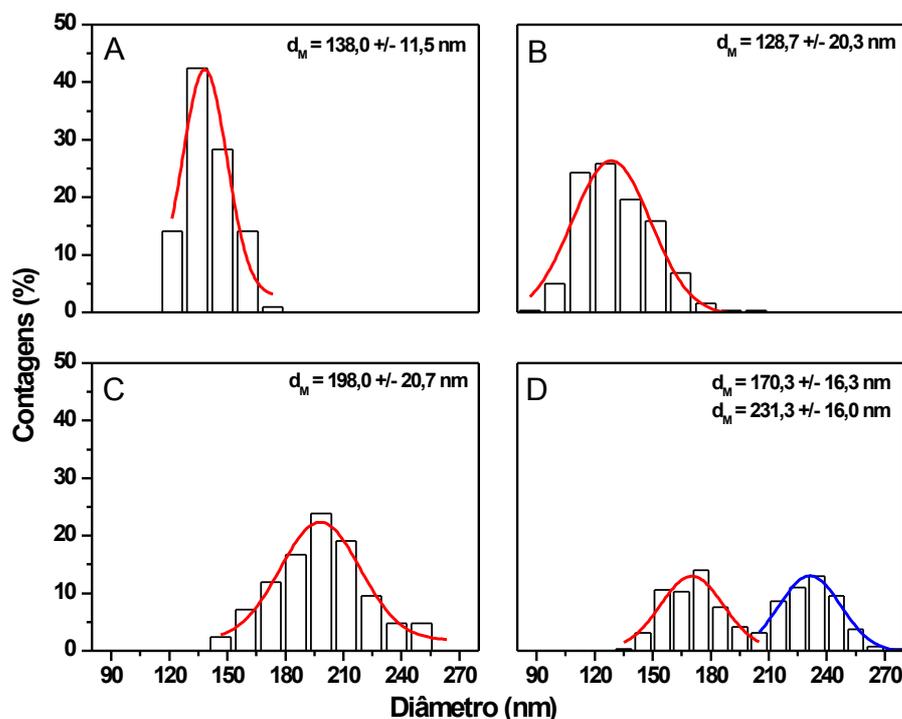
Figura 15 – MEV das partículas sintetizadas com diferentes volumes de TEOS. A: amostra am280 (1,140 mMol TEOS); B: amostra am330 (1,344 mMol TEOS); C: amostra am380 (1,550 mMol TEOS); D: amostra am430 (1,756 mMol TEOS).



Fonte – MULTILAM, UFMS.

O aumento no volume de TEOS (e por consequência na sua concentração) leva a um aumento na velocidade dos processos de hidrólise e condensação, uma redução no período de nucleação e a formação de um número menor de núcleos. Os núcleos formados então se aglomeram para a formação de partículas maiores e mais estáveis, assim aumentando o tamanho final das partículas [19]. Os histogramas estão apresentados na Figura 16. A partir das contagens realizadas para a amostra am430, esta apresentou uma distribuição bimodal. Uma possível explicação para a distribuição bimodal apresentada é que quando a sílica atinge certo tamanho no período de indução, o TEOS presente na reação torna-se um excesso para o reagente limitante o que leva a uma rápida hidrólise do silicato. Dessa maneira, devido ao excesso de silicato, as reações de hidrólise produzem novos núcleos entre as partículas de sílica já formadas, levando à distribuição bimodal apresentada [49]. Os valores de c_v estão apresentados na Tabela 3.

Figura 16 – Histogramas das partículas sintetizadas com diferentes volumes de TEOS. Onde d_m = diâmetro médio. A: amostra am280 (1,140 mMol TEOS); B: amostra am330 (1,344 mMol TEOS); C: amostra am380 (1,550 mMol TEOS); D: amostra am430 (1,756 mMol TEOS).



Fonte – Próprio autor.

Tabela 3: Diâmetro médio das partículas sintetizadas com diferentes volumes de TEOS bem como seus respectivos valores de dispersão (c_v).

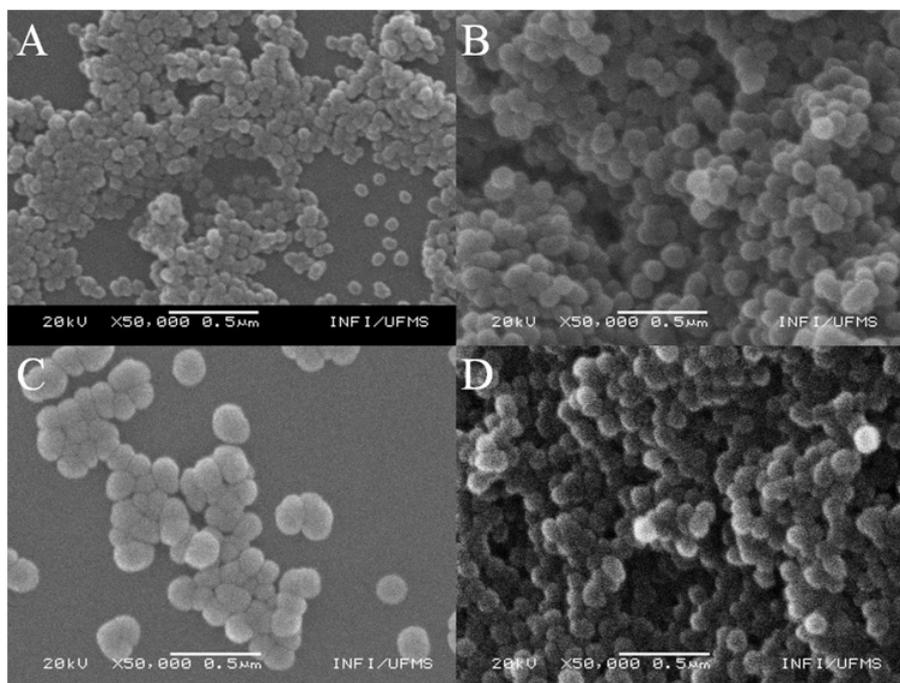
AMOSTRA	DIÂMETRO MÉDIO (nm)	DISPERSÃO (%)
am280	138,0 ± 11,5	8,3
am330	128,7 ± 20,3	15,7
am380	198,0 ± 20,7	10,4
am430	170,3 ± 16,3 213,3 ± 16,0	9,5 // 6,9

Fonte – Próprio autor.

5.1.3. Estudo da variação da concentração de NH_4OH

Na Figura 17 pode ser observado que novamente a natureza nanométrica das partículas é conservada ao variar os volumes de NH_4OH . Contudo em algumas imagens de microscopia as partículas parecem se fundir perdendo parte de sua geometria esférica.

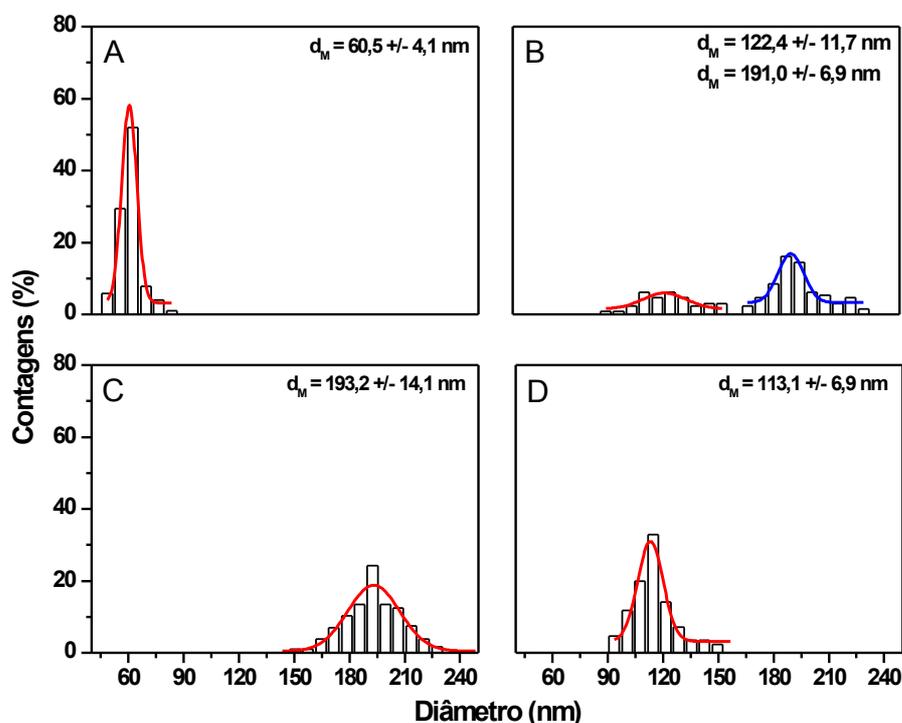
Figura 17 – MEV das partículas sintetizadas com diferentes volumes de NH_4OH . A: amostra am470 (0,0118 Mol NH_4OH); B: amostra am520 (0,0130 Mol NH_4OH); C: amostra am570 (0,0143 Mol NH_4OH); D: amostra am620 (0,0155 Mol NH_4OH).



Fonte – MULTILAM, UFMS.

O histograma apresentado na Figura 18 revela partículas menores. Pode-se atribuir a este fato razões semelhantes às daquelas da variação de Mols de TEOS. Conforme a concentração de NH_4OH (catalisador) aumenta, a taxa de hidrólise e condensação aumenta, o período de nucleação diminui e ocorre a formação de um número pequeno de núcleos. Então esses núcleos se aglomeram para formar partículas maiores e estáveis [20]. Para a distribuição bimodal apresentada pela amostra am520, pode ter acontecido que os Mols de TEOS utilizados – em conjunto com os Mols de NH_4OH empregados para esta amostra – tenha se tornado insuficiente tanto para predominantemente reduzir o período de nucleação (formando partículas menores) quanto para predominantemente aumentar o período de nucleação (formando partículas maiores). Dessa maneira as duas possibilidades coexistiram de modo a gerar dois grupos de partículas com diâmetro médio diferente[49]. Os valores de sigma para cada uma das sínteses estão na Tabela 4.

Figura 18 – Histogramas das partículas sintetizadas com diferentes volumes de NH_4OH . Onde d_m = diâmetro médio. A: amostra am470 (0,0118 Mol NH_4OH); B: amostra am520 (0,0130 Mol NH_4OH); C: amostra am570 (0,0143 Mol NH_4OH); D: amostra am620 (0,0155 Mol NH_4OH).



Fonte – Próprio autor.

Tabela 4: Diâmetro médio das partículas sintetizadas com diferentes volumes de NH_4OH bem como seus respectivos valores de dispersão (c_v).

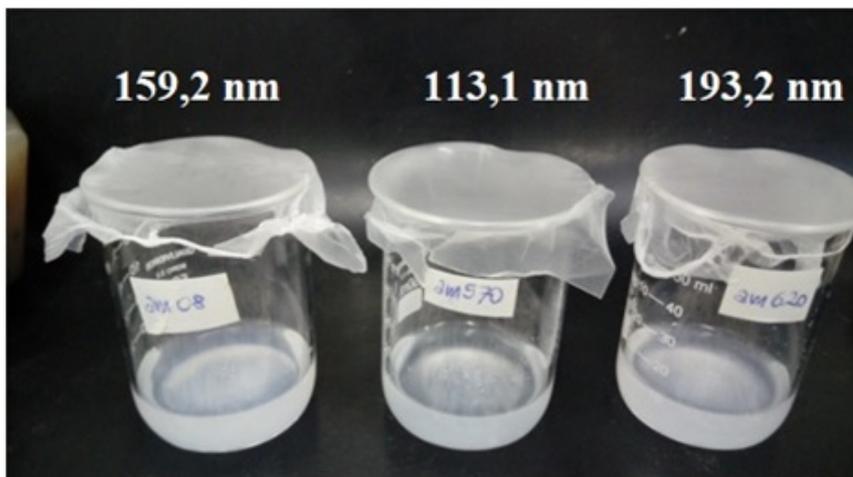
AMOSTRA	DIÂMETRO MÉDIO (nm)	DISPERSÃO (%)
am470	$60,5 \pm 4,1$	6,7
am520	$122,4 \pm 11,7$ $191,0 \pm 6,9$	9,5 // 3,6
am570	$193,2 \pm 14,1$	7,2
am620	$113,1 \pm 6,9$	6,1

Fonte – Próprio autor.

5.2. Análise qualitativa da estabilidade coloidal

Das diversas partículas de SiO_2 obtidas através da variação do volume dos reagentes, foram selecionadas partículas de três tamanhos diferentes levando-se em conta o intervalo de tamanhos adequado para aplicações biológicas segundo está relatado em [14]. Foram selecionadas as amostras am08, am570 e am620, que apresentaram tamanhos de 159,2, 193,2, 113,1, nm e valores de dispersão 7,1, 7,2 e 6,1%, respectivamente. Estas foram sujeitas ao procedimento descrito na seção 4.4. Estudo da estabilidade coloidal e, após 5h, as soluções se apresentaram como pode ser visto na Figura 19.

Figura 19 – Comparação (qualitativa) da estabilidade coloidal das amostras. À esquerda a amostra am08, no centro está a amostra am570 e à direita está amostra am620.



Fonte – Próprio autor.

Pode ser observado que os béqueres contendo as amostras am570 e am620 apresentam uma turbidez menor do que aquela do béquer com solução preparada a partir da amostra am08. Dessa maneira, do ponto de vista qualitativo, pode-se inferir que a am08 apresenta uma estabilidade coloidal mais duradoura, como é requerido para os testes biológicos.

A seguir, na Parte II, serão apresentados os resultados das sínteses feitas sob as mesmas condições da am08, que foi a escolhida como mais adequada para o presente trabalho baseada em seu diâmetro médio e estabilidade coloidal.

PARTE II

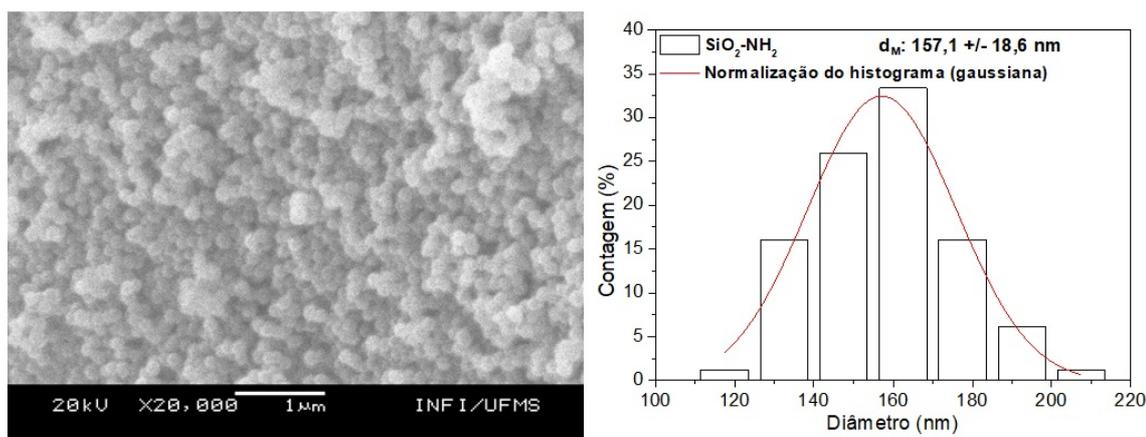
5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Visto que as SiO₂NPs utilizadas na Parte II do trabalho constituem a mesma amostra de sílica pura apresentada na Parte I, sua imagem de MEV e seu histograma já foram apresentados na seção 5.1.1. *Estudo da influência da variação de EtOH* através das Figuras 12 e 13. Sendo assim, serão apresentadas nesta seção as imagens de MEV e os respectivos histogramas das SiO₂-NH₂NPs e SiO₂-RM78NPs.

5.3.1. Sílica aminofuncionalizada (SiO₂-NH₂)

Está representada na Figura 20 a imagem de MEV das SiO₂-NH₂NPs (am08-apt) juntamente com seu histograma. A microscopia revela partículas nanométricas, de geometria esférica – como era esperado. O histograma mostra um diâmetro médio de 157,1 ± 18,6 nm. Pode ser observado que o tamanho médio das SiO₂NPs e SiO₂-NH₂NPs são muito semelhantes. A dispersão percentual que se encontra a partir desses dados é de 11,8 %, um valor um pouco acima daquele obtido para a sílica pura.

Figura 20 – Microscopia das SiO₂NPs. Ao lado seu histograma contendo a normalização (gaussiana) que fornece o diâmetro médio das partículas.



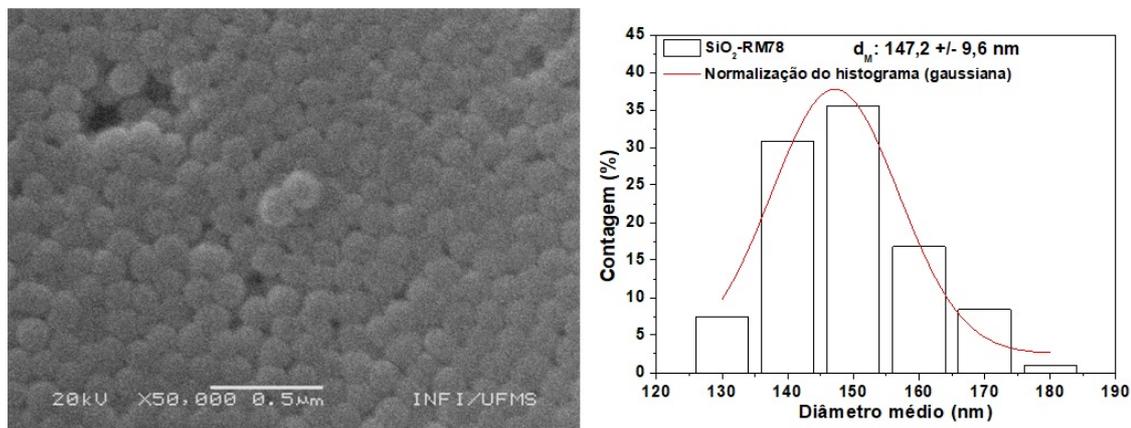
Fonte – MEV: MULTILAM; histograma: próprio autor.

5.3.2. Sílica contendo RM78 (SiO₂-RM78)

A Figura 21 representa a imagem de MEV das SiO₂-RM78NPs (am08-rm78) juntamente com seu histograma. As amostras foram suspensas em água deionizada como preparação para análise de microscopia. Pode ser visto pela Figura 21 que as partículas conservaram sua geometria esférica. O tamanho médio (147,2 ± 9,6 nm) se manteve próximo (dentro da margem de erro) do valor das NPs de SiO₂ (159,2 ± 11,4 nm), bem como a

dispersividade que se mostrou um pouco menor – agora 6,5%. Nas imagens, as partículas se mostram mais aglomeradas quando comparadas às imagens obtidas para a sílica pura, no entanto, isso reflete o método de preparação das mesmas para as análises de MEV. Visando identificar efeitos de aglomeração, as amostras foram analisadas por DLS.

Figura 21 – Microscopia das SiO₂-RM78NPs. Ao lado seu histograma contendo a normalização (gaussiana) que fornece o diâmetro médio das partículas.



Fonte – MEV: MULTILAM; histograma: próprio autor.

5.4. Medidas de DLS

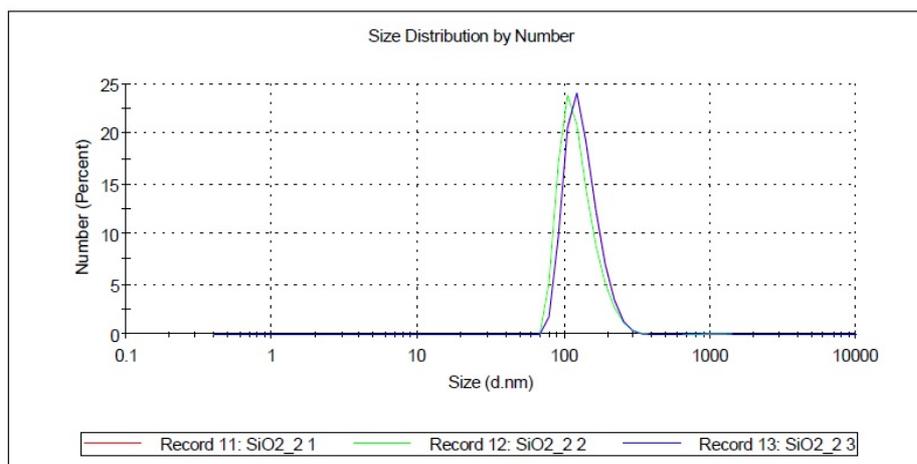
5.4.1. DLS da sílica pura (SiO₂)

A Figura 22 representa os resultados da análise de DLS da amostra de sílica pura (am08). A curva de distribuição possui o tamanho médio no valor de 134,9 nm com um desvio padrão de 36,6 nm. As medidas de DLS e MEV apesar de serem diferentes em valores ainda se encontram dentro da margem de erro apresentada. Além disso, por DLS é analisado o tamanho hidrodinâmico, levando em consideração também a presença de moléculas orgânicas ligadas na superfície das partículas.

Figura 22 - DLS das SiO₂NPs. As medidas (feitas em triplicata) confirmaram a natureza nanométrica das partículas bem como seu baixo índice de dispersão. A técnica serve como complemento às medidas de MEV.

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 210,6	Peak 1: 134,9	100,0	36,57
Pdl: 0,404	Peak 2: 1768	0,0	667,5
Intercept: 0,924	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality Good



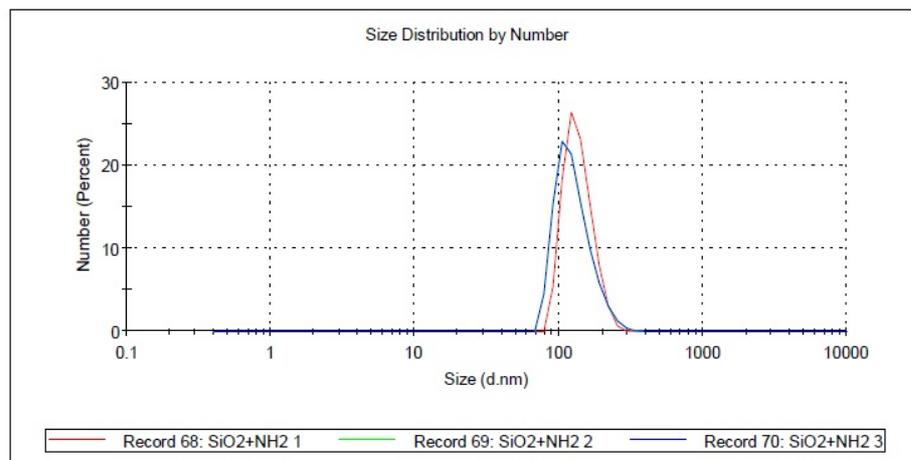
Fonte – INQI, UFMS.

5.4.2. DLS da sílica aminofuncionalizada (SiO₂-NH₂)

A Figura 23 apresenta os resultados da análise de DLS das SiO₂-NH₂NPs (am08-aptés). O tamanho registrado pela medida de DLS foi de 128,5 nm com um desvio padrão de 37,79 nm. O valor obtido *via* DLS é diferente daquele obtido *via* MEV, dado que o experimento de DLS determina o tamanho médio fazendo uma contagem maior de partículas e além disso, também inclui na medida a presença de grupos orgânicos na superfície das partículas (o que as análises de MEV não levam em conta). Apesar disso, os valores fornecidos pelas duas técnicas encontram-se na mesma faixa de tamanhos; em torno de 150 nm.

Figura 23 - DLS das SiO₂-NH₂NPs. As medidas (feitas em triplicata) confirmam a natureza nanométrica das partículas bem como sua baixa dispersividade. A técnica serve como um complemento às medidas de MEV.

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 191,3	Peak 1: 128,5	100,0	37,79
Pdl: 0,333	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,907	Peak 3: 0,000	0,0	0,000
Result quality Good			



Fonte – INQI, UFMS.

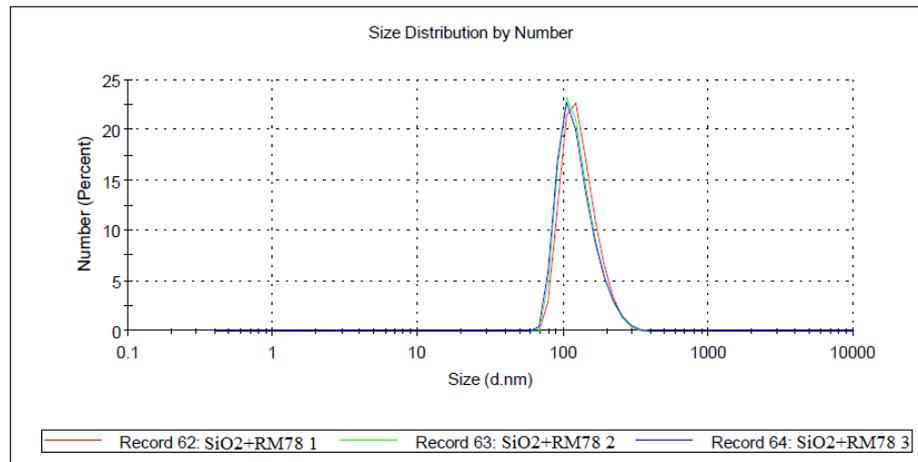
5.4.3. DLS da sílica com RM78 (SiO₂-RM78)

A Figura 24 apresenta os resultados da análise de DLS das SiO₂-RM78NPs (am08-rm78). As medidas de DLS forneceram um tamanho médio de nanopartícula de 127,0 nm com um desvio padrão de 40,1 nm. Novamente, o tamanho médio fornecido pela medida de DLS difere daquela fornecida por MEV, o que se dá pela mesma razão que anteriormente – uma contagem maior feita pelo experimento de DLS. Contudo, mais uma vez o tamanho obtido por ambas as técnicas se encontra na mesma faixa de tamanho – em torno de 150 nm.

Figura 24 –DLS das SiO₂-RM78NPs. As medidas (realizadas em triplicata) confirmam sua natureza nanométrica e seu baixo índice de dispersão. A técnica serve como um complemento às medidas de MEV.

	Size (d.n...	% Number:	St Dev (d.n...
Z-Average (d.nm): 176,5	Peak 1: 127,0	100,0	40,09
Pdl: 0,226	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,920	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality Good



Fonte – INQI, UFMS.

5.5. Estudo qualitativo da estabilidade coloidal das NPs

5.5.1. Estudo da estabilidade das SiO₂NPs

Para as SiO₂NPs, a estabilidade coloidal foi estabelecida pelas análises qualitativas apresentadas na seção 5.2. *Análise qualitativa da estabilidade coloidal da PARTE I.*

5.5.2 Estudo da estabilidade das SiO₂-NH₂NPs

No caso das partículas de SiO₂-NH₂, a estabilidade coloidal foi consideravelmente baixa, ocorrendo a precipitação das NPs dentro de alguns minutos, como mostra a Figura 25. Sendo assim, apenas as NPs de SiO₂ puras foram utilizadas como suporte para a RM78.

Figura 25 – Estudo da estabilidade coloidal. Solução a 4 mg/mL de SiO₂-NH₂NPs em água deionizada após aproximadamente 2h.

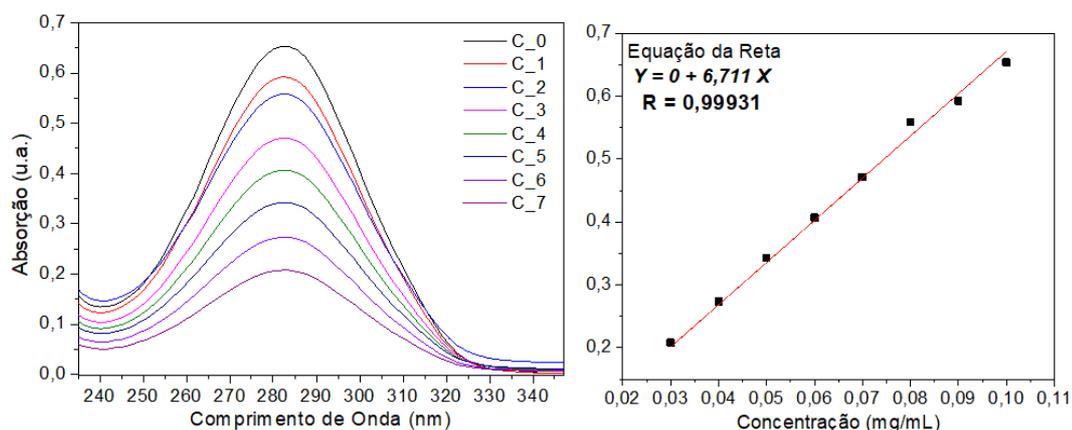


Fonte – Próprio autor.

5.6. Espectrometria no UV-Vis do compósito SiO₂-RM78

A Figura 26 apresenta as curvas absorção x comprimento de onda de soluções com diferentes concentrações de RM78 (à esquerda). Para todas as concentrações, os valores dos máximos de absorção correspondentes ao pico encontrado em 281,8 nm foram utilizados para preparação da curva de calibração apresentada também na Figura 26 (à direita).

Figura 26 – Absorção em 281,8 nm da RM78 (esquerda); Curva de calibração construída a partir dos dados de absorção (direita).

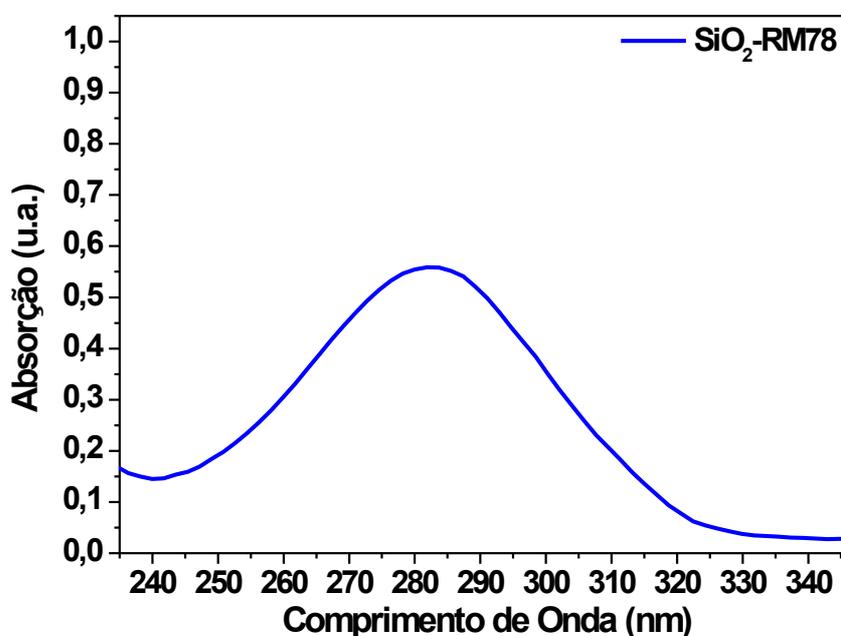


Fonte – Laboratório de Óptica e Fotônica, UFMS.

A Figura 27 apresenta a curva de espectroscopia no UV-Vis do sobrenadante obtido após impregnação da sílica com o composto RM78. Em 281,8 nm, a absorção do sobrenadante

tem um valor de 0,55906 u.a. Substituído esse valor na equação da curva de calibração, encontra-se a concentração de RM78 no sobrenadante de 0,08330 mg/mL. Comparando esse valor com a concentração inicial (0,2 mg/mL) da solução feita para a adsorção ($C_{\text{silica-RM78}} = C_0 - C_{\text{sobrenadante}}$), o valor adsorvido nas SiO₂NPs foi de 0,1167 mg/mL. Levando-se em conta a massa de SiO₂NPs utilizada (5 mg) e a massa de RM78 impregnada, conclui-se que a massa do composto SiO₂-RM78 é de 5,1167 mg. Fazendo a divisão da massa de RM78 impregnada pela massa do composto e multiplicando por 100, encontra-se a porcentagem de RM78 em massa de composto:

Figura 27 – Absorção apresentada pelo sobrenadante da solução para adsorção de RM78 na superfície das SiO₂NPs.



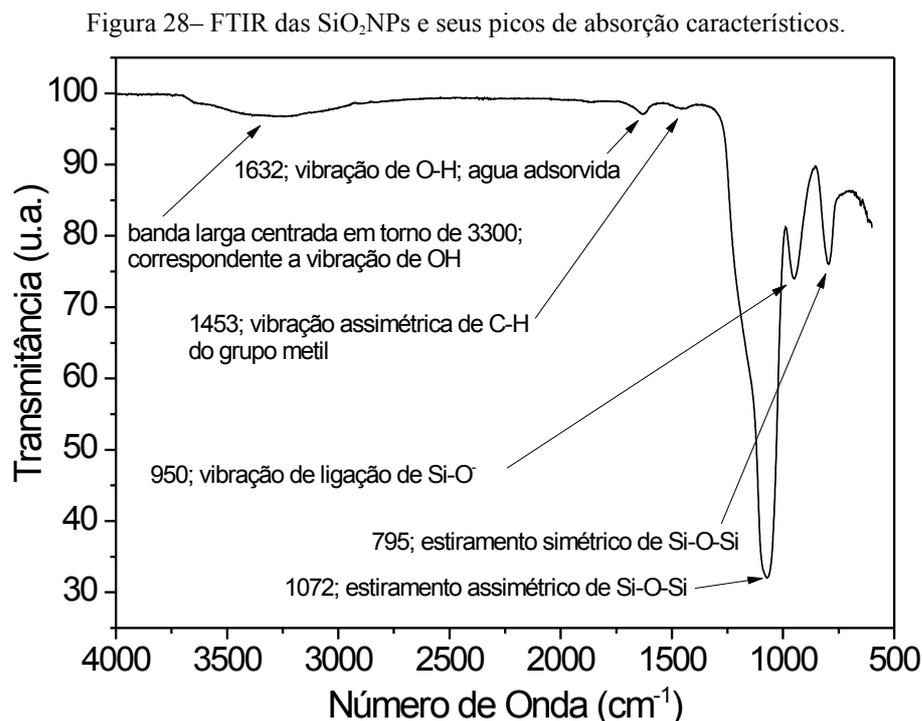
Fonte – Laboratório de Óptica e Fotônica, UFMS.

5.7. Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

5.7.1. Sílica pura (SiO₂)

A Figura 28 apresenta a espectroscopia no infravermelho das SiO₂NPs (am08). Na imagem, estão apresentadas as vibrações correspondentes aos grupos silanol e siloxano que confirmam a presença do silício; 795, 950 e 1072 cm⁻¹ [41, 50,51]. Também estão presentes as

vibrações referentes à água adsorvida na amostra (1632 e ~ 3300 cm^{-1}) e a algum resíduo orgânico provenientes da síntese das nanopartículas [52,53]

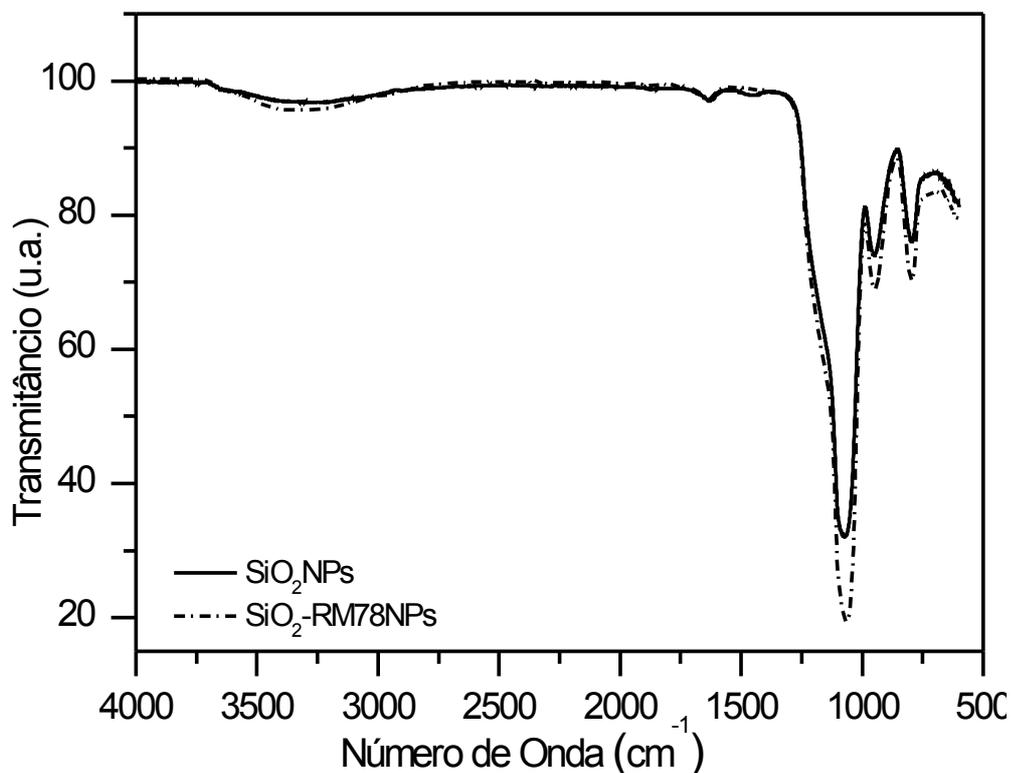


Fonte – Laboratório de Óptica e Fotônica, UFMS.

5.7.2. Sílica carregada com RM78 (SiO_2 -RM78)

A Figura 29 apresenta a espectroscopia no infravermelho de ambas as amostras. Pode ser observado que o espectro das SiO_2 -RM78NPs (am08-RM78 – linha tracejada) apresenta pouca diferença com relação ao espectro das SiO_2 NPs. A pouca diferença entre os espectros pode ser atribuída a pouca quantidade de RM78 adsorvida na sílica. O valor de cerca de 2% de RM78 que constitui o composto torna-se relativamente ainda menor quando observada através da pequena quantidade de SiO_2 -RM78NPs empregada para a espectroscopia. Dessa maneira torna-se bastante difícil observar a presença do composto através desta técnica de caracterização.

Figura 29 – Comparação das medidas de FTIR das SiO_2 NPs e SiO_2 -RM78NPs. A linha preta representando as SiO_2 NPs e a linha tracejada representando as SiO_2 -RM78NPs.



Fonte – Laboratório de Óptica e Fotônica, UFMS.

5.8. Potencial Zeta

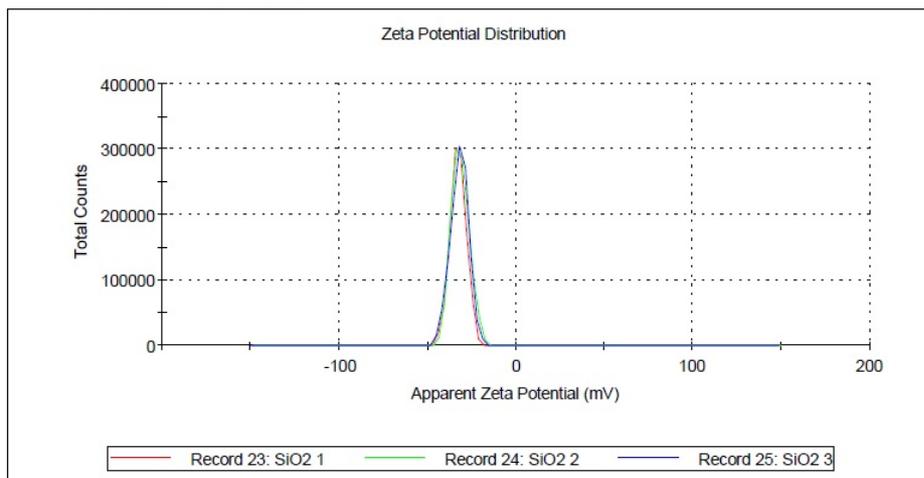
5.8.1. P ζ das SiO₂NPs

A Figura 30 representa a medida de P ζ das SiO₂NPs (am08). O valor da carga superficial obtido foi de -32,5 mV. Isso se deve as hidroxilas (-OH) dos grupos silanol presentes na superfície das nanopartículas [54]. Vale salientar que este alto valor de P ζ reflete a grande estabilidade coloidal das amostras, já que valores maiores ou iguais à ± 30 mV têm sido reportados como ótimos para preparação de soluções coloidais estáveis [55].

Figura 30 – Medida de P ζ das SiO₂NPs. As medidas foram realizadas em triplicata.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -32,5	Peak 1: -32,5	100,0	4,49
Zeta Deviation (mV): 4,49	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0193	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality **Good**



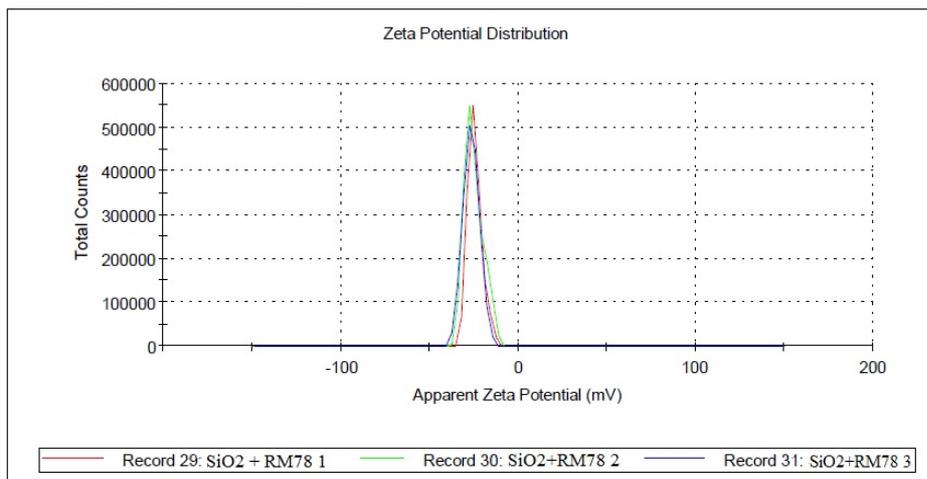
Fonte – INQI, UFMS.

5.8.2. Potencial Zeta das SiO₂-RM78NPs

A Figura 31 representa a medida de P ζ das SiO₂-RM78NPs (am08-rm78). O valor obtido foi de -24,2 mV. Isso se deve a presença do fármaco na superfície da sílica. Dada a estrutura da RM78 (anéis e amidas), ela tende a apresentar uma densidade de carga menos negativa que a da sílica, visto que a sílica possui grupos silanol em sua superfície, tornando sua densidade de carga negativa [55].

Figura 31 – Medida de P ζ das SiO₂-RM78NPs. As medidas foram feitas em triplicata.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -24,3	Peak 1: -24,3	100,0	4,08
Zeta Deviation (mV): 4,08	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0583	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality Good			



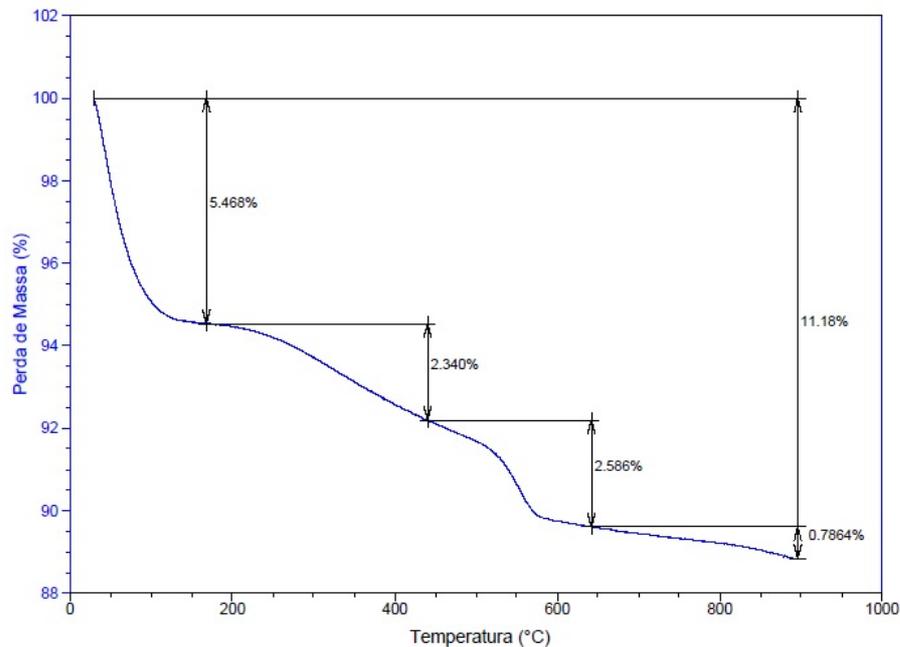
Fonte – INQI, UFMS.

5.9. Termogravimetria

5.9.1. Análise térmica das SiO₂NPs

A Figura 32 representa a termogravimetria das SiO₂NPs (am08). O gráfico revela uma perda de massa acentuada até aproximadamente 120 °C correspondente à evaporação da água [56]. Em seguida, pouco depois dos 200 °C ocorre a perda de água que está ligada mais internamente aos grupos silanóis da amostra [57]. A degradação de compostos orgânicos remanescentes da síntese ocorre até aproximadamente os 500 °C [58]. Acima dos 500 °C, até cerca de 570 °C ocorre a perda de água formada pela condensação dos grupos silanóis [53].

Figura 32 – Termogravimetria das SiO₂NPs. Na imagem estão destacadas as seções em que há perda de massa bem como a perda de massa total até 950 °C.

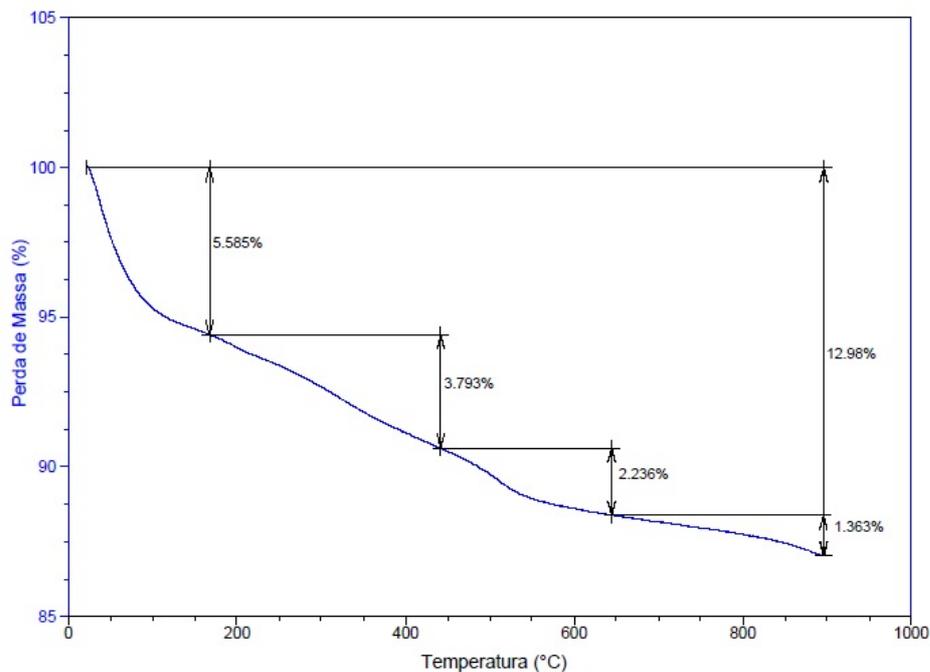


Fonte – INQI, UFMS.

5.9.2. Análise térmica das SiO₂-RM78NPs

A Figura 33 apresenta a termogravimetria da SiO₂-RM78 (am08-RM78). O gráfico apresenta perdas de massa idênticas àquelas da sílica pura, em 120 °C, 200 °C e até próximo de 500 °C. Entretanto, há um decréscimo de massa além daqueles presentes na termogravimetria da sílica pura; ele se estende em torno do intervalo de 300 até 360°C, onde se atribui a degradação do composto incorporado na amostra. A partir de 360 °C a degradação dos compostos orgânicos (remanescentes da síntese) se estende a uma taxa aproximadamente linear até próximo aos 500 °C [58]. Após a marca dos 500 °C até aproximadamente 540 °C a perda de massa se deve à água formada pela condensação dos grupos silanóis [59].

Figura 33 – Termogravimetria das SiO₂-RM78NPs. Na imagem estão destacadas seções em que há perda de massa bem como a perda de massa total até 950 °C.



Fonte – INQI, UFMS.

Da seção de espectroscopia no UV-Vis foi obtida a informação de que 0,1167 mg de RM78 foram adsorvidos nas nanopartículas e que esse valor corresponde a 2,2% da massa total do composto. A termogravimetria do composto SiO₂-RM78 apresenta uma maior perda de massa em relação àquela apresentada pelas SiO₂NPs. Essa perda de aproximadamente 2% condiz com a massa do composto que foi adsorvida nas SiO₂NPs.

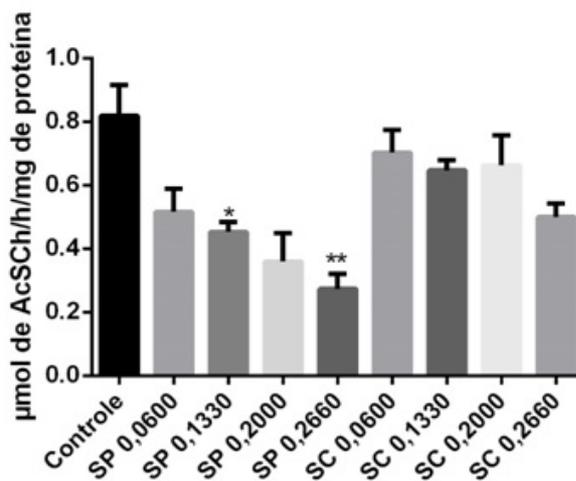
5.10. Estudo da atividade enzimática

Os testes foram realizados de modo a estudar a influência das SiO₂NPs sobre atividade da enzima AChE. Isso deve ser feito para garantir que posteriormente, caso haja, serão observadas diferenças na atividade enzimática apenas devido à presença do composto RM78. As concentrações de SiO₂NPs empregadas foram: 0,0600, 0,1330, 0,2000 e 0,2660 mg/mL, tanto para as SiO₂NPs quanto para as SiO₂-RM78NPs conforme consta no gráfico apresentado na Figura 34.

Esperava-se que não houvesse inibição da atividade enzimática nos testes realizados na presença apenas das SiO₂NPs, de modo que uma possível inibição apresentada pelo composto pudesse ser atribuída a ele. No entanto as SiO₂NPs apresentaram atividade inibitória mesmo a baixas concentrações. Foi observada uma inibição da atividade da AChE pelas

SiO₂NPs a partir da concentração de 0,1330 mg/mL. Já nos testes realizados na presença das SiO₂-RM78NPs não houve inibição em comparação com o controle.

Figura 34 – Atividade da enzima AChE sobre as quatro regiões encefálicas (córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e estriado), reunidas como uma única amostra na presença de SiO₂NPs (SP) ou SiO₂-RM78NPs (SC). Os dados foram analisados através da análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida pelo teste *post hoc* de Dunnett, onde os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$.



Fonte – INBIO, UFMS.

Algumas hipóteses podem ser levantadas de modo a esclarecer os resultados. As SiO₂NPs podem realmente apresentar atividade inibitória sobre a AChE. Há também a hipótese de que as SiO₂NPs estejam se ligando ao cromóforo (TNB) e influenciando a leitura. Como o TNB é o indicativo de que a AChE hidrolisou o substrato, a ligação do TNB com as SiO₂NPs reduz a quantidade de TNB identificada pelo aparelho, o que indica de maneira incorreta que a AChE foi inibida.

As diferentes concentrações de SiO₂-RM78NPs não apresentaram diferença estatística na inibição da AChE em relação ao grupo controle. É possível que o composto RM78 de fato apresenta atividade anticolinesterásica, porém devido ao fato de estar ligado às SiO₂NPs não consegue se ligar ao sítio catalítico da enzima, permitindo assim que a AChE hidrolise o substrato normalmente. Ainda há a hipótese de que se as SiO₂NPs sejam realmente capazes de se ligar ao TNB, a presença do RM78 na superfície das partículas esteja impedindo que isso aconteça, fornecendo então o resultado observado.

6. CONCLUSÃO

Foram sintetizadas partículas nanométricas, esféricas e monodispersas de sílica através do método de Stöber modificado. Inicialmente, foi investigada a influência da variação molar dos reagentes empregados na síntese. Cada uma das variações realizadas influenciou o tamanho final e a forma das partículas resultantes. Apesar disso todas as sínteses realizadas mantiveram uma baixa dispersão no tamanho médio das partículas. O estudo qualitativo da estabilidade coloidal revelou que a amostra feita com 0,137 Mol de EtOH (am08) apresenta melhor estabilidade.

Novas amostras foram feitas com base na síntese com 0,137 Mol de EtOH. As partículas foram caracterizadas e as análises de MEV e DLS confirmaram a natureza nanométrica das partículas e baixa dispersão do tamanho médio é confirmada pelo valor de PDI fornecido pelo DLS. A espectroscopia no UV-Vis forneceu dados para se concluir que 2,2% da massa do compósito corresponde ao composto RM78. As medidas de potencial Zeta mostraram que houve uma redução na carga de superfície, o que corrobora a presença do RM78 na sílica. A análise de TG mostra que as SiO₂-RM78NPs perdem cerca de 2% a mais de massa que as SiO₂NPs, no mesmo intervalo de temperatura. Sendo assim, as técnicas de UV-Vis, potencial Zeta e TG mostram que houve adsorção do composto RM78 na superfície das SiO₂NPs. Entretanto, não foi possível observar a presença do RM78 através da técnica de FTIR, possivelmente, por estar em uma concentração muito baixa visto o limite de detecção da técnica. Pelo exposto, o método utilizado para adsorver o RM78 na superfície da sílica mostrou-se viável.

A atividade enzimática da AChE foi estudada na presença das SiO₂NPs e das SiO₂-RM78NPs. Foi observada uma inibição da atividade da AChE pelas SiO₂NPs a partir da concentração de 0,1330 mg/mL. Pode-se atribuir a esses resultados uma inibição direta devido às SiO₂NPs na atividade da AChE, ou à ligação do TNB com às SiO₂NPs.

Na presença das SiO₂-RM78NPs, a atividade enzimática não apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle. Esse resultado pode ser atribuído ao fato de que, estando adsorvido o RM78, este impeça que o TNB se ligue às SiO₂NPs, deixando o TNB livre, assim como ocorre no grupo controle. Ainda não se descarta a hipótese de que o composto RM78 tenha a capacidade de inibir a AChE. É possível que, caso o RM78 se desligasse das NPs, o mesmo se ligaria no sítio catalítico da enzima inibindo sua atividade.

7.REFERÊNCIAS

- [1] Falcão, Deusivania Vieira da Silva, and Cristina Maria de Souza Brito Dias. "Maturidade e velhice: pesquisas e intervenções psicológicas." *Maturidade e velhice: pesquisas e intervenções psicológicas*. 2006.
- [2] Chatterji, Somnath, et al. "Health, functioning, and disability in older adults—present status and future implications." *The Lancet* 385.9967 (2015): 563-575.
- [3] Qazi, Talal Jamil, et al. "Epigenetics in Alzheimer's Disease: Perspective of DNA Methylation." *Molecular Neurobiology* (2017): 1-19.
- [4] Sereniki, Adriana, and M. A. B. F. Vital. "A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos." *RevPsiquiatria Rio GdSul* 30.1 supl 0 (2008).
- [5] Suh, Yoo-Hun, and Frederic Checler. "Amyloid precursor protein, presenilins, and α -synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease." *Pharmacological reviews* 54.3 (2002): 469-525.
- [6] Ventura, Ana LM, et al. "Sistema colinérgico & 58; revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo Colinergic system & 58; revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking." *Archives of Clinical Psychiatry* 37.2 (2010): 66-72.
- [7] Araújo, Cleônia Roberta Melo, VL dos A. Santos, and A. A. Gonsalves. "Acetilcolinesterase-AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico." *Revista Virtual de Química* 8.6 (2016): 1818-1834.
- [8] Engelhardt, Elias, et al. "Tratamento da Doença de Alzheimer: recomendações e sugestões do Departamento Científico de Neurologia Cognitiva e do Envelhecimento da Academia Brasileira de Neurologia." *Arq Neuropsiquiatr* 63.4 (2005): 1104-1112.
- [9] Brakmane, G., M. Winslet, and A. M. Seifalian. "Systematic review: the applications of nanotechnology in gastroenterology." *Alimentary pharmacology & therapeutics* 36.3 (2012): 213-221.
- [10] Zhou, Shuxue, et al. "The change of the properties of acrylic-based polyurethane via addition of nano-silica." *Progress in Organic Coatings* 45.1 (2002): 33-42.
- [11] Slowing, Igor I., et al. "Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers." *Advanced drug delivery reviews* 60.11 (2008): 1278-1288.
- [12] A Napierska D, Thomassen LC, Rabolli V, Lison D, Gonzalez L, Kirsch-Volders M, Martens JA, Hoet PH: Size-dependent cytotoxicity of monodisperse silica nanoparticles in human endothelial cells. *Small* 2009, 5:846-853.

- [13] Yu KO, Grabinski CM, Schrand AM, Murdock RC, Wang W, Gu B, Schlager JJ, Hussain SM: Toxicity of amorphous silica nanoparticles in mousekeratinocytes. *Journal of Nanoparticle Research* 2009, 11:15-24.
- [14] Nabeshi H, Yoshikawa T, Matsuyama K, Nakazato Y, Arimori A, Isobe M, Tochigi S, Kondoh S, Hirai T, Akase T, Yamashita T, Yamashita K, Yoshida T, Nagano K, Abe Y, Yoshioka Y, Kamada H, Imazawa T, Itoh N, Tsunoda S, Tsutsumi Y: Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells. *Pharmazie* 2010, 65:199-201.
- [15] Tsolakis, A. C., Halevas, E., Vouroutzis, N., Koliakos, G. G., Salifoglou, A., & Litsardakis, G. (2017). Magnetic Fluorescent Nanoparticles Binding to Amyloid-Beta Peptide: Silica-Coated, Thioflavin-T Functionalized Iron Oxide. *IEEE Transactions on Magnetism*, 53(11), 1-4.
- [16] Zhang, Xiangyang, et al. "A new bifunctional fluorescent sensor based on naphthalimide-functionalized silica nanoparticles for detection and adsorption of Cu²⁺ in aqueous solution." *Analytical Methods* 7.20 (2015): 8925-8930.
- [17] Y. Zhang et al.. Spherical mesoporous silica nanoparticles for loading and release of the poorly water-soluble drug Telmisartan. *Journal of Controlled Release* 145 (2010) 257–263.
- [18] Yang, Licong, et al. "Gold nanoparticle-capped mesoporous silica-based H₂O₂-responsive controlled release system for Alzheimer's disease treatment." *Acta Biomaterialia* 46 (2016): 177-190.
- [19] Stöber, Werner, Arthur Fink, and Ernst Bohn. "Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range." *Journal of colloid and interface science* 26.1 (1968): 62-69.
- [20] Ibrahim, Ismail AM, A. A. F. Zikry, and Mohamed A. Sharaf. "Preparation of spherical silica nanoparticles: Stober silica." *J. Am. Sci* 6.11 (2010): 985-989.
- [21] Paik, Un Gyu, et al. "CMP slurry, preparation method thereof and method of polishing substrate using the same." U.S. Patent No. 8,062,547. 22 Nov. 2011.
- [22] Lopes, A. C. P., Rosa, L. C., Belebony, R. D. O., Pereira, R. N., de Vasconcelos, C. A., & Moreira, J. E. (1998). Aspectos Moleculares da transmissão sináptica. *Medicina (Ribeirão Preto. Online)*, 32(2), 167-188.
- [23] Machado, A.. *Neuroanatomia Funcional*. 2° Ed.. Livraria Atheneu Editora. 2° Ed., 1993.
- [24] Zalpour, C. e Colaboradores. *Anatomia e Fisiologia: tratado para fisioterapeutas e especialistas em massagem, hidroterapia e medicina do esporte*. Livraria Santos Editora, 2005.

- [25] Haines, D. E.. Neurociência Fundamental: para aplicações básicas e clínicas. 3° Ed.. Elsevier Editora Ltda., 2006.
- [26] Gray, H.; Standring, S. Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice. 40° Edição. Elsevier. 2008.
- [27] Moyes C. D.; Schulte, P. M. Princípios de Fisiologia Animal. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 792p.
- [28] Guyton, A. C.; Hall, J. E. *Textbook of Medical Physiology* 11th Ed. Philadelphia, Pennsylvania 19103-2899 Elsevier 2006.
- [29] Viegas Jr, Cláudio, et al. "Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer." *Química Nova* (2004): 655-660.
- [30] Naguib, Mohamed, et al. "Advances in Neurobiology of the Neuromuscular Junction Implications for the Anesthesiologist." *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 96.1 (2002): 202-231.
- [31] Caramellia, Paulo, and Maira Tonidandel Barbosab. "Como diagnosticar as quatro causas mais freqüentes de demência? How to diagnose the four most frequent causes of dementia?." *Rev Bras Psiquiatr* 24.Supl I (2002): 7-10.
- [32] Morishima Kawashima, Maho, and Yasuo Ihara. "Alzheimer's disease: β Amyloid protein and tau." *Journal of neuroscience research* 70.3 (2002): 392-401.
- [33] Harvey, R. J., M. Skelton-Robinson, and M. N. Rossor. "The prevalence and causes of dementia in people under the age of 65 years." *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 74.9 (2003): 1206-1209.
- [34] LaFerla FM. Amyloid- β and tau in Alzheimer's disease. *Nat Ver Neurosci* 2008. Disponível em: http://www.nature.com/nrn/posters/ad/nrn_ad_posters.pdf.
- [35] Medina, Miguel, and Jesús Avila. "New perspectives on the role of tau in Alzheimer's disease. Implications for therapy." *Biochemical pharmacology* 88.4 (2014): 540-547.
- [36] Canineu, Paulo Renato, et al. "Terapia Multidisciplinar: uma proposta de tratamento global do idoso." *Mundo saúde (Impr.)* (2005): 662-665.
- [37] Dingova, D., Leroy, J., Check, A., Garaj, V., Krejci, E., & Hrabovska, A. (2014). Optimal detection of cholinesterase activity in biological samples: modifications to the standard Ellman's assay. *Analytical biochemistry*, 462, 67-75.
- [38] TOZATTI, Camila S. S. *Síntese, Análise Conformacional e Avaliação Biológica de Hidrazonas Derivadas de Acetofenonas Substituídas e da Naringenina*. 2016. 316 f. Tese. (Doutorado em Química). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

- [39] Pavić, Kristina, et al. "Novel semicarbazides and ureas of primaquine with bulky aryl or hydroxyalkyl substituents: Synthesis, cytostatic and antioxidative activity." *European journal of medicinal chemistry* 86 (2014): 502-514.
- [40] Nevagi, Reshma J., et al. "Design, synthesis and biological evaluation of novel thiosemicarbazide analogues as potent anticonvulsant agents." *Bio-organic chemistry* 54 (2014): 68-72.
- [41] de Oliveira, Luciane França, et al. "Functionalized silicananoparticles as an alternative platform for targeted drug-delivery of water insoluble drugs." *Langmuir* 32.13 (2016): 3217-3225.
- [42] Dedavid, Berenice Anina, Carmem Isse Gomes, and Giovanna Machado. *Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores*. EdIPUCRS, 2007.
- [43] MALVERN. Zetasizer Nano Series User Manual. **User Manuals**, England, 2004. Disponível em: 118 <http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf>.
- [44] uv-vis // ftir HOLLER, F. James; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R. **Princípios de análise instrumental**. Bookman, 2009.
- [45] Ehlers, Henrik, Jyrki Heinämäki, and Jouko Yliruusi. "Particle size and packing characterization by diffuse light transmission." *Particuology* 10.5 (2012): 619-627.
- [46] Cavalheiro, E. T. G., et al. "A influência de fatores experimentais nos resultados de análises termogravimétricas." *Química Nova* 18.3 (1995): 305-308.
- [47] Shen, J., He, Q., Gao, Y., Shi, J., & Li, Y. (2011). Mesoporous silica nanoparticles loading doxorubicin reverse multidrug resistance: performance and mechanism. *Nanoscale*, 3(10), 4314-4322.
- [48] Ibrahim, Ismail AM, A. A. F. Zikry, and Mohamed A. Sharaf. "Preparation of spherical silica nanoparticles: Stober silica." *J. Am. Sci* 6.11 (2010): 985-989.
- [49] Zainala, N. A., Shukor, S. R. A., Wabb, H. A. A., & Razakb, K. (2013). Study on the effect of synthesis parameters of silica nanoparticles entrapped with rifampicin. *Chemical Engineering*, 32.
- [50] Lin, Sung-Hwa, et al. "Preparation and characterization of polystyrene sulfonic acid-co-maleic acid copolymer modified silica nanoparticles." *Journal of Polymer Research* 23.3 (2016): 44.

- [51] I.A. Rahman et al..Synthesis of organo-functionalized nanosilica *via* a co-condensation modification using g-aminopropyltriethoxysilane (APTES). *Ceramics International* 35 (2009) 1883–1888.
- [52] Kazuma Nakanishiaetal..Synthesis of amino-functionalized mesoporous silica sheets and their application for metal ion capture. *Journal of Asian Ceramic Societies* 3 (2015) 70–76.
- [53] Hsu-Tung Lu. Synthesis and characterization of aminofunctionalized silica nanoparticles. *Colloid Journal*, 2013, Vol. 75, No. 3, pp. 311–318.
- [54] D. Pérez-Quintanilla et al.. Mesoporous silica functionalized with 2-mercaptopyridine: Synthesis, characterization and employment for Hg(II) adsorption. *Microporous and Mesoporous Materials* 89 (2006) 58–68.
- [55] Hu, Dechao, et al. "A novel hybrid filler of halloysite nanotubes/silica fabricated by electrostatic self-assembly." *Materials Letters* 188 (2017): 327-330.
- [56] FatmaKayaci, Ozgun C. O. Umu, Turgay Tekinay e Tamer Uyar. Antibacterial Electrospun Poly(lactic acid) (PLA) Nanofibrous Webs Incorporating Triclosan/Cyclodextrin Inclusion Complexes. *J. Agric. Food Chem.* 2013, 61, 3901–3908.
- [57] Igor Makarovsky, Yonit Boguslavsky, Maria Alesker, Jonathan Lellouche, Ehud Banin e Jean-Paul Lellouche. Novel Triclosan-Bound Hybrid-Silica Nanoparticles and their Enhanced Antimicrobial Properties.*Adv. Funct. Mater.* 2011, 21, 4295–4304.
- [58] Liou, Tzong-Horng. "Evolution of chemistry and morphology during the carbonization and combustion of rice husk." *Carbon* 42.4 (2004): 785-794.
- [59] TESE JULIANO 02 2006 - Juliano Borges Teixeira Magalhães. Síntese de Peneiras zoleculares MCM-41 Ativas em Catálise Básica para a Produção de Chalconas. Dissertação. UFRRJ, 2006.