

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Escola de Engenharia

Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas Metalúrgica e de
Materiais – PPGE3M

**SÍNTESE POR COPRECIPITAÇÃO DE MAGNETITA MODIFICADA
SUPERFICIALMENTE POR POLICAPROLACTONA (PCL) E SUA
CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL E DE PROPRIEDADES
PARA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE CÂNCER**

JAQUELINE LEITE VIEIRA

Porto Alegre
2020

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

ESCOLA DE ENGENHARIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MINAS
METALÚRGICA E DE MATERIAIS – PPGE3M**

**SÍNTESE POR COPRECIPITAÇÃO DE MAGNETITA MODIFICADA
SUPERFICIALMENTE POR POLICAPROLACTONA (PCL) E SUA
CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL E DE PROPRIEDADES
PARA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE CÂNCER**

JAQUELINE LEITE VIEIRA

Porto Alegre

2020

JAQUELINE LEITE VIEIRA

**SÍNTESE POR COPRECIPITAÇÃO DE MAGNETITA MODIFICADA
SUPERFICIALMENTE POR POLICAPROLACTONA (PCL) E SUA
CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL E DE PROPRIEDADES
PARA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE CÂNCER**

Dissertação para a obtenção do título de Mestre em Engenharia na área de Ciências e Tecnologia dos Materiais do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais – PPGE3M, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Orientador: Prof. Dr. Carlos Pérez Bergmann

Coorientadora: Dr^a. Natasha Maurmann

Porto Alegre
2020

JAQUELINE LEITE VIEIRA

**SÍNTESE POR COPRECIPITAÇÃO DE MAGNETITA MODIFICADA
SUPERFICIALMENTE POR POLICAPROLACTONA (PCL) E SUA
CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL E DE PROPRIEDADES
PARA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE CÂNCER**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais – PPGE3M, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia. Área de concentração: Ciências e Tecnologia dos Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Pérez Bergmann

Coorientadora: Dra. Natasha Maurmann

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Jânio Venturini Junior

Profa. Dra. Laura-Elena Sperling

Dr. Tiago Bender Wermuth

Dedico esse trabalho ao meu avô/pai, meu exemplo de vida e meu amor, que sempre foi e sempre vai ser minha inspiração, mesmo agora sendo a estrelinha mais bonita do céu. Minhas conquistas vão ser sempre por você, com todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, principalmente minha mãe, meus avôs, e meu irmão, por sempre apoiarem minhas escolhas e planos, por acreditarem em mim de todos os jeitos possíveis e imagináveis, mesmo essas me deixando distante fisicamente. Agradeço muito ao professor Bergmann, por ter me orientado durante o processo, e por toda calma e paciência e por compartilhar seu vasto conhecimento comigo, serei sempre grata. Agradeço aos meus colegas do LACER, que estiveram me apoiando e me ajudando durante o processo, pelas risadas, compartilhamentos de cafés e parceria. Agradeço à Dra. Natasha por ter sido esse exemplo de profissional e também de orientadora, por todo aprendizado que tive a oportunidade de ter, como pesquisadora e como pessoa, não poderia ter tido uma coorientadora melhor. Agradeço à professora Patricia Pranke e a toda equipe do seu laboratório por ter me recebido muito bem e me ajudado na trajetória. Por último, mas não menos importante agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior – Brasil (CAPES), pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABELAS	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
LISTA DE SÍMBOLOS.....	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVO	17
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1. CÂNCER	18
3.2. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	22
3.3. PROPRIEDADES MAGNÉTICAS DAS NPS.....	23
3.3.1. SUPERPARAMAGNETISMO	25
3.4. USO BIOMÉDICO DO COMPORTAMENTO MAGNÉTICO DAS NPs. 27	
3.5. NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO	29
3.5.1. OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO.....	30
3.5.1.1. Síntese via Coprecipitação.....	32
3.5.2. ESTABILIDADE COLOIDAL DAS NANOPARTÍCULAS	33
3.5.3. RECOBRIMENTO COM POLICAPROLACTONA	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. MATERIAIS	38
4.2. MÉTODOS	38
4.2.1. SÍNTESE E MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DAS NANOPARTÍCULAS DE Fe ₃ O ₄	39
4.2.2. CARACTERIZAÇÃO.....	40
4.2.2.1. Difração de Raio X	40
4.2.2.2. Espectroscopia de Infravermelho	40
4.2.2.3. Caracterização Magnética.....	41

4.2.2.4.	Caracterização Morfológica.....	41
4.2.2.5.	Obtenção das Células-tronco.....	41
4.2.2.6.	Viabilidade Celular por MTT.....	42
4.2.2.7.	Ensaio de coloração com diacetato de fluoresceína-iodeto de propídio 43	
4.2.2.8.	Análises estatísticas.....	43
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1.	CRISTALINIDADE DAS NP DE ÓXIDO DE FERRO.....	44
5.2.	COMPROVAÇÃO DA PRESENÇA DO POLÍMERO NA NP.....	45
5.3.	CARACTERIZAÇÃO MAGNÉTICA.....	47
5.4.	MORFOLOGIA DAS NANOPARTÍCULAS.....	49
5.5.	VIABILIDADE CELULAR.....	55
6.	CONCLUSÕES.....	65
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	67
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 Demonstrativo da distribuição dos casos de câncer; a) dos 10 principais tipo, exceto pelo não melanoma por sexo; b) da população masculina por estado; c) da população feminina por estado (adaptado de INCA, 2020).	19
Figura 3.2 Demonstrativo da evolução do número de artigos científicos sobre nanopartículas e carreadores de fármacos, com o número de publicações na vertical, e o ano na horizontal (Fonte: WEB OF SCIENCE, 2019).	22
Figura 3.3 Curvas de histerese de alguns tipos de materiais magnéticos, com M sendo a magnetização, Ms a de saturação, Mr de reminiscência, Hc força coerciva, H campo magnético (Fonte: ZHUO; CHENG, 2012).	24
Figura 3.4 Ilustração da dependência entre coercividade (HC) em relação ao diâmetro (D) da partícula (adaptado FARAJI; YAMINI; REZAEI, 2010).	25
Figura 3.5 Efeito do tamanho na histerese da curva e o comportamento magnético, de acordo com o tamanho das partículas, sendo SPM as superparamagnéticas, e FM as Ferromagnéticas (adaptado de Narayan, 2009).	26
Figura 3.6 Ilustração representativa da movimentação das NPM contendo o fármaco pela corrente sanguínea por meio da aplicação de um campo magnético externo (Fonte: Narayan, 2009).	27
Figura 3.7 Esquema ilustrativo dos momentos magnéticos dos spins para os íons de ferro presentes na magnetita (Fonte: Narayan, 2009).	30
Figura 3.8 Configurações ilustrativas de um agregado e de um aglomerado, a partir do cristalito de um material (adaptado de ISO/TS 80004-2:2015, 2015).	34
Figura 4.1 Fluxograma do processo experimental de síntese e caracterização das NPMs.	37
Figura 4.2 Separação magnética das nanopartículas sintetizadas no presente trabalho.	40
Figura 5.1 Padrões de DRX das NPMs preparadas com diferentes concentrações de PCL.	45

Figura 5.2 Espectro do FTIR das diferentes amostras preparadas, evidenciando a presença do polímero pelas marcações e bandas destacadas, indo da amostra sem polímero (AM0) até a de maior concentração do mesmo (AM80).	46
Figura 5.3 Magnetização em função do campo magnético aplicado, à temperatura ambiente, das NPs sintetizadas com e sem o polímero PCL.	49
Figura 5.4 Imagens por MEV das nanopartículas; a) Am0; b) Am20; c) Am40; d) Am60; e) Am80.	50
Figura 5.5 Distribuição do tamanho das NPs sem e com tratamento com o polímero PCL.	52
Figura 5.6 Imagens por MEV das nanopartículas; a) Am0; b) Am20; c) Am40; d) Am60; e) Am80.	54
Figura 5.7 Resultados do ensaio de viabilidade celular, com as cinco concentrações testa de cada uma das 5 NPs sintetizadas, com um * mostrando as concentrações que tiveram diferença significativa com relação ao controle.	56
Figura 5.8 Imagens de microscopia de fluorescência com a marcação de células vivas e mortas dos poços controle, sem a presença de NPs. a) aumento com lente de 5x; b) aumento com lente de 20x18.	58
Figura 5.9 Imagens de microscopia de fluorescência com a marcação de células vivas e mortas NPS PCL0. a) controle; b) PCL0 100 µg/mL; c) PCL0 500 µg/mL; d) PCL0 1000 µg/mL; e) PCL 2000 µg/mL; na lente de aumento de 5x; e f) controle; g) PCL0 100 µg/mL; h) PCL0 500 µg/mL; i) PCL0 1000 µg/mL; j) PCL0 2000 µg/mL na lente de 20x de aumento.	59
Figura 5.10 Imagens de microscopia de fluorescência com a marcação de células vivas e mortas das NPS PCL20. a) controle; b) PCL20 100 µg/mL; c) PCL20 500 µg/mL; d) PCL20 1000 µg/mL; e) PCL20 2000 µg/mL; na lente de aumento de 5x. E f) controle; g) PCL20 100 µg/mL; h) PCL20 500 µg/mL; i) PCL20 1000 µg/mL; j) PCL20 2000 µg/mL na lente de 20x de aumento.	60

Figura 5.11 Imagens de microscopia de fluorescência com a marcação de células vivas e mortas das NPS PCL40. a) controle; b) PCL40 100 µg/mL; c) PCL40 500 µg/mL; d) PCL40 1000 µg/mL; e) PCL40 2000 µg/mL; na lente de aumento de 5x; e f) controle; g) PCL40 100 µg/mL; h) PCL40 500 µg/mL; i) PCL40 1000 µg/mL; j) PCL40 2000 µg/mL na lente de 20x de aumento.61

Figura 5.12 Imagens de microscopia de fluorescência com a marcação de células vivas e mortas das NPS PCL60. a) controle; b) PCL60 100 µg/mL; c) PCL60 500 µg/mL; d) PCL60 1000 µg/mL; e) PCL60 2000 µg/mL; na lente de aumento de 5x; e f) controle; g) PCL60 100 µg/mL; h) PCL60 500 µg/mL; i) PCL60 1000 µg/mL; j) PCL60 2000 µg/mL na lente de 20x de aumento.62

Figura 5.13 Imagens de microscopia de fluorescência com a marcação de células vivas e mortas NPS PCL80. a) controle; b) PCL80 100 µg/mL; c) PCL80 500 µg/mL; d) PCL80 1000 µg/mL; e) PCL80 2000 µg/mL; na lente de aumento de 5x; e f) controle g) PCL80 100 µg/mL; h) PCL80 500 µg/mL; i) PCL80 1000 µg/mL; j) PCL80 2000 µg/mL na lente de 20x de aumento.63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 Resumo comparativo dos principais métodos de síntese das nanopartículas de magnetita (adaptado de LU A.H. <i>et al.</i> 2007)	31
Tabela 4.1 Reagentes utilizados, grau de pureza, fabricante e função neste trabalho	38
Tabela 4.2 Identificação por nome das amostras sintetizadas e quantidades utilizadas do polímero PCL	38
Tabela 5.1 Descrições das bandas de absorção possíveis pela presença do polímero, com destaque em negrito para a principal banda correspondente a PCL.	46
Tabela 5.2 Tamanho hidrodinâmico das nanopartículas analisado por DLS ...	55

RESUMO

O presente trabalho visou sintetizar nanopartículas (NPs) de magnetita e submetê-las a um tratamento por policaprolactona (PCL) para modificá-las superficialmente e torná-las mais bioestáveis. As NPs obtidas, com e sem polímero PCL, foram caracterizadas quanto a sua microestrutura, propriedades magnéticas e citotoxicidade, para avaliar sua possível aplicação futura no tratamento de câncer. Buscou-se avaliar os efeitos que as modificações de superfície feitas com o polímero PCL podem ter nas NPs de magnetita, em como as diferentes quantidades do polímero que vai servir como surfactante podem influenciar nas características e propriedades, e como isso impactaria no seu uso em possíveis aplicações biomédicas. As NPs de óxido de ferro foram sintetizadas pelo método de coprecipitação e posteriormente se adicionou polímero policaprolactona em diferentes molaridades. As NPs foram então caracterizadas por difração de raio X (DRX), para analisar sua cristalografia, realizando a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para avaliar a presença do revestimento de PCL, suas morfologias foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET), o tamanho hidrodinâmico foi avaliado pelo método de espalhamento dinâmico de luz (DLS), seu comportamento magnético foi caracterizado pelo ensaio de VSM (Magnetômetro de Amostra Vibrante) e sua citotoxicidade para avaliar seu potencial biomédico foi investigado pelo ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) e por meio de microscopia de fluorescência com marcação de células vivas e mortas. Foi possível observar nanopartículas de magnetita, com tamanho de cristalito médio entre 9 e 11nm, com a presença do polímero sendo confirmada por suas bandas características aparentes no FTIR. O VSM confirmou o comportamento superparamagnético das nanopartículas, mostrando que as alterações superficiais realizadas pelo polímero não afetaram essa propriedade, e os ensaios de viabilidade celular realizado com células-tronco mesenquimais (CTM) comprovaram a biocompatibilidade das nanopartículas sintetizadas, sugerindo condições de um possível uso como vetores para tratamento de câncer por hipertermia e como plataformas de carreamento (DDS) e liberação controlada de fármacos.

Palavras-chave: nanopartículas, coprecipitação, magnetita, PCL, DDS, superparamagnetismo, citotoxicidade, biocompatibilidade.

ABSTRACT

The present work aimed to synthesize magnetite nanoparticles (NPs) submitted to a polycaprolactone (PCL) treatment in order to make surface modifications that would increase the magnetic nanoparticle (MNP) biostability. The produced MNPs, with and without PCL polymer, were characterized in terms of their microstructure, magnetic and cytotoxic properties for further application for cancer treatment. We sought to evaluate the effects that surface variations made with the PCL polymer can have on NPs of magnetite, how the different polymer's concentrations that serve as surfactants can influence the characteristics and proprieties, and how it affects their performance in possible biomedical applications. As the magnetite NPs were produced by the coprecipitation method, subsequently submitted to the polymer as a surfactant, in different amounts. The magnetite's NPs were then characterized by X-ray diffraction (XRD), to analyze their crystallography, performing infrared spectroscopy with Fourier transform (FTIR) to assess the presence PCL presence. Their morphologies were analyzed by scanning electron microscopy (SEM) and transmission (MET), hydrodynamic sizes were analyzed by dynamic light scattering (DLS). The magnetic behavior was verified by the flow value mapping test on the sample magnetometer (VSM) and its cytotoxicity to assess its biomedical potential investigated by the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium (MTT) and by fluorescence microscopy with marking of live and dead cells. It was possible to observe magnetite nanoparticles, with an average crystal size between 9 and 11 nm, with the presence of polymer being confirmed by its bands of apparent in the FTIR. The VSM confirmed the superparamagnetic behavior of the nanoparticles, showing how surface changes made by the polymer not affected by this property, its hydrodynamic sizes decreased with higher amounts of polymer, and the cell viability tests carried out with mesenchymal stem cells (CTM) proved the biocompatibility of the synthesized nanoparticles, suggesting the conditions of use as vectors for cancer treatment by hyperthermia and as development platforms (DDS) and controlled drug release.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de Variância

CMF - Solução tampão de fosfato salino livre de cálcio e magnésio

CTM - Células-tronco Mesenquimais

DDS - (do inglês *Drug Delivery Systems*) - Plataformas de Liberação de Fármacos

DLS - (do inglês *Dynamic light scattering*) – espalhamento dinâmico de luz

DMEM – Meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - (do inglês, Deoxyribonucleic Acid) – Ácido desoxirribonucleico

DRX – Difração de Raios X

FBS - (do inglês *Fetal Bovine Serum*) - soro fetal bovino

FDA - *Food and Drug Administration* (EUA)

FTIR - (do inglês, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) – espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

FWHM - (do inglês, *Full Width at Half Maximum*) - largura a meia altura

INCA - Instituto Nacional de Câncer

IP - Iodeto de propídio

IRM – Imagem por ressonância magnética

KBr – Brometo de potássio

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MET – Microscopia eletrônica por transmissão

MTT - teste do {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}

NP – Nanopartículas

NPM – Nanopartículas magnéticas

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde

PBS - (do inglês *phosphate buffered saline*) - tampão fosfato-salino

PLGA - Poli (ácido L-láctico-co-ácido glicólico)

PLLA - Poli (ácido L-láctico)

PCL - Policaprolactona

PEG – Polietileno glicol

pH – Potencial hidrogeniônico

SPM – Partícula superparamagnéticas

SPION - (do inglês, *Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle*) – nanopartícula superparamagnética de óxido de ferro

VSM - (do inglês, *Vibrating Sample Magnetometer*) – Magnetômetro de amostra vibrante

LISTA DE SÍMBOLOS

D – Diâmetro

D_C – Diâmetro crítico

D_{MAX} – Diâmetro máximo

FM – Ferromagnéticas

H – Campo magnético

H_C – Força coerciva

M – Magnetização

M_s - Magnetização de saturação

M_r - Magnetização remanente

T – Temperatura

T_b – Temperatura de bloqueio

T_C – Temperatura crítica

V – Volume

V_C – Volume crítico

1. INTRODUÇÃO

De acordo com os dados mais recentes da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) no ano de 2018, foram constatados no mundo 300.140 e 282.450 casos de câncer, de diferentes tipos, em homens e mulheres respectivamente. Os dados da OPAS também mostram que o câncer é a segunda principal causa de morte, totalizando 9,6 milhões no ano de 2018. Muitos desses casos de câncer poderiam ser revertidos se detectados precocemente e tratados de maneira efetiva, podendo reduzir a taxa de mortalidade em cerca de 30-50%. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) ainda estima 387.980 casos de câncer na população masculina e 297.980 na população feminina brasileira para o ano de 2020.

Atualmente, os tratamentos mais utilizados para o câncer são a intervenção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, os quais não garantem uma alta eficiência, principalmente quando aplicadas separadamente, e envolvem muitos efeitos colaterais (PEER *et al.*, 2007; ZAMAN, 2013). O que os tratamentos buscam é basicamente a intervenção na proliferação celular descontrolada, que dá origem ao tumor, e a sua retirada. Contudo, as problemáticas nesses tratamentos estão no fato de que a intervenção cirúrgica, quando possível, é um procedimento altamente invasivo, em um paciente que já está debilitado, e as células cancerígenas não são as únicas de proliferação rápida, sendo que a quimioterapia e a radioterapia acabam por atingir esses outros tecidos, gerando os efeitos colaterais como náuseas, queda de cabelo e afins (PIPPA G., 2008; PRICE; SIKORA, 2015).

Um jeito de contornar os problemas citados seria aumentar a especificidade dos tratamentos, direcionando-os para as células de interesse, diminuindo seu contato com células saudáveis, além da combinação de novos tratamentos, que fossem mais locais. Nesse intuito, pesquisas hoje já estão sendo feitas acerca de sistemas de liberação de fármacos (Drug Delivery Systems – DDS), e de tratamentos como a hipertermia. Os DDS podem ser de matriz orgânica, inorgânica, ou um conjunto, que são sintetizados de acordo com o interesse final do uso, possibilitando um aumento na eficácia do tratamento (KAMARAJ *et al.*, 2018; YUAN *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2011).

Entre as diversas nanopartículas que podem ser utilizadas no tratamento de câncer, as magnéticas são uma alternativa bastante atraente, por atuarem tanto no diagnóstico, quanto no tratamento da doença (YANG *et al.*, 2017b). As NPs de óxido

de ferro possuem características que as tornam interessantes para o assunto, são superparamagnéticas, têm alta susceptibilidade magnética, podem ser produzidas de maneira fácil e de baixo custo, são biocompatíveis, e já são utilizadas em aplicação biomédica, como em exames de raio X (SHARIFI; SHOKROLLAHI; AMIRI, 2012).

Por conta do seu tamanho, as NP possuem uma elevada razão entre a superfície e o volume, e conseqüentemente uma elevada energia de *Gibbs* superficial, o que leva à aglomeração ou agregação das mesmas, acarretando em uma maior instabilidade em meio fisiológico, fator que acaba dificultando sua aplicação direta como material de interesse biomédico. Visando aplicações efetivas, diversas pesquisas são realizadas investigando possíveis recobrimentos e modificações superficiais, que estabilizem essas nanopartículas magnéticas (NPM), aumentem o seu tempo dentro do sistema fisiológico, e sejam mais direcionadas ao lugar de interesse do tratamento (KUCHIBHATLA; KARAKOTI; SEAL, 2005).

No intuito de preservar as propriedades naturais das NPMs e ainda de conceder uma maior biocompatibilidade, bioestabilidade e direcionamento de tratamento, diversos estudos estão sendo feitos com polímeros, sendo que entre os mais utilizados em aplicações biomédicas encontra-se a PCL (HYUN, 2015; WANG *et al.*, 2018a).

Muitos estudos estão feitos na área, com processos complexos, e com pouca clareza de quais as conseqüências na alteração do recobrimento usado, seja no tipo, ou nas suas quantidades. É nesse contexto que o presente estudo busca analisar os efeitos das modificações superficiais ocasionadas pela PCL, e de que maneira elas podem interferir no uso das NPs magnéticas de óxido de ferro no tratamentos biomédicos.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi investigar a síntese por coprecipitação de magnetita modificada superficialmente por policaprolactona e sua caracterização microestrutural e de propriedades para aplicação no tratamento de câncer.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com o intuito de se obter o objetivo geral, objetivos específicos foram traçados:

- Obtenção das nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) por meio da coprecipitação;
- Modificações superficiais das nanopartículas com diferentes quantidades do polímero PCL;
- Caracterização estrutural dessas nanopartículas por meio de difração de raio X, (DRX), espectroscopia por infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica por transmissão (MET), microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Avaliação como os diferentes revestimentos influenciam na característica magnética, por meio de do VSM;
- Avaliação como os revestimentos influenciam da estabilidade coloidal da partícula, por meio do ensaio de espalhamento dinâmico da luz (DLS);
- Avaliação a citotoxicidade das nanopartículas, por meio do ensaio de MTT e visualização em microscopia de fluorescência.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CÂNCER

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a denominação “câncer” se refere a um conjunto de mais de 100 doenças que são desencadeadas pelo crescimento desordenado das células. Quando essa proliferação é muito exacerbada e descontrolada, ocorre a formação de tumores, que vão invadir tecidos e órgãos. A formação do câncer é um processo lento, por ser proveniente de uma mutação genética, podendo levar anos até que forme um tumor visível.

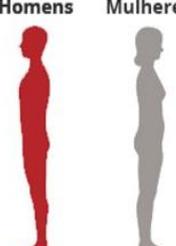
As divulgações de dados mais recentes do INCA mostraram que no ano de 2018 foram constatados 300.140 e 282.450 casos de câncer, de diferentes tipos, em homens e mulheres respectivamente no Brasil, sendo que no ano de 2015 foram registrados 107.470 homens, e 90.228 mulheres que foram a óbito por causa do câncer (INCA, 2019). Em nível global, dados da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) mostram que o câncer é a segunda principal causa de morte, em que a cada seis óbitos um está relacionado a esta doença, totalizando 9,6 milhões de mortes no ano de 2018, das quais 70% ocorreram em países de baixa e média renda.

Além da alta taxa de acometimento, o diagnóstico tardio e o tratamento inacessível para boa parte da população, principalmente nos locais de baixa renda, contribuem para a alta taxa de óbito, sem contar com o impacto no fator econômico. O último levantamento realizado pela OMS apontou que em 2010 foram gastos cerca de 1,16 trilhão de dólares com medidas para o tratamento da doença (OMS, 2018).

Muitos casos de cânceres podem ser revertidos quando detectados precocemente e tratados de maneira efetiva, sendo que essa taxa de mortalidade poderia ser reduzida em cerca de 30-50%, por meio de estratégias para prevenção e disseminação de informações sobre detecção precoce e tratamento dos acometidos (OPAS, 2018).

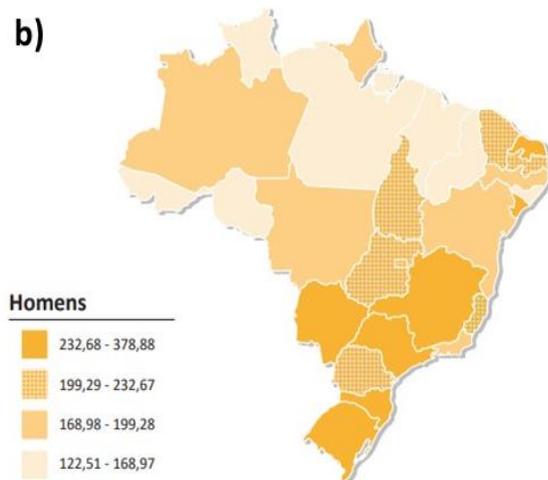
Para o ano de 2020 a estimativa é de 685.960 novos casos de câncer no Brasil, sendo aproximadamente 56,6 destes em homens e 43,4 em mulheres (Figura 3.1a). As maiores taxas masculinas (Figura 3.1b) e femininas (Figura 3.1c) se encontram nos Estados do Rio Grande do Norte, Sergipe, Mato Grosso e Santa Catarina como apresentado na Figura 3.2 (INCA, 2020).

a)

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens 		Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.540	9,1%			Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.710	7,5%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.200	5,0%			Glândula Tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema Nervoso Central	5.230	2,3%

* Números arredondados para múltiplos de 10

b)



c)

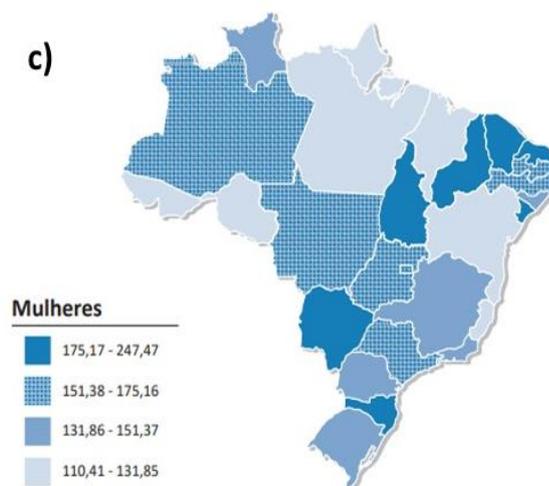


Figura 3.1 Demonstrativo da distribuição dos números de casos de câncer; a) dos 10 principais tipos, exceto pelo não melanoma por sexo; b) da população masculina por estado; c) da população feminina por estado (adaptado de INCA, 2020, acessado em 30/04/2020).

Os primeiros casos de tratamento de câncer estão relatados por volta de 1600 aC, por Edwin Smith e Ebers Papyrus, apesar do termo câncer só aparecer entre 460-370 aC, com Hipócrates (OLSON, 1989; ROSE J PAPAC, 2001; WOŹNIAK *et al.*, 2012). O tratamento primordial dessa condição era realizado somente pela cirurgia de retirada do tumor, e os que não eram passíveis de remoção eram tratados com compostos naturais e ervas (PRICE; SIKORA, 2015; ROSE J PAPAC, 2001). Somente no século XX que o termo quimioterapia foi surgir, quando o primeiro remédio efetivo pra câncer foi criado, por Paul Ehrlich (GRADMANN, 2011), e no meado desse mesmo século começaram-se os estudos com radioterapia (ROCKWELL, 1998). Hoje em dia, os tratamentos mais utilizados ainda se baseiam nesses mesmos três métodos, os quais ainda não garantem uma alta eficácia, principalmente quando aplicados

separadamente, e envolvem muitos efeitos colaterais (PEER *et al.*, 2007; ZAMAN, 2013).

O tratamento cirúrgico nem sempre é possível, pela localização do tumor, que dificulta o acesso, e pelos riscos oferecidos, que seriam o mesmo de qualquer procedimento cirúrgico invasivo, incluso as possíveis infecções e afins do pós operatório (WANG *et al.*, 2011). A radioterapia consiste na utilização de radiação ionizante para impedir diversas vias metabólicas celulares, que vão ocasionar no impedimento do crescimento das mesmas, podendo ser aplicada de maneira externa ou cirúrgica, mas por ser uma radiação, o controle completo da mesma não é possível, e células saudáveis também são atingidas, levando a efeitos colaterais (ROCKWELL, 1998).

A quimioterapia utiliza fármacos para frear a proliferação descontrolada das células cancerígenas, de modo a também prevenir uma metástase, e tentar fazer com que o tumor ou regreda, ou tenha um tamanho adequado para ser removido. Porém, esses costumam ser aplicados de forma sistêmica, passando por boa parte do corpo. A falta de especificidade dos fármacos, as altas dosagens usadas, e o fato de que algumas células sadias do corpo, como as do estômago, mucosa bucal, folículo capilar dentre outras, também se proliferam rapidamente, muitos efeitos colaterais são obtidos ao atingi-las, acarretando em náuseas, perda de cabelo, diarreia, fadiga muscular, ansiedade, problemas para dormir, disfunções sexuais, citotoxicidade, entre outros (PIPPA G., 2008; PRICE; SIKORA, 2015).

Uma alternativa para minimizar esses efeitos colaterais seria a realização de tratamentos mais específicos, tentando direcioná-los cada vez mais para atingirem somente as células cancerígenas, diminuindo os efeitos colaterais acarretados pelo uso sistêmico dos tratamentos, e fazendo-os o menos invasivo possível (MCKNIGHT, 2003). Pesquisas já estão sendo direcionadas para tratamentos mais locais, como sistemas de liberação (*Drug Delivery Systems – DDS*), que levam o fármaco o mais próximo possível do local onde se encontra o tumor, diminuindo seu contato com as células saudáveis, afim de diminuir os efeitos colaterais. Além disso, ao utilizar esses sistemas, a molécula bioativa fica mais protegida, aumentando sua eficiência de liberação e biodisponibilidade no local de interesse (PARK, 2014).

A ideia em si de utilizar um sistema direcionado para levar o medicamento a um local específico surgiu junto com o conceito de quimioterapia, por Paul Ehrlich, que

propôs também a ideia do “ZauberKugel”, traduzido para o inglês como “*magic bullet*”, ou bala mágica, em que ele utilizava o composto ativo de seu interesse ligado a um agente transportador para ter ação apenas no sítio alvo (GRADMANN, 2011).

Essa liberação mais controlada pode ser feita de diferentes maneiras, com a eficiência do método escolhido dependendo do local e do tipo de tumor em questão, com preferência para os locais que não contêm muitas barreiras fisiológicas a serem ultrapassadas. Esses carreadores podem ser orgânicos, inorgânicos, ou ainda um conjunto, fazendo com que seja possível variar morfologia e tamanho de modo a alcançar as características físico-químicas mais adequadas de acordo com a aplicação de interesse, mas sempre variando dentro da escala nanométrica (WANG *et al.*, 2011), permitindo também a funcionalização da superfície, para que ela consiga transportar mais eficientemente o fármaco (JIA *et al.*, 2012a; KAMARAJ *et al.*, 2018).

Parte das vantagens de usar esses sistemas, desde que definido o mais adequado, é que eles reduzem os efeitos colaterais, geram uma maior eficácia, conseguem passar por células, tecidos e vasos capilares até chegar no alvo, ativando a menor quantidade possível de macrófagos e outras células de defesa, de modo a aumentar seu tempo de disponibilidade (HENEWEER; GENDY; PEÑATE-MEDINA, 2012), além do uso de aproximadamente uma quantidade 100 vezes menor do fármaco (JAIN, 2010). A liberação do fármaco acontece por determinados estímulos, como variação de pH, temperatura, campo magnético, entre outros (GANTA *et al.*, 2008).

Por possuírem diversas vantagens a serem exploradas, com elevado potencial para diagnósticos e tratamentos, as nanopartículas têm chamado cada vez mais atenção dos pesquisadores, tendo um crescimento exponencial do número de publicações envolvendo nanopartículas e sistemas carreadores de drogas, como mostrado pela Figura 3.2 (WEB OF SCIENCE, 2019).

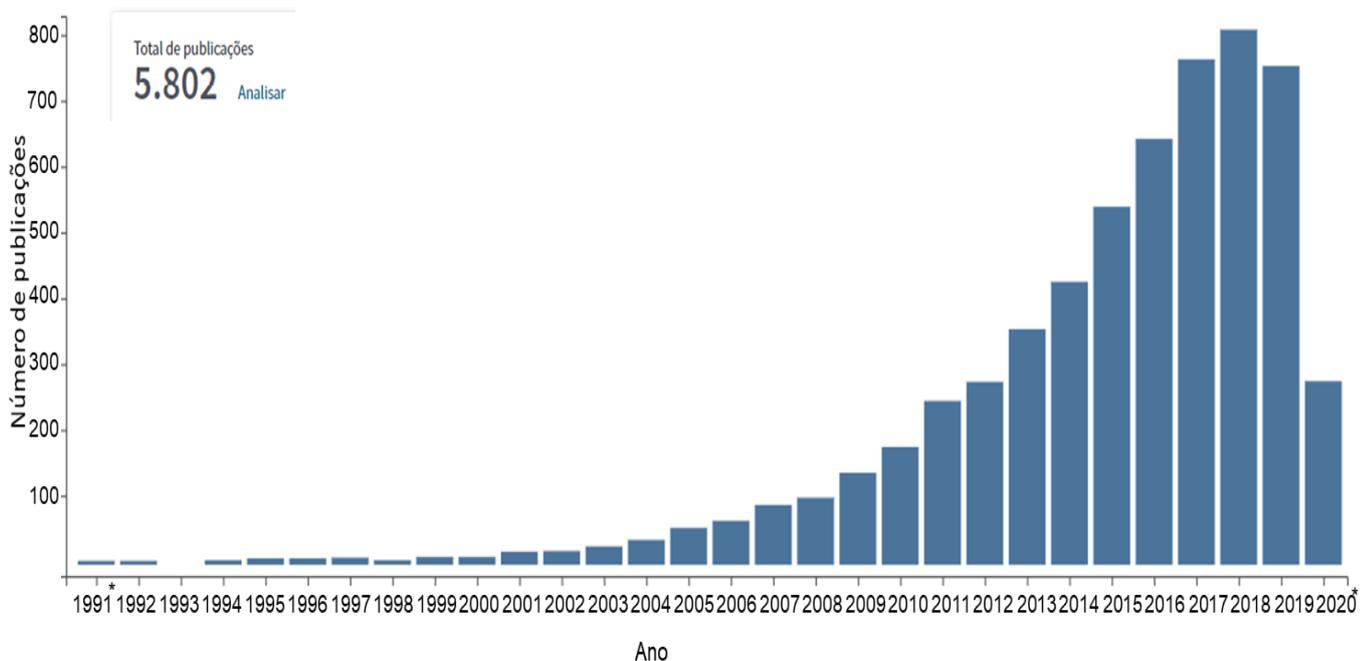


Figura 3.2 Demonstrativo da evolução do número de artigos científicos sobre nanopartículas e carreadores de fármacos (palavras chaves utilizadas), com o número de publicações na vertical, e o ano na horizontal. Fonte: Web of Science acessado em 08/05/2020, com *todos os artigos publicados no ano de 1991 e ** artigos publicados até maio de 2020.

Dentre as diversas nanopartículas que podem ser utilizadas no tratamento de câncer, as magnéticas são uma alternativa bastante atraente, por atuarem tanto no diagnóstico, quanto no tratamento da doença. Hoje, elas já são utilizadas como agentes de contraste para o exame de imagem por ressonância magnética (IRM), havendo muitos estudos para sua utilização como carreadores, além da possibilidade de tratamento por hipertermia, que permite além do aumento localizado da temperatura, uma liberação mais controlada, e uma imobilização dessas partículas a partir da aplicação de um campo magnético externo (YANG *et al.*, 2017b). Os maiores desafios na sua utilização é a produção em grande escala do material com um tamanho nanométrico e propriedades magnéticas adequadas, que sejam estáveis em condições fisiológicas, e que consigam ser incorporadas pelas células cancerígenas com uma rota de síntese pouco custos0061 (MELLO *et al.*, 2014).

3.2. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

As nanopartículas (NP) classificam uma vasta gama de materiais que possuem uma ou mais dimensões físicas estando entre 1 e 100 nanômetros, podendo ser magnéticas. Graças ao seu tamanho, elas possuem uma elevada razão entre área superficial e volume, apresentando assim características físico-químicas diferentes do

bulk, estando num estágio intermediário entre o estado molecular e o massivo. A variação no tamanho permite ajustar suas propriedades, incluindo as magnéticas, e funcionalizar a sua superfície, o que as torna bastante atraentes para aplicações biomédicas (KNOBEL, 2000).

A diminuição do tamanho da partícula acarreta na diminuição dos domínios magnéticos, alterando também a estrutura e a largura das paredes que os delimitam. O material no seu estado *bulk* é composto por múltiplos domínios magnéticos, já as nanopartículas possuem um monodomínio, até um certo limite, onde ocorre a diminuição da energia do sistema pela formação de domínios múltiplos (BERTRAND; LEROUX, 2012). Esses domínios são os grupos de *spins* que giram apontando para a mesma direção e agem em conjunto, separados pelas chamadas paredes de domínio. Essas por sua vez possuem largura e energia características, sendo a movimentação dessas paredes o principal fenômeno de reversão da magnetização (FARAJI; YAMINI; REZAEI, 2010).

Assim, é possível notar que as nanopartículas possuem propriedades únicas, com ênfase nas magnéticas, favorecendo a aplicações como as biomédicas, aproveitando essas suas características para utilizações em IRM, liberação local de fármacos, hipertermia e afins (KNOBEL, 2000). Porém, sua facilidade em agregar, rápida oxidação, hidrólise em condições fisiológicas dificultam a sua aplicação prática, sendo uma possível solução para esses problemas a modificação superficial por materiais orgânicos, poliméricos, ou inorgânicos biocompatíveis (PANKHURST *et al.*, 2003).

3.3. PROPRIEDADES MAGNÉTICAS DAS NPS

De maneira geral, existem seis tipos principais de comportamentos magnéticos: o paramagnetismo, diamagnetismo, antiferromagnetismo, ferromagnetismo, ferrimagnetismo e superparamagnetismo, que possuem diferentes alinhamentos dos momentos magnéticos na ausência de um campo (FARAJI; YAMINI; REZAEI, 2010).

Boa parte dos materiais exibem um baixo magnetismo (M), principalmente em seu *bulk*, propriedade ativada na presença de um campo externo aplicado. O magnetismo vai depender da estrutura atômica, da temperatura e do campo magnético (H) ao qual o material está submetido. Valores muito altos desse levam à magnetização do material a se aproximar do valor de saturação, gerando uma curva sigmoide característica (PANKHURST *et al.*, 2003).

Alguns materiais mantêm uma magnetização permanente mesmo após a retirada do campo, mantendo a magnetização de saturação (M_s), a qual, mesmo que H aumente, não é ultrapassada, por um período após a retirada do campo, diminuindo lentamente até uma magnetização remanescente isotérmica, a M_r , como no caso dos ferri e ferromagnéticos (ZHUO; CHENG, 2012). Os comportamentos magnéticos podem ser graficamente demonstrados por meio da curva de histerese, que relaciona a intensidade do campo magnético com a indução magnética (H-M), e diferenciados por meio da área que é formada dentro do laço de histerese (NARAYAN, 2009). A Figura 3.3 mostra a curva M-H para cada um dos tipos de magnetização, bem como a força coerciva (H_c), que seria a intensidade de H necessária para zerar a magnetização após alcançar M_r (ZHUO; CHENG, 2012).

A M_r e a H_c também são dependentes do tamanho de grão, e da presença de multidomínio das partículas. Aquelas formadas de domínios únicos, precisam de elevadas coercividades e remanescência para reverter a magnetização, acarretando em curvas de histereses maiores, enquanto os multidomínios tendem a ter curvas mais suaves, por terem valores menores. No super e paramagnéticos, a M_s é muito elevada, não tendo uma M_r (ZHUO; CHENG, 2012).

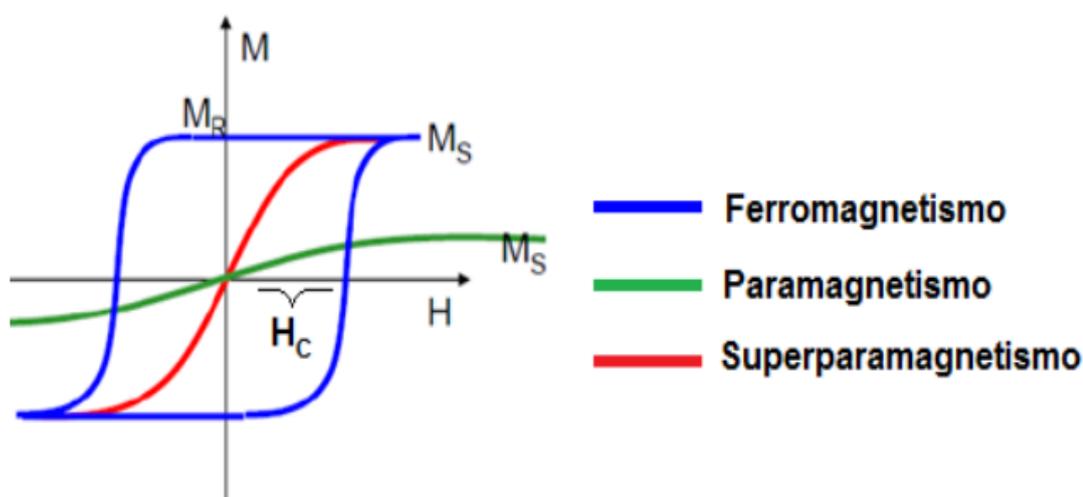


Figura 3.3 Curvas de histerese de alguns tipos de materiais magnéticos, com M sendo a magnetização, M_s a de saturação, M_r de remanescência, H_c força coerciva, H campo magnético (Fonte: ZHUO; CHENG, 2012).

As NPM de aplicação biomédicas são constituídas de um núcleo de um óxido metálico, ou de um metal, com comportamento superparamagnético. Elas são na

maioria das vezes é revestido por um polímero, ou por outro material inorgânico, a fim de garantir sua biocompatibilidade. A presença dessa modificação superficial estabiliza a NPM em condições fisiológicas, mantendo-a no corpo por tempo suficiente para cumprir seu papel. Além disso, esse material de superfície serve como ponto de ancoragem para o transporte do princípio ativo de interesse (CHAUGHULE; PURUSHOTHAM; RAMANUJAN, 2012b).

3.3.1. SUPERPARAMAGNETISMO

Materiais superparamagnéticos são aqueles materiais que não são naturalmente magnetizados, mas que facilmente se magnetizam quando submetidos a um campo magnético externo. Esse comportamento é característico de NPs ferri e ferromagnéticas que possuem domínio único (Figura 3.4). A transição entre mono e multidomínios ocorre em um certo diâmetro máximo (D_{max}). Abaixo desse ponto vai ocorrer o diâmetro crítico (D_c), que é aquele onde as NPs vão começar a apresentar o comportamento superparamagnético (FARAJI; YAMINI; REZAEI, 2010).

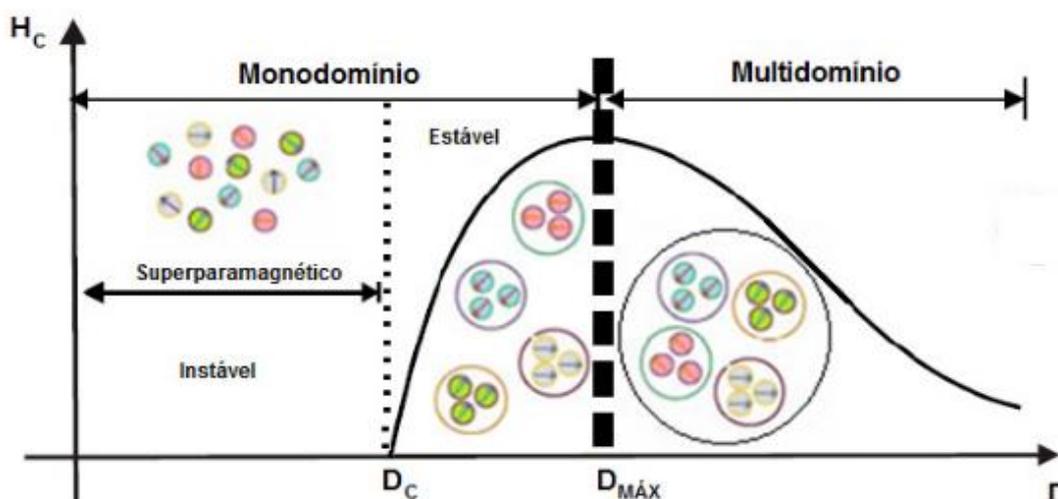


Figura 3.4 Ilustração da dependência entre coercividade (H_c) em relação ao diâmetro (D) da partícula (adaptado FARAJI; YAMINI; REZAEI, 2010).

Para partículas nanométricas, é mais favorável energeticamente que o monodomínio seja mantido. O comportamento superparamagnético está fortemente ligado com o tamanho dos cristalitos do material, começando a se fazer presente quando esses estão na escala de 20nm ou menor. Quando isso ocorre o momento magnético das partículas vão variar por conta da energia térmica. Nessas condições a remanescência é zero, fazendo com que a curva $M-H$ não possua histerese (Figura

3.5). Isso faz com que as partículas tenham menos tendência a se agregarem (NARAYAN, 2009). COERCIVIDADE FALAR POR ISSO QUE A REMANENCIA VAI A ZERO

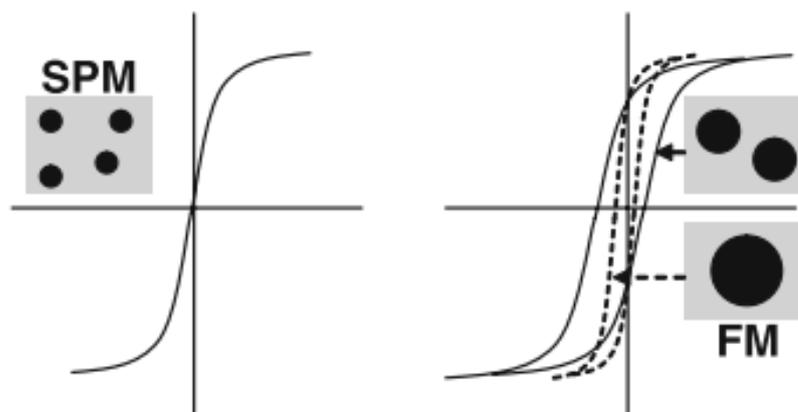


Figura 3.5 Efeito do tamanho na histerese da curva e o comportamento magnético, de acordo com o tamanho das partículas, sendo SPM as superparamagnéticas, e FM as Ferromagnéticas (adaptado de NARAYAN, 2009).

Assim, resumidamente, reduzindo o tamanho das partículas desses materiais magnéticos com multidomínios até uma determinada faixa de comprimento torna energeticamente favorável à manutenção de apenas um domínio, acarretando no comportamento superparamagnético, que faz com que campos magnéticos e flutuações térmicas aplicadas consigam facilmente direcionar os momentos magnéticos para longe dos eixos cristalográficos preferenciais. O D_c vai depender da forma, temperatura e anisotropia magnetocristalina, onde essa última é a energia que determina a direção preferencial das NP, sendo essa proporcional ao volume. Apesar de serem fáceis, e fortemente magnetizadas, elas não retêm esse comportamento com a retirada do estímulo, gerando sua curva de histerese característica, a qual é útil para aplicações como o aumento do sinal por IRM (CHAUGHULE; PURUSHOTHAM; RAMANUJAN, 2012a).

Os materiais portadores do comportamento superparamagnéticos também podem ser utilizados como plataformas de transporte controlado de fármacos, utilizando como gatilho da liberação sua resposta frente a um campo magnético externo, bem como utilizando esse comportamento para separação magnética de células e de DNA. Além disso, as NPM podem ser funcionalizadas, com polímeros, ou ser ligadas a anticorpos, enzimas, outras proteínas, fármacos, entre outras moléculas, para que sejam direcionadas ao tumor, a um tecido e órgão específico, por meio de

um campo magnético externo e para tratamentos hipertérmicos (JAIN, 2010; KUMAR; MOHAMMAD, 2011). Dessa forma, é possível aproveitar o comportamento magnético, e aumentar o tempo de circulação na corrente sanguínea.

3.4. USO BIOMÉDICO DO COMPORTAMENTO MAGNÉTICO DAS NPs

No caso das NPM que são empregadas como plataforma para liberação controlada de fármacos que utilizam do sistema circulatório para fazer a entrega direcionada (Figura 3.6), elas são administradas intravascularmente, e então um campo magnético externo é aplicado, de modo a atrair e reter as partículas no local de interesse (CHAUGHULE; PURUSHOTHAM; RAMANUJAN, 2012a; KUMAR; MOHAMMAD, 2011; NARAYAN, 2009)

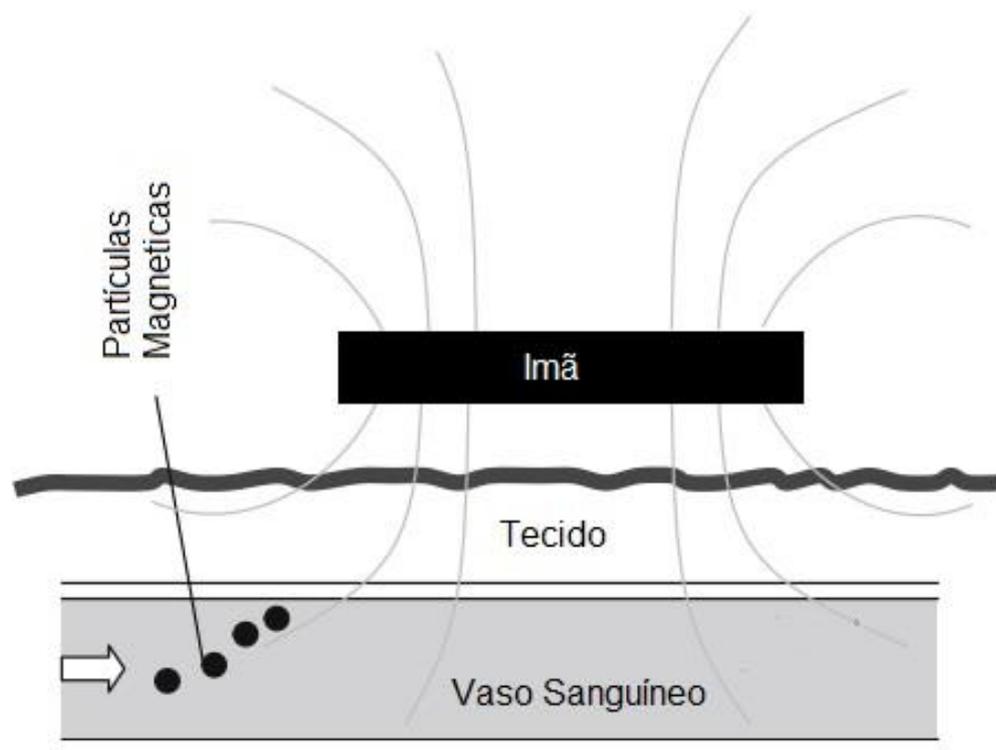


Figura 3.6 Ilustração representativa da movimentação das NPM contendo o fármaco pela corrente sanguínea por meio da aplicação de um campo magnético externo (Fonte: Narayan, 2009).

O vaso sanguíneo vai apresentar comportamentos para/diamagnéticos, por conta das hemoglobinas, e de outras proteínas (que contêm átomos de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio), respectivamente, mas ainda assim, essa resposta é muito mais fraca que a gerada pelas partículas magnéticas. Aplica-se um gradiente de campo, fazendo com que as partículas sejam direcionadas para o local de

interesse, utilizando posteriormente um campo mais forte e concentrado para a manutenção das partículas no local de interesse, e para ativar a liberação do composto ativo (NARAYAN, 2009).

O fenômeno da hipertermia aplicada as NPMs é a geração de calor por partículas superparamagnéticas frente à exposição a um campo magnético externo alternado, que vai fazer com que o momento magnético dessas oscile, gerando calor. Essa dissipação de calor ocorre pela rotação do momento magnético no seu núcleo (relaxação de Neel), ou pela rotação inteira da partícula magnética no meio fisiológico líquido (relaxação browniana). O método, além de ser pouco invasivo, trabalha numa faixa de temperatura na qual as células cancerígenas são mais sensíveis, levando à morte do tumor, com mínimo efeito nas células saudáveis (KUMAR; MOHAMMAD, 2011). Contudo, ainda se precisa encontrar a melhor combinação de nanopartículas para um tratamento mais local, além daquelas que diminuem o efeito da termoresistência, resistência criada pelas células cancerígenas ao tratamento térmico com o tempo (BECKHAM *et al.*, 2010).

A hipertermia pode ser trabalhada em diferentes faixas de temperatura, gerando diferentes estresses térmicos celulares, obtendo diferentes efeitos, existindo três tratamentos mais comuns, utilizando faixas de temperatura. A diatermia utiliza temperaturas inferiores a 41°C para o tratamento de doenças reumatóides e fisioterapia. A segunda possibilidade é a aplicação a hipertermia com temperaturas superiores ao 46°C, porém acarreta na necrose, coagulação e carbonização do tecido, e o terceiro tratamento, a hipertermia moderada, que vai trabalhar entre 41 e 46°C. Este último tratamento é o mais conhecido e ele atua em diversos mecanismos de degradação intra e extracelular, gerando danos no DNA e em diversas proteínas. A maior parte dos danos causados são irreversíveis para as células cancerígenas em apenas uma sessão de tratamento. Ocorre também a indução da regulação da apoptose, além disso, a nível do tecido tumoral ele altera o pH, e gera uma oxigenação e perfusão deste (GOLDSTEIN *et al.*, 2003; HILDEBRANDT *et al.*, 2002). Pode ser utilizada como um tratamento geral, como para o tratamento de metástases, regional quando o intuito é tratar apenas um órgão ou tecido, e ainda local, pegando áreas menores e mais específicas, como um tumor (*"Hyperthermia in Cancer Treatment - National Cancer Institute"*, 2011)

As NPM podem ser de Ni, Co, Fe, ligas magnéticas desses elementos, dentre outros, porém nem todos eles possuem biocompatibilidade, e alguns possuem um limite de quantidade antes da toxicidade muito baixo para serem utilizados em aplicações biomédicas, mesmo com o uso de recobrimento e outras funcionalizações, que costumam facilitar a utilização das NPM para esses fins. Além disso, é de interesse que o material a ser utilizado tanto para o diagnóstico, quanto para os tratamentos seja facilmente magnetizável, e tenha uma boa magnetização (NARAYAN, 2009). Hoje, já se sabe que a citotoxicidade de nanopartículas magnéticas depende de algumas características delas, como tamanho, hidrofobicidade, recobrimento, aglomeração e área superficial (NEL *et al.*, 2009).

Além de ser biocompatível e de ser efetivo para o carreamento da droga e liberação apenas no local de interesse, o material deve ser fácil de sintetizar e de separar. As nanopartículas do óxido de ferro (Fe_3O_4), como a magnetita, conseguem se enquadrar nessas características, sendo facilmente separadas da solução em que é preparada por métodos simples, que evitam sua degradação e do sistema carreador como um todo. Elas também aumentam em alguns casos o aporte celular do fármaco, além de servir para detecção por IRM (YAO; YANG; DUAN, 2014). Sem contar que possuem aprovação pela *Food and Drug Administration* (FDA) americana para usos clínicos (NEUBERGER *et al.*, 2005).

3.5. NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO

Apesar do atual interesse nessas partículas, o uso biomédico de nano e micropartículas magnéticas vem sendo aplicado desde 1970, quando foi introduzida a teoria da liberação de droga por vias magnéticas. A primeira a ser utilizada foi a magnetita, como agente de contraste para IRM, carreamento de fármacos, e hipertermia (WIDDER; SENYEI; RANNEY4, 1980).

A magnetita possui um comportamento ferrimagnético, é uma ferrita cúbica com fórmula Fe_3O_4 , possuindo os íons de Fe em dois estados de valência, +2 e +3 (Figura 3.7). Esses dois íons possuem momentos magnéticos diferentes, onde os momentos dos spins do Fe^{3+} se cancelam entre si, mas o material como um todo vai apresentar propriedades magnéticas, porque conta dos íons Fe^{2+} , que possuem seus momentos alinhados paralelamente (NARAYAN, 2009).

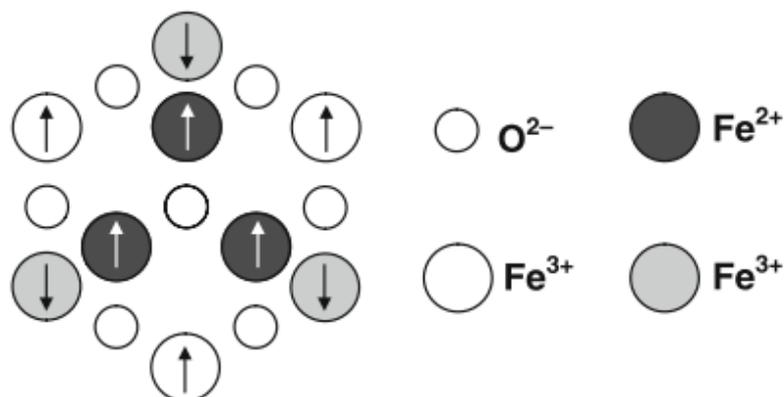


Figura 3.7 Esquema ilustrativo dos momentos magnéticos dos *spins* para os íons de ferro presentes na magnetita (Fonte: NARAYAN, 2009).

Por já possuir aprovação de utilização clínica, a utilização das magnetitas tem sido muito explorada, tanto para melhoria da eficiência do diagnóstico, quanto nos tratamentos de câncer. Elas apresentam como principais vantagens a biocompatibilidade, sua síntese é fácil de ser realizada, relativamente barata, que pode ser alcançada por diversas rotas. A magnetita tem suas características dependentes da síntese, então é possível ajustá-las ao uso, além de permitirem uma melhor especificidade de tratamento local por meio de funcionalizações da superfície, bem como do uso de um campo magnético externo (PANKHURST *et al.*, 2003). Mas a utilização dessas como tratamentos para doenças ainda está sendo investigada, para que dosagens adequadas possam ser ajustadas, já que existem trabalhos que reportam a citotoxicidade das NPs de magnetitas por desencadearem um estresse oxidativo, ocasionando a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), além da liberação de íons Fe²⁺ que causam um desbalanço eletrônico nas membranas celulares, dependendo das concentrações utilizadas (NEL *et al.*, 2009). Além da magnetita, outras NPs do óxido de ferro também são exploradas para aplicações biomédicas, pelos mesmos motivos da magnetita, como a hematita e a maghemita (HARRISON, 2015; SHISHKOVSKY *et al.*, 2018; VISWANADH *et al.*, 2018).

3.5.1. OBTENÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO

Devido a sua vasta gama de aplicações e benefícios, diversas rotas de síntese foram e estão sendo estudadas para que as características desejadas possam ser alcançadas. A produção dessas NPM pode ser por rotas químicas, físicas e até

biológicas, onde as mais usadas são as químicas, por sua maior simplicidade, reprodutibilidade e eficiência (SHI, 2006). Os métodos físicos dificultam o controle do tamanho das partículas, e os biológicos não mantêm homogeneidade e reprodutibilidade muito altas (GUPTA; GUPTA, 2005). Com relação às metodologias químicas, as NPM podem ser sintetizadas de diferentes maneiras, seja por decomposição térmica (TEJA; KOH, 2009), métodos sonoquímicos (SHAFI *et al.*, 1997; SUSLICK; PRICE, 1999), coprecipitação aquosa (WILLARD *et al.*, 2004), dentre outras, onde todas as técnicas apresentam vantagens e desvantagens, conforme Tabela 3.1. Essas características devem ser levadas em conta na hora de escolha do método a ser utilizado, de acordo com a aplicação final objetivada.

Tabela 3.1 Resumo comparativo dos principais métodos de síntese das nanopartículas de magnetita (adaptado de LU A.H. *et al.* 2007).

Método	Síntese	Temperatura de Reação (°C)	Tempo de Reação	Solvente	Agentes de Superfície	Distribuição de Tamanho	Controle de Forma
Coprecipitação	Muito simples, condições ambiente	20-90	Minutos	Água	Durante ou após reação	Relativamente estreita	Razoável
Decomposição Térmica	Complicado, atmosfera inerte	100-320	Horas/Dias	Orgânico	Durante a reação	Muito estreita	Muito bom
Microemulsão	Complicado, condições ambiente	20-50	Horas	Orgânico/Água	Durante a reação	Relativamente estreita	Bom
Hidrotérmica	Simples, altas pressões	220	Horas/Dias	Água/Etanol	Durante a reação	Muito estreita	Muito Bom
Sonoquímica	Complicado, altas pressões	5000	Horas/Dias	Álcool Isopropílico	Durante ou após reação	Muito estreita	Muito Bom

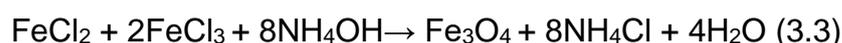
A coprecipitação é o método mais antigo e mais conhecido, dentre os métodos mostrados na tabela tem enfoque já há um tempo (PANTA, 2013). De maneira resumida, utiliza-se os sais dos metais como precursores, misturando-os em meio aquoso, de modo que ocorra a precipitação na forma de hidróxidos ou carbonatos. Dessa forma, é possível produzir em grandes quantidades, de maneira fácil, relativamente rápida, e sem muitos gastos (WILLARD *et al.*, 2004). As partículas geradas por essa rota permitem diversas modificações de superfícies, com intuito de aumentar sua biocompatibilidade, menor agregação, maior tempo no meio fisiológico, e maior especificidade (GUPTA; GUPTA, 2005; LAURENT *et al.*, 2008).

3.5.1.1. Síntese via Coprecipitação

A coprecipitação é o método mais comum para obtenção das nanopartículas de Fe₃O₄, por meio da mistura de íons ferrosos e férricos, respeitando uma proporção molar de 1:2, em solução básica, em sistema aquecido, ou a temperatura ambiente, dependendo das características finais de interesse. O tamanho final obtido na síntese das nanopartículas de óxidos de ferro é dependente dos precursores utilizados, temperatura, pH e velocidade de agitação da reação (LAURENT *et al.*, 2008). A reação química de síntese ocorre de acordo com a Equação 3.1.



Pela termodinâmica, a reação de precipitação deve ser completa numa faixa de pH variando entre 8-14, mantendo a proporção estequiométrica, sendo que ambas estruturas diferem entre si pela presença de vacâncias catiônicas dentro do sítio octaédrico (LAURENT *et al.*, 2008; MARTINS, 2019). Para manutenção da basicidade do meio, utiliza-se hidróxidos, de sódio (NaOH) ou de amônio (NH₄OH), com as reações ocorrendo de acordo com as Equações 3.2 e 3.3 respectivamente, quando utilizando cloretos como precursores.



No caso de utilização da reação correspondente à Equação 3.2, excesso do FeCl₂ e do NaCl devem ser adicionados, para garantir que apenas uma fase da magnetita se forme, e para diminuir a agregação das partículas, respectivamente (LAURENT *et al.*, 2008). Durante a síntese, a formação da magnetita é indicada pela troca de coloração da solução, ficando preta, gerando partículas dessa mesma coloração no final. A exposição a uma atmosfera oxidante pode favorecer a conversão em maghemita, levando a amostra a adquirir um tom ocre, característico da espécie oxidada (MARTINS, 2017).

Esse método tem a grande vantagem também de permitir a funcionalização posterior da superfície da partícula, por meio de recobrimentos e modificações superficiais, utilizando principalmente polímeros, além de permitir um certo controle no tamanho da partícula, e produção em grande escala, o que são características bem

interessantes para aplicações biomédicas (CHAUGHULE; PURUSHOTHAM; RAMANUJAN, 2012b).

O processo de coprecipitação é dividido basicamente em duas etapas, a de nucleação e a de crescimento. Na primeira, quando a concentração das espécies constituintes atinge uma supersaturação crítica, ocorrendo uma criação rápida de núcleos, por meio de uma precipitação homogênea. A partir daí, começa a segunda etapa, na qual os núcleos vão crescer lentamente, de maneira uniforme, por meio de difusão dos átomos para esses (CHAUGHULE; PURUSHOTHAM; RAMANUJAN, 2012b). Então, controle do tamanho das partículas deve ser realizado na etapa de nucleação, pois após a formação desses, o número de partículas se mantém inalterados durante a fase de crescimento (LAURENT *et al.*, 2008).

As principais características das etapas de nucleação e crescimento para uma produção efetiva e homogênea pode ser resumida em uma elevada taxa de nucleação, com formação rápida desses núcleos, impedindo um aumento da concentração acima da de nucleação, para limitar a quantidade desses que são formados. Além disso, a taxa de crescimento deve ser lenta, já que ela ocorre por um período muito maior de tempo, para não ser fator limitante da nucleação, e ser um passo passível a controle do tamanho das NPs (FARAJI; YAMINI; REZAEI, 2010).

Como as propriedades das NPs são dependentes do seu tamanho, muitos estudos têm sido feitos no intuito de conseguir um maior controle nos fatores que influenciem a formação dessa característica durante o processo de síntese, onde muitos desses mostram que o tamanho tem sido bem ajustado pelo controle de pH, temperatura, força iônica e precursores utilizados. Com isso ajustam-se as características magnéticas e propriedades de superfície, bem como as propriedades provenientes da sua superfície, como possibilidade de modificações que dificultem sua aglomeração, aumentem sua biocompatibilidade, e especificidade quando usadas em sistemas biomédicos (LAURENT *et al.*, 2008).

3.5.2. ESTABILIDADE COLOIDAL DAS NANOPARTÍCULAS

Por conta do seu tamanho, as NP possuem uma elevada razão entre a superfície e o volume, e conseqüentemente uma elevada energia de Gibbs superficial. Para tentar minimizar essa energia, as NPs tendem a crescer mais durante a fase de crescimento, se aglomerando e agregando, na tentativa de diminuir a sua área superficial. Na agregação, as partículas se ligam fortemente, por ligações metálicas

ou covalentes, formando agregados com diferentes tamanhos, dependendo do material que são feitas, seus precursores, e dos parâmetros de reação utilizados. Já na aglomeração, diferentemente do fenômeno anterior (Figura 3.9), a ligação é fraca, por forças de van der Waals, e costuma ocorrer entre os agregados, tendo uma área superficial final correspondente à soma das áreas dos agregados (ISO/TS 80004-2:2015, 2015).

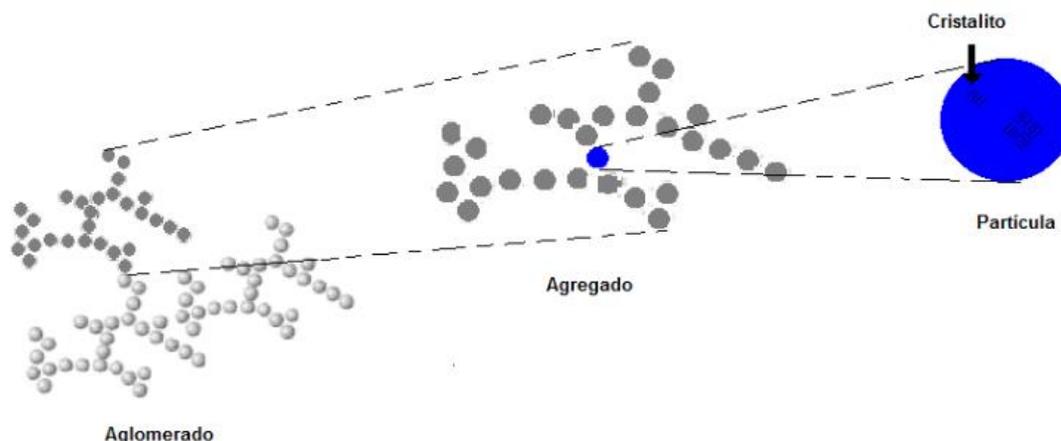


Figura 3.9 Configurações ilustrativas de um agregado e de um aglomerado, a partir do cristalito de um material (adaptado de ISO/TS 80004-2:2015, 2015).

A atração magnética existente entre as partículas NPs de óxido de ferro acarreta em uma maior aglomeração, essas quando em solução estão sempre em movimento browniano, colidindo umas com as outras, fenômeno que facilita a formação dos agregados, que com passar do tempo podem adquirir tamanhos consideráveis. Isso levaria a uma maior instabilidade e até uma possível precipitação em condições fisiológicas, por isso que diversos métodos de alterações superficiais e afins são propostos (KUCHIBHATLA; KARAKOTI; SEAL, 2005).

Além disso, a oxidação das NPM é um fator muito importante a ser levado em consideração, já que pode levar a uma perda significativa do seu magnetismo e dispersibilidade. Para evitar a oxidação, aglomeração e agregação inúmeras técnicas de estabilização química da superfície vêm sendo testadas, sendo divididas em estéricas e eletrostáticas (SCHMIDT, 2007).

A estabilização estérica é física, ela evita que haja o contato entre duas partículas coloidais, utilizando um material espaçador para isso, que pode estar ligado covalentemente à superfície das NPs, ou ser adsorvido. Já na estabilização eletrostática, ocorre a variação da carga superficial, de modo que ocorra uma repulsão

entre as superfícies das partículas eletricamente carregadas, por meio da utilização de solventes ou dispersantes de diferentes polaridades (KUCHIBHATLA; KARAKOTI; SEAL, 2005; SCHMIDT, 2007).

Boa parte das pesquisas para estabilização está fundamentada no método estérico, utilizando diferentes moléculas orgânicas com grupos polares, ou polímeros para a realização, aproveitando as propriedades adquiridas no processo, como solubilidade, tamanho e estrutura (DUTTA *et al.*, 2018a; KUCHIBHATLA; KARAKOTI; SEAL, 2005).

Para aplicações biomédicas, a fim de aproveitar o magnetismo da magnetita, diversos estudos são feitos com polímeros, para aumentar sua biocompatibilidade, bioestabilidade, e fazer com que elas sejam mais específicas, e consigam transportar os fármacos de interesse de uma maneira mais eficiente. Entre os polímeros mais utilizados, encontram-se o PEG (DUTTA *et al.*, 2018b; KARIMI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017; YOU *et al.*, 2019), PLGA (GHANBARI; SHAMSPUR; FATHIRAD, 2017a, 2017a, 2017b; JIA *et al.*, 2012a, 2012b; LIU *et al.*, 2014; MOSAFER *et al.*, 2017; WEINA *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2017a), PLLA (CORREIA *et al.*, 2016; SAFARI *et al.*, 2014; SHAN *et al.*, 2013), PCL (HYUN, 2015; WANG *et al.*, 2018a), dentre outros. Estudos mostraram uma boa eficiência da utilização das NPs de óxido de ferro para aplicações biomédicas, de modo a aproveitar sua propriedade superparamagnética para o tratamento e diagnóstico de células cancerígenas, com o menor efeito colateral possível em células saudáveis, uma melhora na estabilidade e compatibilidade após o recobrimento, bem como a criação de uma plataforma mais eficiente para liberação do fármaco em condições biológicas (DUTTA *et al.*, 2018b; KARIMI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017; YOU *et al.*, 2019). Porém, a maior parte desses estudos só se estende a testes *in vitro*, ainda sendo necessária a realização de mais pesquisas antes que se possa passar pra testes *in vivo* e clínicos, sendo uma área bem vasta a ser explorada ainda.

3.5.3. MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL COM POLICAPROLACTONA

A policaprolactona (PCL) é um polímero semicristalino, da família dos poliésteres alifáticos, é tenaz e flexível, tendo baixo ponto de fusão (cerca de 60°C) e baixa temperatura de transição vítrea (entre -60 e -70°C) e de baixo custo de produção. É um polímero que apresenta uma boa solubilidade em solventes orgânicos comuns, e é passível à degradação enzimática, além de ser biocompatível,

biodegradável, bioreabsorvível, não tóxico e já aprovado pelo FDA, sendo assim um ótimo candidato para usos biomédicos e farmacêuticos (KRUKIEWICZ; ZAK, 2016; ROA *et al.*, 2010; SIQUEIRA *et al.*, 2018). Além disso, a PCL tem vantagens em relação a outros polímeros por ser altamente permeável para vários tipos de princípios ativos, sua degradação não gera um ambiente ácido, e é passível a síntese de copolímeros (SINHA *et al.*, 2004).

Diversos estudos são feitos com a PCL, mostrando suas distintas aplicações biomédicas, sendo usada de maneira injetável como um *DDS* para tratamento de câncer de mama (SHARIFI *et al.*, 2009), para carreamento de fármacos de tratamento de câncer que são pouco solúveis (VARAN; BILENSOY, 2014), como nanofibras combinadas com fármacos para o tratamento de câncer de pulmão (SRIDHAR *et al.*, 2014), e micelas de PCL com curcumina para terapia de câncer de cólon (GOU *et al.*, 2011), entre outras aplicações.

Algumas características da PCL que facilitam seu manuseio, como a solubilização em muitos solventes orgânicos e sua baixa temperatura de fusão, podem acabar sendo limitantes nas suas aplicações biomédicas e farmacêuticas, sendo uma boa alternativa para melhorar sua eficácia na utilização em conjunto de nanopartículas inorgânicas, como as NPs de magnetita e outras NPs do óxido de ferro, que têm propriedades de interesse para essas aplicações, além de também já ser aprovada pelo *FDA* (CHEN *et al.*, 2013; GHANBARI; SHAMSPUR; FATHIRAD, 2017a; HARRISON, 2015; HYUN, 2015; SHISHKOVSKY *et al.*, 2018; VISWANADH *et al.*, 2018)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxograma da Figura 4.1 ilustra a metodologia utilizada no trabalho.

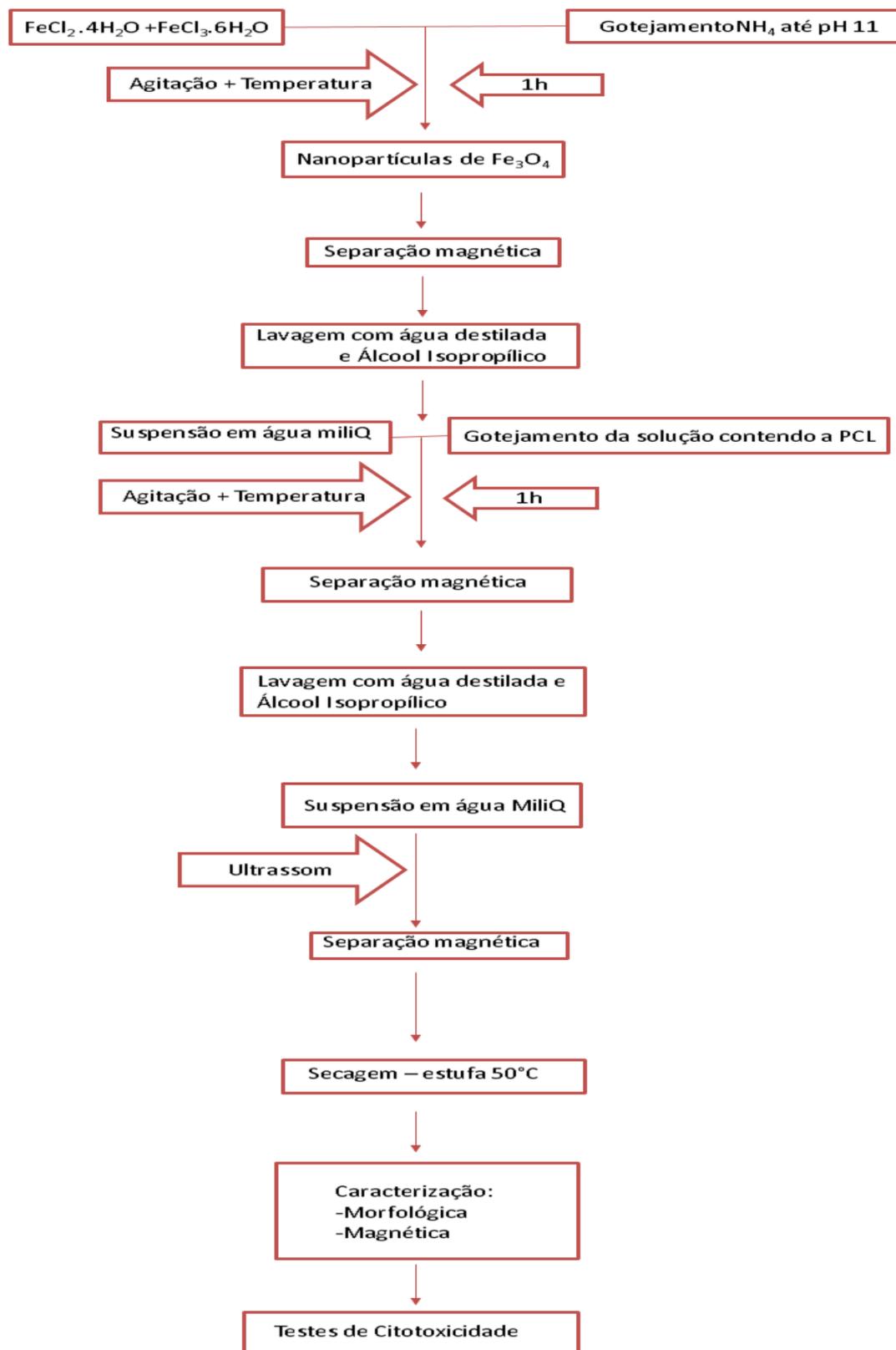


Figura 4.1 Fluxograma do processo experimental de síntese e caracterização das NPMs.

4.1. MATERIAIS

A Tabela 4.1 apresenta os reagentes utilizados para a produção das nanopartículas e seu recobrimento.

Tabela 4.1 Reagentes utilizados, grau de pureza, fabricante e função neste trabalho.

MATERIAL	PUREZA	FABRICANTE	FUNÇÃO
Acetato de etila p.a.	99,5%	Neon	Diluyente
Acetona p.a	99,5	Reatec	Diluyente
Água Milli-Q		Lacer	Diluyente
Álcool isopropílico	99,5%		Diluyente
Cloreto de ferro III hexahidratado	≥ 99%	Sigma-Aldrich	Precursor
Cloreto de ferro II tetra hidratado	≥ 99%	Sigma-Aldrich	Precursor
Hidróxido de amônio P.A.	28-30%	Vetec	Ajustar ph
Policaprolactona	60 (peso molecular)	Sigma-Aldrich	Recobrir

4.2. MÉTODOS

As NPs foram divididas em 5 tipos de tratamentos diferentes, que diferiram entre si pela quantidade de polímero PCL utilizado para sua modificação superficial, conforme representados pela Tabela 4.2, com quantidades baseadas na literatura, com algumas adequações (HYUN, 2015; SAFARI *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2018a; ZHANG *et al.*, 2014).

Tabela 4.2 Identificação por nome das amostras sintetizadas e quantidade utilizada de polímero PCL.

Nome da amostra	Quantidade utilizada da PCL (mg)
Am0	0
Am20	20
Am40	40
Am60	60
Am80	80

4.2.1. SÍNTESE E MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DAS NANOPARTÍCULAS DE Fe_3O_4

As NPs foram preparadas de acordo com o método de coprecipitação (AZIZ *et al.*, 2006), respeitando a estequiometria da Equação 3.1 e a proporção molar de 1:2, em solução básica, com pH mantido em 11 (LAURENT *et al.*, 2008).

Os sais cloreto férrico hexahidratado e cloreto ferroso tetra hidratado foram utilizados como precursores, nas proporções citadas acima. Primeiramente, ambos foram colocados em um béquer, contendo 40mL de água Milli-Q. Uma solução de hidróxido de amônia 25% foi gotejada na solução até atingir o pH 11. Com a mistura, a solução passou de uma cor amarelada para preta, sendo possível assim visualizar a formação do Fe_3O_4 . A reação teve sua temperatura e velocidade de agitação controladas por uma manta térmica, sendo que nesta primeira etapa, a temperatura foi mantida a 60°C com agitação magnética vigorosa por 1h (PANTA, 2013).

Para a modificação superficial, o polímero PCL foi dissolvido em uma solução padrão de acetona e acetato de etila 4:1 respectivamente, com agitação constante de 200 rpm e temperatura de 50°C durante o tempo necessário para que houvesse a completa dissolução do polímero.

Após 1h de síntese das NPs, essas foram separadas magneticamente e lavadas com água Milli-Q, álcool isopropílico e suspendidas novamente em água Milli-Q. As soluções contendo o polímero PCL nas quantidades descritas na tabela 4.2 foram então introduzidas pelo método ajustado de emulsão oleosa-aquosa com evaporação de solvente (WANG *et al.*, 2018a). A solução orgânica contendo o polímero PCL foi adicionada por gotejamento na solução aquosa contendo as NPs, em quantidades correspondentes aos tratamentos de cada grupo, sob agitação vigorosa por mais 1 hora, para permitir a interação entre as NPs e a PCL, e para que os solventes evaporassem. Após esse tempo, as NPs modificadas superficialmente pelo polímero foram separadas magneticamente da solução com o auxílio de um ímã, conforme a Figura 4.2, sendo a solução restante descartada. As NPs foram então lavadas com água Milli-Q, álcool isopropílico, e água Milli-Q novamente sendo submetidas a 15 min de ultrassom (Ultrasonic Processor, Cole-Parmer), coletadas magneticamente, e colocadas na estufa a 50°C para secar. A razão entre polímero e NPM variou de 1:10 para 1:2 entre os tratamentos.



Figura 4.2 Separação magnética das nanopartículas sintetizadas no presente trabalho.

4.2.2. CARACTERIZAÇÃO

A caracterização das NPs foi realizada por diferentes métodos, para analisar composição, morfologia, e citotoxicidade, descritos a seguir.

4.2.2.1. Difração de Raio X

Técnica utilizada para verificar as fases obtidas das NPs, a partir de um difratômetro X'Pert MPD (Phillips), equipado com um monocromador de grafite e um ânodo rotativo de cobre, com radiação de Cu-K α ($\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$), operando a 40 kV e 40 mA. O intervalo angular utilizado foi de 5 a 75°, passo de 0,05° e tempo de contagem 3 segundos para cada passo. O resultado final foi comparado com o banco de dados do programa X'Pert Highscore Plus® (Philips).

4.2.2.2. Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi utilizada para possibilitar a avaliação das alterações superficiais sofridas pelas NPs ao serem recobertas pela PCL. Utilizou-se um espectrômetro IRAFFINITY 1 (Shimadzu), com resolução de 4 cm $^{-1}$ e 16 varreduras por amostra, sendo todas as alíquotas das amostras diluídas em KBr.

4.2.2.3. Caracterização Morfológica

As amostras foram primeiramente submetidas a microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando um microscópio EVO MA10 (Carl Zeiss), a 13,4 kV. As amostras foram depositadas sobre uma fita de carbono amorfo que se encontrava sobre um porta amostra de alumínio.

Posteriormente, fez-se a análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) em um microscópio de transmissão Jeol JEM operando a 80kV. As amostras foram suspensas em solução de uranila aquosa 2%, depositada em *grids* e deixadas em repouso por 24h para que secassem em condições ambiente antes da análise.

O tamanho hidrodinâmico das NPMs foi analisado pelo método de espalhamento dinâmico de Luz (DLS), em um Zetasizer Nano ZS (Malvern). As medições foram realizadas utilizando uma solução das nanopartículas com concentração de 0,1 mg/mL em água ultrapura, a 25 °C. Foram realizadas 6 medições por amostra.

4.2.2.4. Caracterização Magnética

As medidas de magnetometria foram realizadas no magnetômetro de amostra vibrante (VSM) do laboratório de Magnetismo (LAM) do instituto de Física da UFRGS. Utilizou-se um VMS MicroSense, com tempos de leitura de 40min.

4.2.2.5. Obtenção das Células-tronco

As células-tronco mesenquimais (CTM) utilizadas no presente trabalho foram isoladas de dentes decíduos humanos doados por pacientes da Clínica Infanto-Juvenil da Faculdade de Odontologia da UFRGS. O projeto foi aprovado na COMPESQ-FAR e no Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da UFRGS (Plataforma Brasil - CAAE nº 36403514.6.0000.5347), e todos os participantes assinaram um termo de consentimento.

Após extraídos, os dentes foram transportados para o Laboratório de Hematologia e Células-tronco da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Em capela de fluxo laminar, as células foram recuperadas por digestão enzimática após a polpa ter sido extraída com o auxílio de uma colher de dentina, com o procedimento sendo realizado em até 24 horas após a extração do dente.

Para o procedimento de obtenção das células, a polpa foi colocada em uma solução de colagenase tipo I a 0,2% (Gibco, Grand Island, NY) por 1 hora em banho

maria a 37°C e então centrifugada, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspenso e semeado em uma placa de cultura, sendo incubadas a 37°C e em ambiente contendo 5% de CO₂. O meio de cultura essencial de Eagle modificado por Dulbecco, DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), suplementado com 10% de soro fetal bovino, SFB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), e 1% de solução de penicilina-estreptomicina (Gibco, Grand Island, NY) foi trocado a cada 3 ou 4 dias, e as passagens eram realizadas quando as culturas atingiam confluência, sendo replicadas sempre respeitando uma proporção de 5.000 células/cm². Todos os testes para comprovação da caracterização das CTM foram realizados entre a terceira e quinta passagem (P3 e P5 respectivamente).

Antes da utilização das células para o ensaio de viabilidade celular, elas foram caracterizadas como CTM por meio da citometria de fluxo com diferentes anticorpos conjugados para marcação das mesmas. Além disso, para confirmação da identidade das células obtidas, foram realizados ensaios de diferenciação celular *in vitro*, para testar a diferenciação em tipos celulares mesenquimais (osteogênica, adipogênica e condrogênica), conforme feito por (BOTTEZINI (2019).

4.2.2.6. Viabilidade Celular por MTT

Para avaliar e quantificar a toxicidade que as NPs poderiam ter em células foi realizado o ensaio de viabilidade celular por meio do ensaio de atividade metabólica mitocondrial, que é um método colorimétrico que utiliza o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio, ou MTT. O teste consiste na redução enzimática do MTT, que é originalmente amarelo, a azul de formazan por redutases nas mitocôndrias de células metabolicamente ativas, dando origem a uma coloração violeta que é proporcional ao número de células que estão viáveis.

Foram testadas 5 concentrações diferentes de cada uma das NPMs (0, 100, 500, 1000 e 2000 µg/mL). Células-tronco foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços (Kasvi), com uma densidade de 7.500 células por poço, durante 24h. Para realização dos tratamentos, as NPMs foram suspendidas em meio de cultura, adicionadas em alíquotas que correspondessem às concentrações descritas acima ao novo meio de cultura nos poços e deixadas por dois dias. Após o período de exposição, o meio de cultura foi removido, e as células foram incubadas com MTT 0,25mg/mL em solução tampão de fosfato salino livre de cálcio e magnésio (CMF), por 3,5 horas a 37°C. Transcorrido esse tempo, retirou-se a solução de MTT e

adicionou-se 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolver os cristais de formazan formados. A leitura das absorvâncias foi realizada por um espectrofotômetro Multiskan™ FC (ThermoScientific), utilizando comprimentos de onda de 570 e 630 nm, e os resultados foram calculados por meio da diferença entre as duas leituras.

4.2.2.7. Ensaio de coloração com diacetato de fluoresceína-iodeto de propídio

A viabilidade celular também foi avaliada a partir da análise da coloração com diacetato de fluoresceína e iodeto de propídio (IP). Esse ensaio também é conhecido por diferenciar as células vivas das mortas. Isso se dá pelo fato que ambos os reagentes penetram nas células, onde o diacetato de fluoresceína é incorporado no citoplasma das células vivas, e ao ser clivado por lipases ali existentes emite uma fluorescência verde, marcando-as dessa forma. Já o IP por ser lipossolúvel não conseguindo corar o DNA de células saudáveis, sendo rapidamente expelido pelas células vivas, mas não pelas células mortas, marcando-as com uma fluorescência vermelha. Dessa forma, tudo que for visualizado em verde posteriormente são células vivas, e tudo que se mostrar vermelho são células mortas.

Após a incubação das células com as NPs, os poços tiveram seus sobrenadantes descartados e foram lavados com PBS, recebendo posteriormente uma solução contendo 10µg/mL de diacetato de fluoresceína, e 5µg/mL de IP dissolvidos em tampão de fosfato. A leitura da fluorescência foi realizada por um microscópio de fluorescência Leica DMI8 (Leica Microsystems).

4.2.2.8. Análises estatísticas

Os resultados de absorvância foram submetidos a análises estatísticas por meio da análise de variância (ANOVA), seguida pelo Teste de Tukey utilizando o *software* Bioestat (Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. ONG Mamiraua, Belém-PA) com a significância sendo considerada a partir de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CRISTALINIDADE DAS NP DE ÓXIDO DE FERRO

A Figura 5.1 mostra os padrões de difração de raios-X dos materiais obtidos na síntese de Fe_3O_4 , sem e com o polímero PCL, sendo encontradas reflexões em (220), (311), (400), (422), (511) e (440) que são correspondentes à magnetita (ICSD 01-088-0315). Esses picos indicam a estrutura cristalina do espinélio cúbico do Fe_3O_4 , comprovando a eficácia do método de coprecipitação (DUTTA *et al.*, 2018a; PANTA, 2013).

É possível observar a presença também de hematita, que aumenta com o aumento da quantidade de PCL utilizada, esse aparecimento pode estar relacionado com o mecanismo de relaxação da superfície do espinel (BLIEM *et al.*, 2014). Contudo, essa NP do óxido de ferro também vem sendo utilizada em pesquisas biomédicas, sendo também biocompatível, não sendo prejudicial (HARRISON, 2015; SHISHKOVSKY *et al.*, 2018; VISWANADH *et al.*, 2018).

Sabe-se que a magnetita e a maghemita possuem estruturas cristalográficas muito parecidas, sendo possível a apresentação de picos sobrepostos no padrão de difração (LAURENT *et al.*, 2008). Levando em consideração que a síntese não foi realizada em atmosfera redutora, seria possível esperar a formação da fase hidratada maghemita, e de coloração ocre. No entanto, a coloração negra foi um forte indicativo da composição ser preferencialmente de magnetita (MARTINS, 2017).

Diferentemente do retratado por WANG *et al.*(2018), que tiveram nos seus DRX somente os picos correspondentes ao polímero, e justificou a ausência dos picos da magnetita por conta do recobrimento, no presente trabalho não foi possível observar os picos do PCL nos padrões de DRX. Isso pode ser devido ao fato de que as quantidades de polímero utilizadas neste trabalho foram menores que as concentrações investigados por esses pesquisadores. A intenção aqui era preservar as propriedades magnéticas das NPs para uma possível aplicação em hipertermia, característica que pode sofrer alterações por conta do recobrimento (WANG *et al.*, 2018a). Entre as amostras sintetizadas a principal diferença observada no DRX foi a presença de hematita, que se mostrou mais significativa nas maiores dosagens do polímero, mas sem diferenças significativas nos picos correspondentes à magnetita.

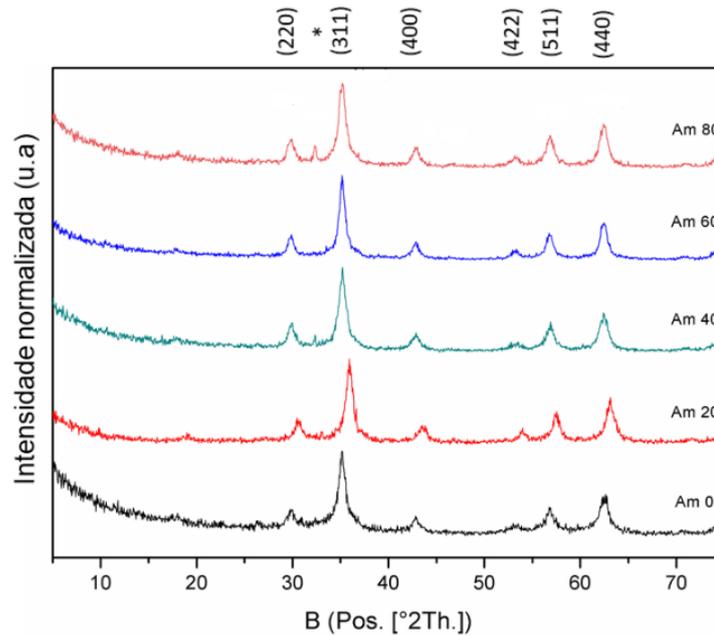


Figura 5.1 Padrões de DRX das NPMs preparadas com diferentes concentrações de PCL, com a reflexão da hematita indicada em *.

5.2. COMPROVAÇÃO DA PRESENÇA DO POLÍMERO NA NP

Utilizou-se a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier para caracterizar as NPs, a fim de comprovar a presença do polímero, e sua alteração superficial. Existem alguns picos que são encontrados na análise que correspondem a presença do polímero, sendo o mais marcante deles a banda que fica aproximadamente em 1726 cm^{-1} , que é correspondente ao estiramento da carbonila (C=O) do grupo éster da PCL (HYUN, 2015), além de algumas outras bandas, que podem ser menos expressivas, correspondentes a ligações entre carbonos, hidrogênios e oxigênios. A Tabela 5.1 resume as bandas de absorção possíveis pela presença do polímero, com destaque em negrito para a banda correspondente a PCL (SIQUEIRA *et al.*, 2018).

Conforme a NP possuía uma concentração maior do polímero na sua composição, mais forte foi se tornando essa banda, evidenciando uma real diferença entre os tratamentos. Além dessa banda, outras bandas em locais próximos aos citados por SIQUEIRA *et al.*(2018) que seriam igualmente indícios da presença do polímero também foram encontradas nas amostras tratadas com o mesmo, e se mostraram ausentes na amostra de magnetita sem polímero (AM0), com os picos sendo mais aparentes nas formulações com maiores concentrações de PCL.

Tabela 5.1 Descrições das bandas de absorção possíveis pela presença do polímero PCL, com destaque em **negrito** para a principal banda correspondente a este.

Bandas (cm⁻¹)	Atribuições
2944 e 2863	Estiramento simétrico e assimétrico da ligação (CH ₂)
2300	Estiramento da ligação H-O
1726	Estiramento da carbonila (C=O)
1487 e 1364	Estiramento dos grupamentos (CH) no (CH ₂)
1268 e 1160 e 1294	Alongamento na fase cristalina das ligações C-O e C-C
1240	Estiramento assimétrico (C-O-C)
1170	Estiramento simétrico (C-O-C)
1156	Alongamento das ligações C-O e C-C da fase amorfa

A Figura 5.2 apresenta o FTIR realizado, bem como marcações das bandas citadas, evidenciando os picos correspondentes. Vale ressaltar que as marcações foram feitas um pouco antes de cada pico (a direita de cada um deles) para não dificultar sua visualização.

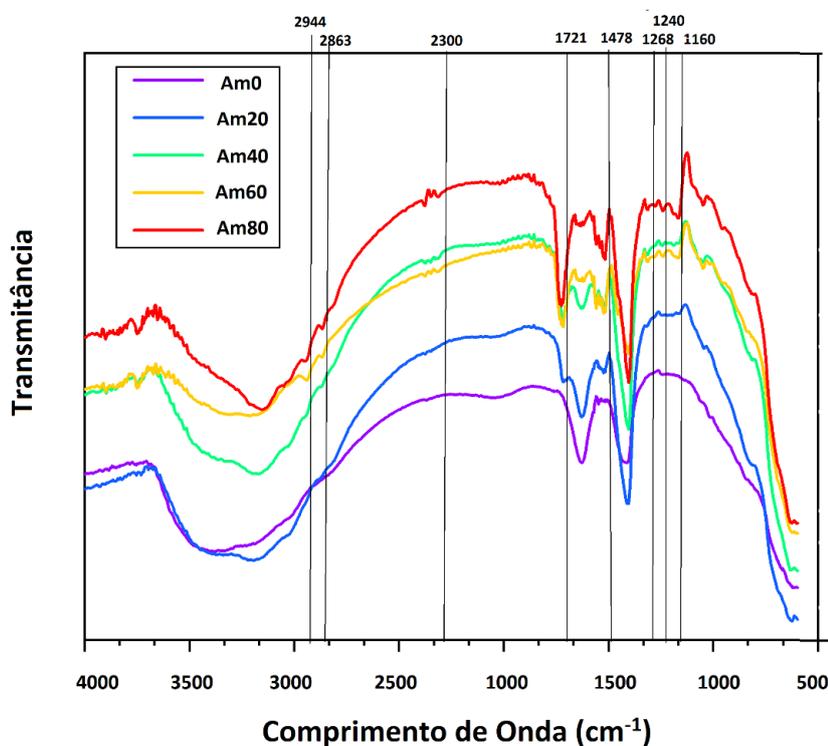


Figura 5.2 Espectro do FTIR das diferentes amostras preparadas, evidenciando a presença do polímero pelas marcações e bandas destacadas, indo da amostra sem polímero (AM0) até a de maior concentração do mesmo (AM80).

5.3. CARACTERIZAÇÃO MAGNÉTICA

Partículas superparamagnéticas exibem um comportamento magnético característico que é a falta de histerese na sua curva de magnetização, resultado de uma remanência nula na ausência de um campo externo. Essa característica permite que elas possam ser utilizadas em diversas aplicações biomédicas. Assim, é possível guiá-las para um determinado local de interesse, gerar calor servindo de fonte para tratamento de hipertermia ou liberação controlada de fármacos, ou ainda utilizadas para contraste em exames de ressonância magnética como o caso da magnetita recoberta com dextran (NARAYAN, 2009). Como o propósito do presente trabalho é a pesquisa de NPs com funcionalizações e recobrimentos que as permitam atuar como vetores biomédicos, é importante que características como sua magnetização sejam mantidas, e se possível, melhoradas.

Estudos mostram que ainda há um vasto campo de pesquisa sobre como melhorar as propriedades magnéticas das NPs, buscando otimizar sua magnetização para que uma menor quantidade possa ser utilizada em tratamentos, evitando a citotoxicidade, a bioincompatibilidade, e que aumentem seu tempo de permanência em meio fisiológico, sem serem reconhecidas e retiradas. Além disso, menores quantidades utilizadas também acarretariam menores custos na sua síntese, o que é também o objetivo de muitos trabalhos de pesquisa (KUMAR; MOHAMMAD, 2011).

Visto que pesquisas realizadas com recobrimentos e funcionalizações mais espessas com polímeros resultaram em uma diminuição da magnetização, e uma saturação em valores menores de campo magnético (HYUN, 2015; WANG *et al.*, 2018a), no presente trabalho foram utilizadas quantidades menores do polímero PCL, para que a funcionalização superficial se fizesse presente, como já mostrado pelo FTIR, mas ao mesmo tempo não diminuísse a magnetização do material, para que futuras aplicações como agente de hipertermia e liberação de fármacos por diferença de temperatura não fossem prejudicadas.

A Figura 5.3 apresenta o comportamento magnético das NPs com e sem polímero, tendo suas medidas de magnetização em função do campo magnético à temperatura ambiente. É notável que todas as curvas de histereses possuem remanências (M_r) e coercividade (H_c) desprezíveis, comprovando que as NPs possuem comportamento superparamagnético, viabilizando aplicações biomédicas (AMICI *et al.*, 2012).

Ao observar a Figura 5.3, também é possível notar um leve aumento na magnetização nas amostras que possuem o polímero. Esse resultado vai contra o encontrado em alguns estudos, onde o recobrimento polimérico resultou em uma diminuição da magnetização das partículas, sendo isso justificado pelo fato de que um maior recobrimento ocasionaria uma menor quantidade de partículas magnéticas por massa (HYUN, 2015; WANG *et al.*, 2018a). Contudo, nem sempre as moléculas do revestimento cobre toda a superfície das nanopartículas magnética a ponto de reduzir sua magnetização (PANTA, 2013). Algumas vezes, o tratamento pode acarretar em alterações superficiais que facilitem a ordenação dos momentos ou, ainda, podem preservar a fase magnetita, diminuindo sua oxidação a maghemita (MARTINS, 2019). Isso pode ter ocorrido nas amostras tratadas com o polímero PCL no presente trabalho, onde essas oxidaram menos, tendo uma maior concentração de magnetita. Como consequência, o magnetismo aumentou em relação às amostras sem PCL. Além disso, observa-se um decaimento na magnetização da amostra Am80 (A5_80 na Figura 5.3), o que poderia ser uma combinação dos estudos acima, onde ela ainda teria um grau maior de magnetita que a NP sem polímero. No entanto, a quantidade de polímero daria origem a uma menor relação entre a quantidade de NPM e de PCL no conjunto, diminuindo a magnetização em relação às demais amostras tratadas.

Uma vantagem, como já discutido, esse aumento ocorrido da magnetização poderia ser utilizado para diminuir a quantidade de NP necessária em tratamentos como hipertermia, tendo ainda a mesma produção de calor, com menores riscos. Alguns estudos já mostram que a utilização de estruturas do tipo *core-shell*, e alterações no tamanho podem otimizar a magnetização, potencializando-as a serem aplicadas em tratamentos por hipertermia (KUMAR; MOHAMMAD, 2011).

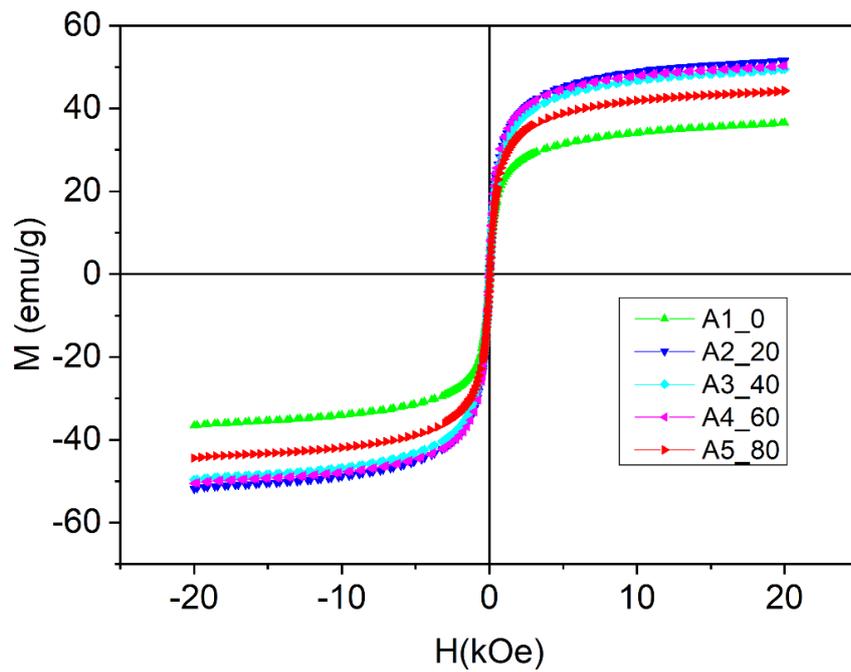


Figura 5.3 Magnetização em função do campo magnético aplicado, à temperatura ambiente, das NPs sintetizadas com e sem o polímero PCL.

5.4. MORFOLOGIA DAS NANOPARTÍCULAS

A Figura 5.4 apresenta imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão das NPs sintetizadas. A Figura 5.5 apresenta os gráficos com a distribuição do tamanho das partículas agora por tratamento aplicado (sem e com o polímero PCL).

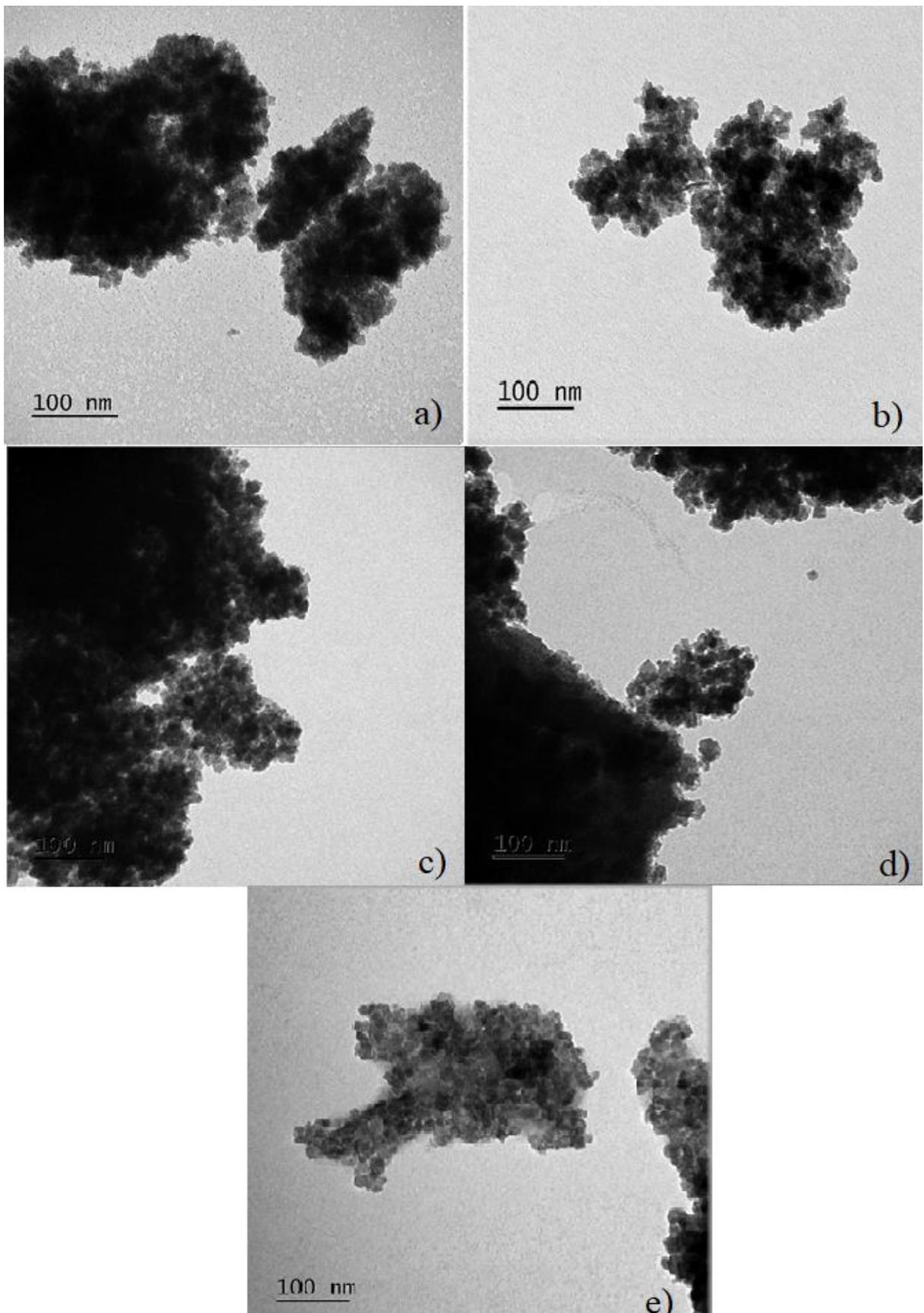


Figura 5.4 Imagens por MET das nanopartículas, e distribuição dos cristalitos; a) Am0; b) Am20; c) Am40; d) Am60; e) Am80.

Observando as imagens de MET da Figura 5.4, não é possível visualizar a camada de revestimento polimérico, fato também já relatado por alguns autores que utilizavam a PCL ou até mesmo outros polímeros e recobrimentos orgânicos, os quais também não visualizaram o recobrimento por meio de microscopia eletrônica de transmissão, e comprovaram a existência da modificação superficial por meio de FTIR, como realizado no presente trabalho (DUTTA *et al.*, 2018a; JIA *et al.*, 2012a; KARIMI *et al.*, 2017; YOU *et al.*, 2019).

Pelos gráficos da Figura 5.5, é possível observar uma certa regularidade entre as distribuições de tamanho dos cristalitos produzidos, com pequenas variações no tamanho médio (entre 9 e 11 nm). A morfologia, assim como o tamanho obtidos, são semelhantes aos de outros trabalhos (CHEN *et al.*, 2013; DUTTA *et al.*, 2018a; JIA *et al.*, 2012a; PANTA, 2013; YOU *et al.*, 2019).

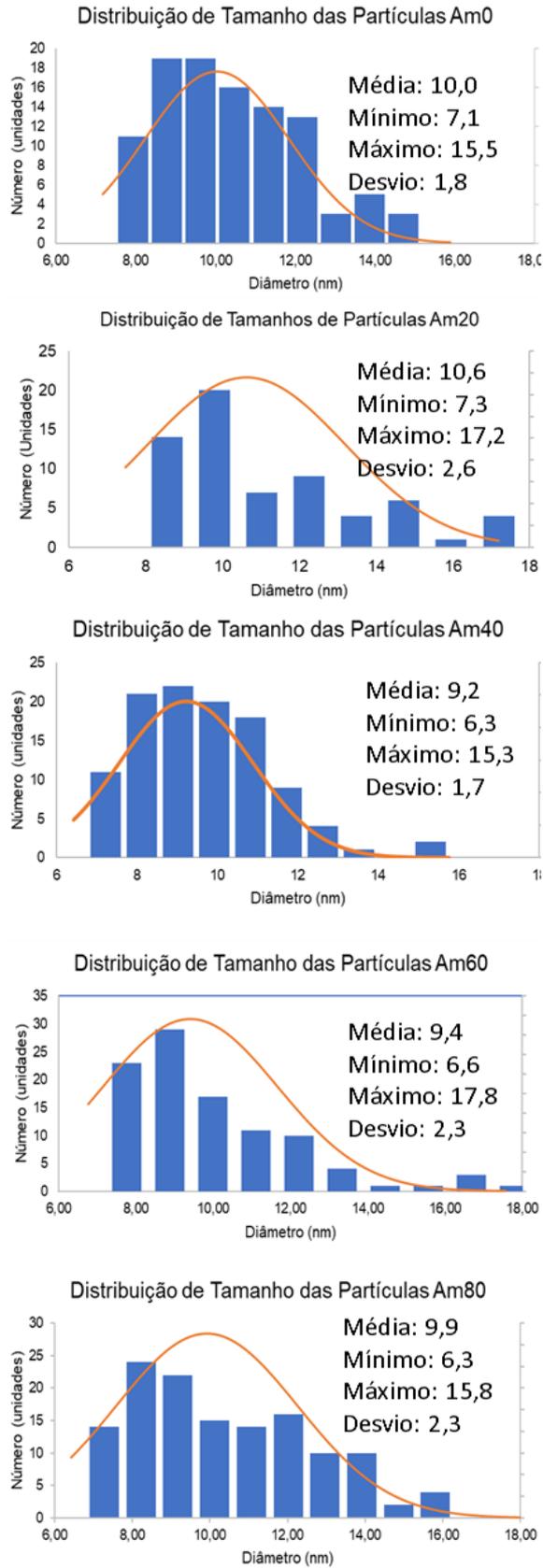


Figura 5.5 Distribuição do tamanho dos cristalitos obtidos pelo MET sem e com tratamento com o polímero PCL.

Foi utilizada também a microscopia eletrônica de varredura, a fim de se entender um pouco melhor a morfologia das NPs obtidas. A Figura 5.6 mostra imagens por MEV das NPs sem e com o polímero PCL. Pelas imagens, é possível notar que as NPs se aglomeram em blocos maiores, também visível no MET, o que já é esperado por conta da força de atração delas, em busca de um estado de menor energia livre, reduzindo o tamanho da sua interface com o meio. Contudo, é possível observar também que os aglomerados das NPs sem PCL possuem formatos mais definidos e retos, enquanto as que possuem polímero têm aglomerações mais amorfas, levemente arredondadas, e com um maior número de aglomerados menores. Provavelmente, isso pode ser resultante de uma suposta interação com o polímero, e a formação de uma matriz polimérica, onde as NPs estariam dispersas (PANTA, 2013; WANG *et al.*, 2018a, 2018b).

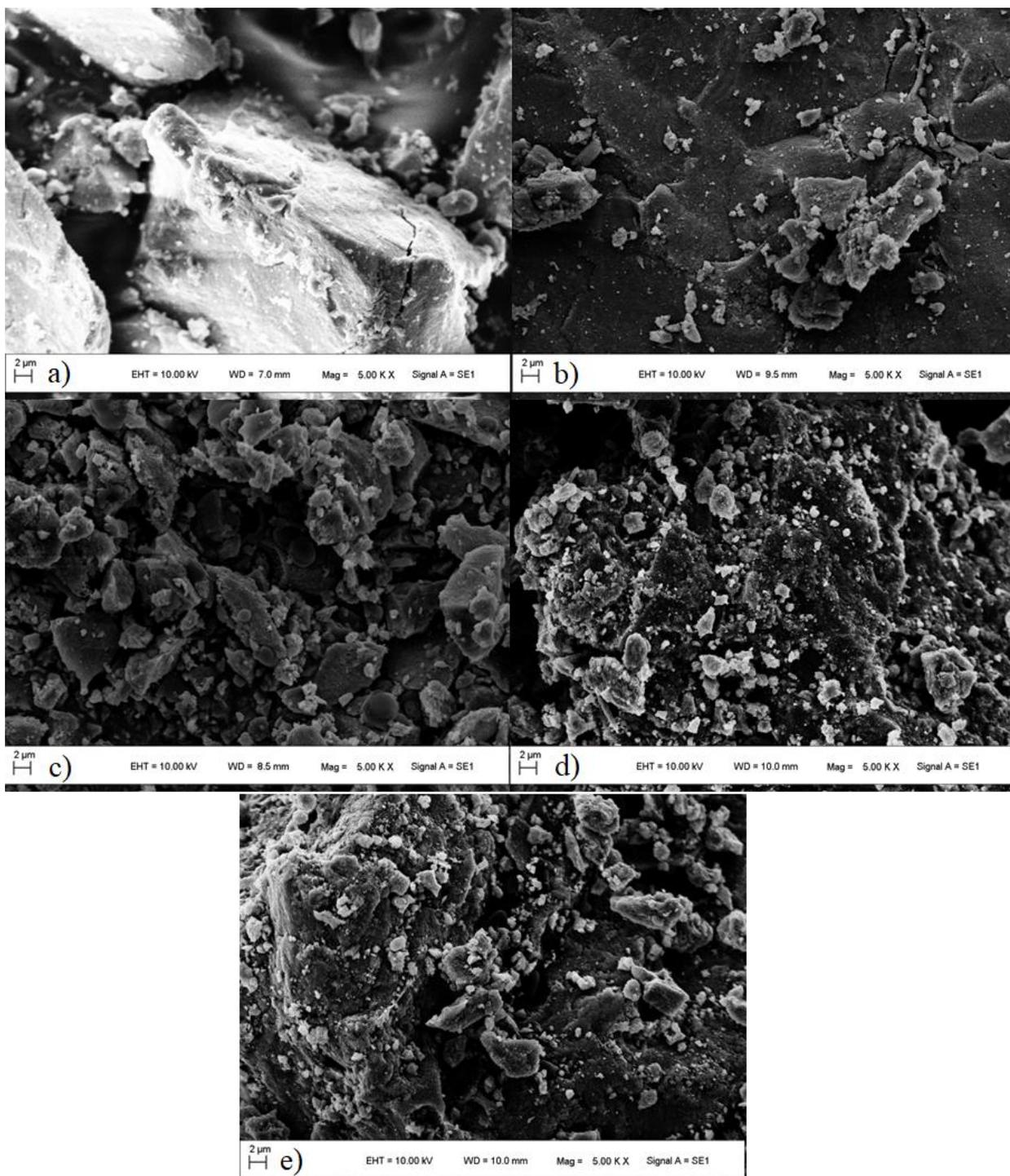


Figura 5.6 Imagens por MEV das nanopartículas; a) Am0; b) Am20; c) Am40; d) Am60; e) Am80.

Alguns trabalhos da literatura, em que a quantidade de polímero usada foi maior, foi possível a visualização de microesferas do polímero, com cerca de 500 nm, contendo as NPs no interior, mas que tiveram um certo comprometimento nos resultados das análises de DRX e VSM (HYUN, 2015; WANG *et al.*, 2018a), além de que, partículas com esse tamanho já começam a ficar muito próximas do tamanho

limite para passagem pelos poros das células tumorais (KUMAR; MOHAMMAD, 2011).

Alguns outros pesquisadores, na síntese e tratamento com polímeros de NPs, também utilizaram das duas técnicas de microscopia eletrônica para detecção visual, encontrando microesferas com o polímero pelo MEV, mas ao utilizar o MET, não foi possível observar o recobrimento (PANTA, 2013; WANG *et al.*, 2018b).

Pelo ensaio de DLS foi possível observar uma diminuição do tamanho hidrodinâmico com o aumento da quantidade de polímero (tabela 5.2), indicando que a modificação superficial realizada pela PCL aumentou a dispersão das nanopartículas em meio aquoso, diminuindo sua tendência à aglomerar (CHOWDHURY *et al.*, 2018). O tamanho encontrado por essa técnica é maior que o observada pela MET por conta da camada de hidratação que se forma ao redor das NPM quando em solução, além da maior aglomeração já que em condições fisiológicas as concentrações de sais e afins fazem com que as partículas se juntem mais ainda para diminuir o efeito do meio sob elas (DUTTA *et al.*, 2018b)

Tabela 5.2 Tamanho hidrodinâmico das nanopartículas analisado por DLS

Amostra	Tamanho Hidrodinâmico (nm)
Am0	466,50 ± 13,47
Am20	336,20 ± 31,48
Am40	290,18 ± 7,72
Am60	282,40 ± 10,33
Am80	267,78 ± 6,01

5.5. VIABILIDADE CELULAR

Para saber se o material produzido poderia ser utilizado para aplicações biomédicas, e se ter uma noção da dosagem que poderia ser utilizada, ensaios de viabilidade celular foram realizados. Esses testes servem para garantir que o material por si só, sem estar carreando nenhum princípio ativo, nem submetido a alteração do campo magnético para geração de calor, não seria citotóxico, já que seria um material

para aplicação sistêmica, que teria contato com basicamente todo o corpo antes de ser direcionado para o local de interesse.

Como já explicado, utilizou-se do MTT para avaliar a citotoxicidade, testando 5 concentrações diferentes de cada uma das NPs sintetizadas. Estudos realizados mostram que a magnetita é biocompatível, e em doses adequadas não acarreta em diferenças significativas para o crescimento celular (YOU *et al.*, 2019). Trabalhos que utilizaram a PCL também obtiveram resultados positivos para seu uso, comprovando sua biocompatibilidade (HYUN, 2015; WANG *et al.*, 2018a; ZHANG *et al.*, 2014). Os gráficos da Figura 5.7 mostram os resultados obtidos no presente trabalho, que, de modo geral, vão de encontro com a literatura previamente citada.

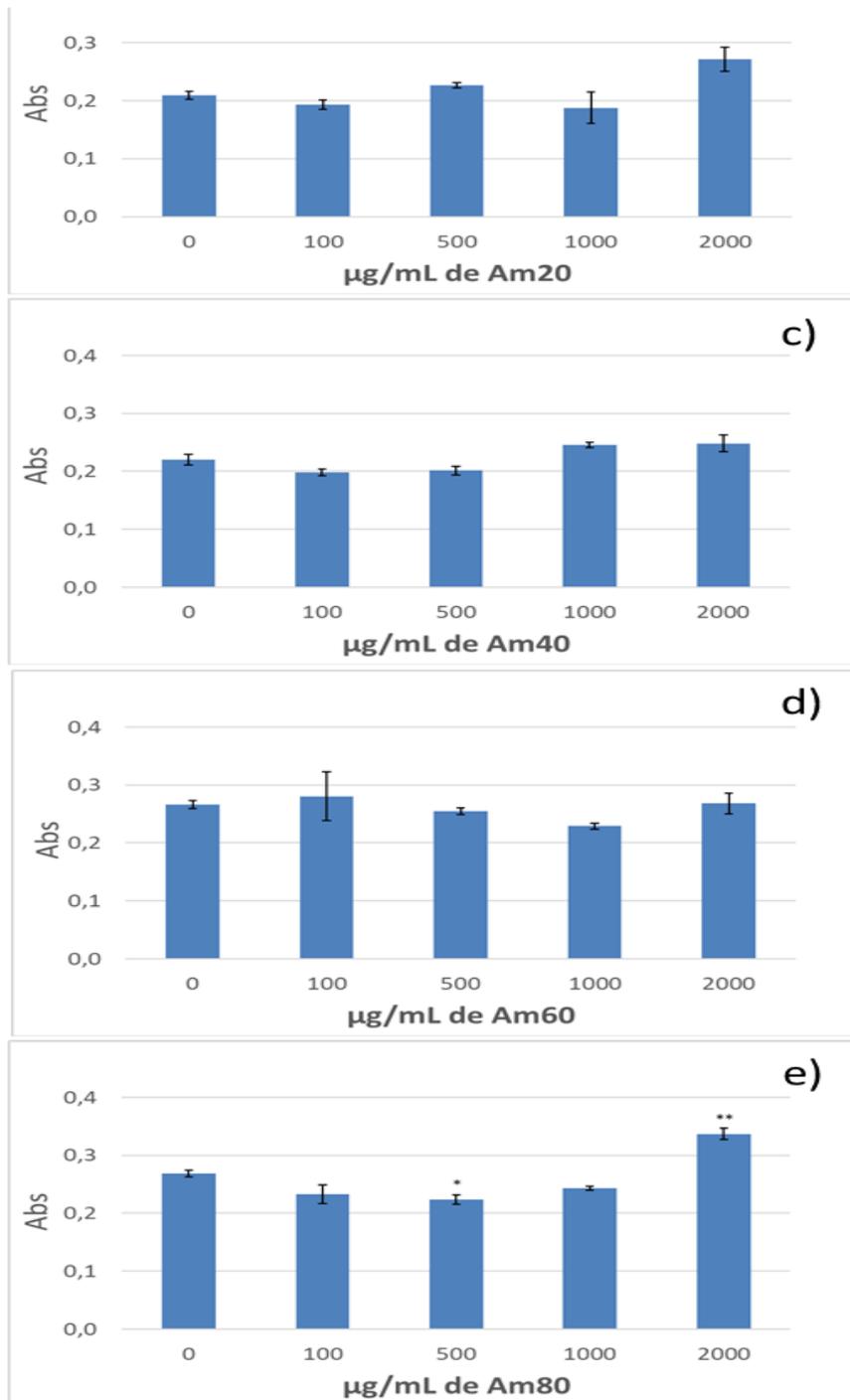


Figura 5.7 Resultados do ensaio de viabilidade celular de a) Am0; b) Am20; c) Am40; d) Am60; e) Am80, com estatística feita por teste de tukey com $p > 0,05$. O * mostrando as concentrações de 500 e 2000 µg/mL que tiveram diferença significativa entre elas.

Nos resultados da Am80 (Figura 5.7e) apresenta-se uma diferença significativa entre as concentrações de 500 e 2000 µg/mL, com a última apresentando uma aparente maior viabilidade celular, o que poderia estar relacionado com o fato de maiores dosagens das NPs interferirem na leitura do ensaio. A diferença pode ter sido

feita presente somente na Am80 pelo fato que quanto maior a concentração do polímero nas nanopartículas, maior seria a dispersão dessas no meio fisiológico, já que o recobrimento serviria para sua maior estabilização (DUTTA *et al.*, 2018a). Desta forma, as NPM estariam mais disponíveis e em maior contato com as células.

Para confirmar a viabilidade celular, e observar a morfologia das mesmas, foi realizado o ensaio de microscopia de fluorescência com a marcação de células vivas e mortas. Pelas imagens é possível notar que existem células viáveis em todos os tratamentos (verde), não existindo muitas mortas (em vermelho), nem uma diferença muito grande quando comparadas com as imagens-controle, o que vai ao encontro do observado pelo MTT e o relatado em bibliografias (DUTTA *et al.*, 2018a; HYUN, 2015; WANG *et al.*, 2018a; YOU *et al.*, 2019). As imagens dos poços controles se encontram isoladas na Figura 5.8.

É possível notar que em todas as NPs as imagens correspondentes à maior concentração de NPs (Figuras 5.9j, 5.10j, 5.11j, 5.12j e 5.13j) têm uma visível menor densidade de células do que o controle, apesar de ainda não ter uma depleção negativa significativa presente no MTT. Na imagem da Am80 de concentração mais alta, é possível notar a presença de mais células mortas (pontos vermelhos da Figura 5.13j), o que confirma que a diferença positiva observada pelo ensaio do MTT pode ser devido à alta concentração das NPs, que poderiam também estar levando ao início de uma citotoxicidade nas células por conta da sua presença exacerbada. Isto sugere uma tendência à toxicidade a partir de um certo limiar de concentração das NPs utilizadas, podendo ser um bom indicativo para dosagens terapêuticas.

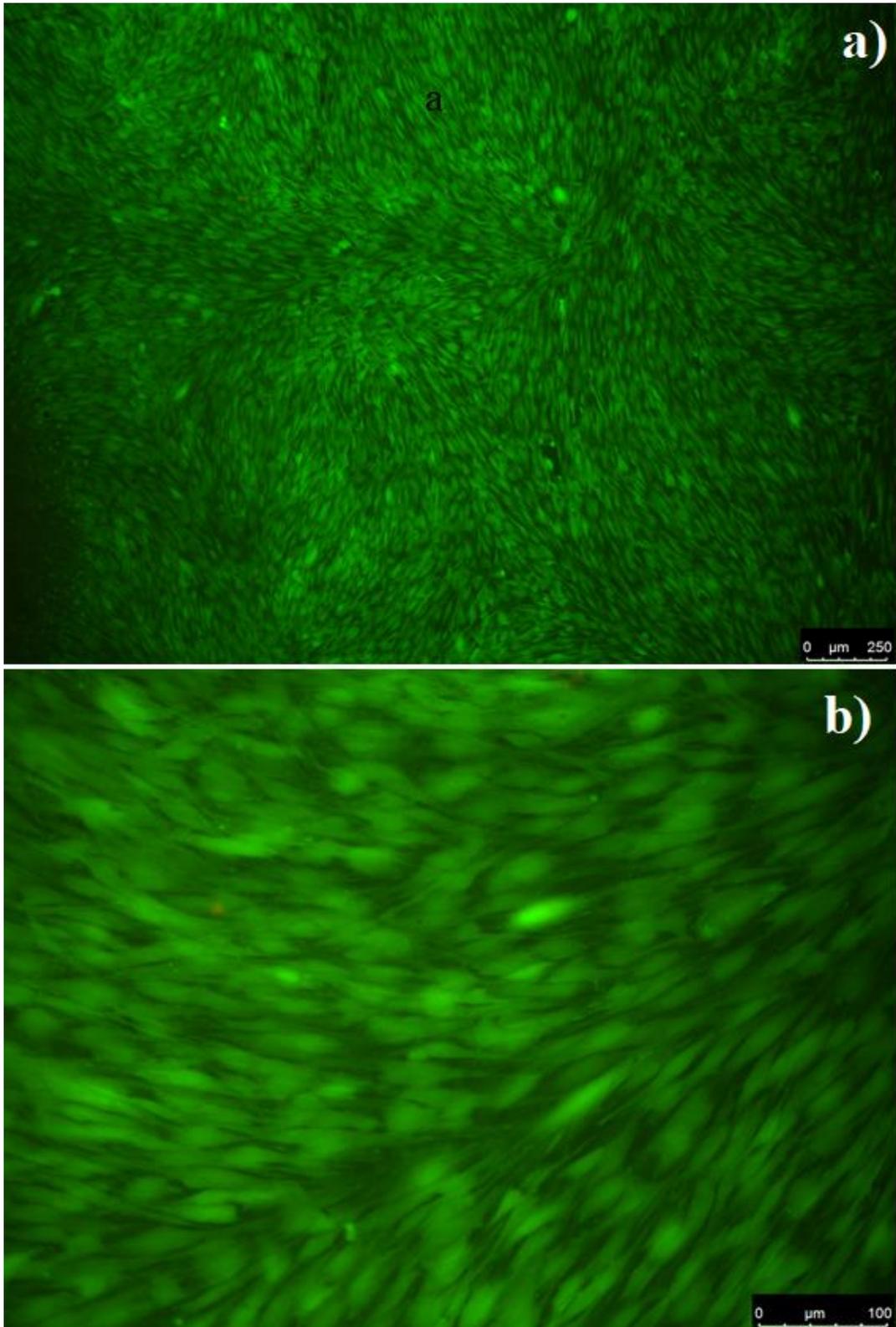


Figura 5.8 Imagens de microscopia de fluorescência com a marcação de células vivas e mortas dos poços controle, sem a presença de NPs. a) aumento com de 5x; b) aumento de 20x.

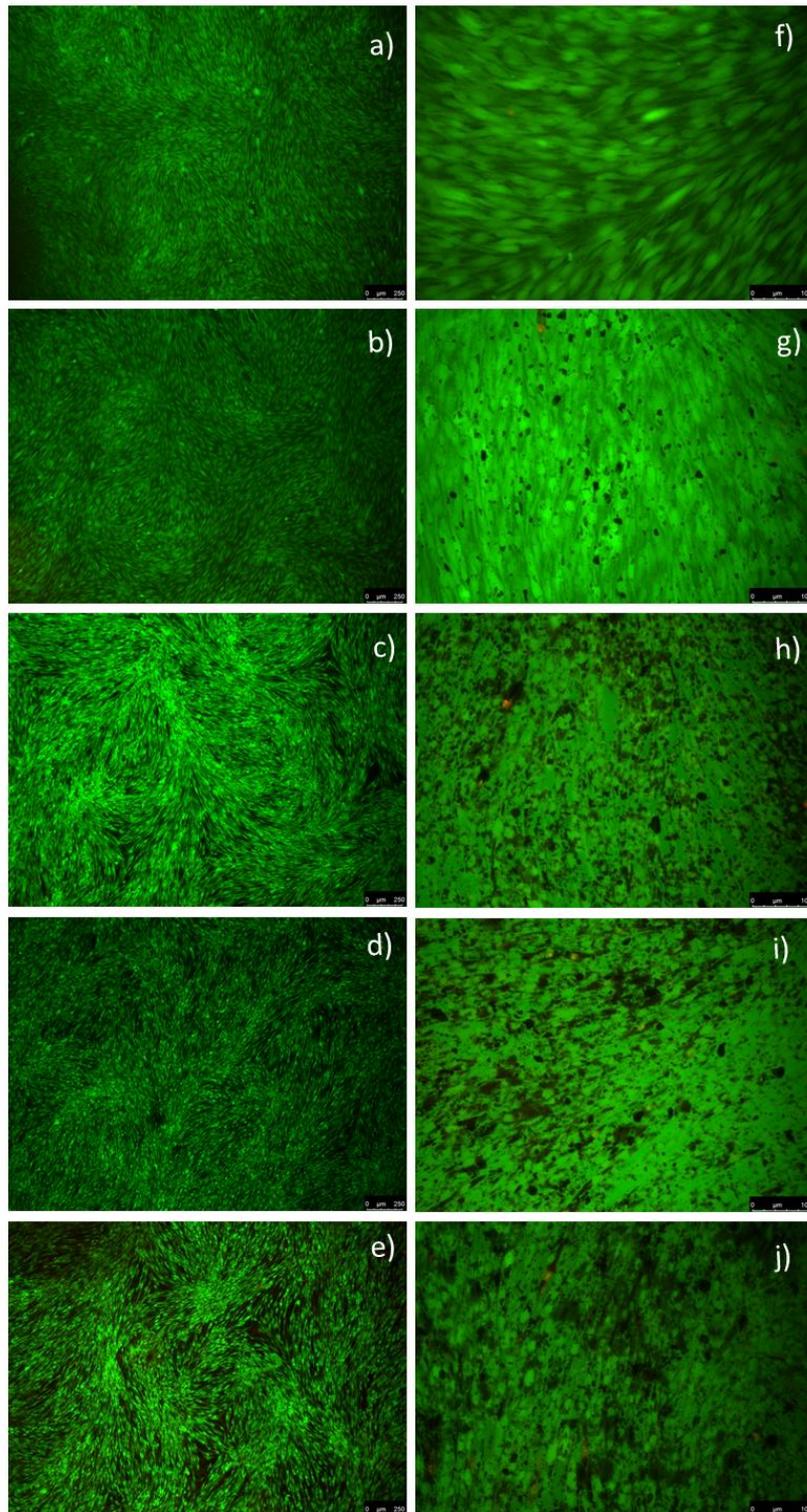


Figura 1.9 Imagens de microscopia de fluorescência com a marcação de células vivas e mortas NPS Am0. a) controle; b) Am0 100 µg/mL; c) Am0 500 µg/mL; d) Am0 1000 µg/mL; e) Am0 2000 µg/mL; aumento de 5x; e f) controle; g) Am0 100 µg/mL; h) Am0 500 µg/mL; i) Am0 1000 µg/mL; j) Am0 2000 µg/mL 20x de aumento.

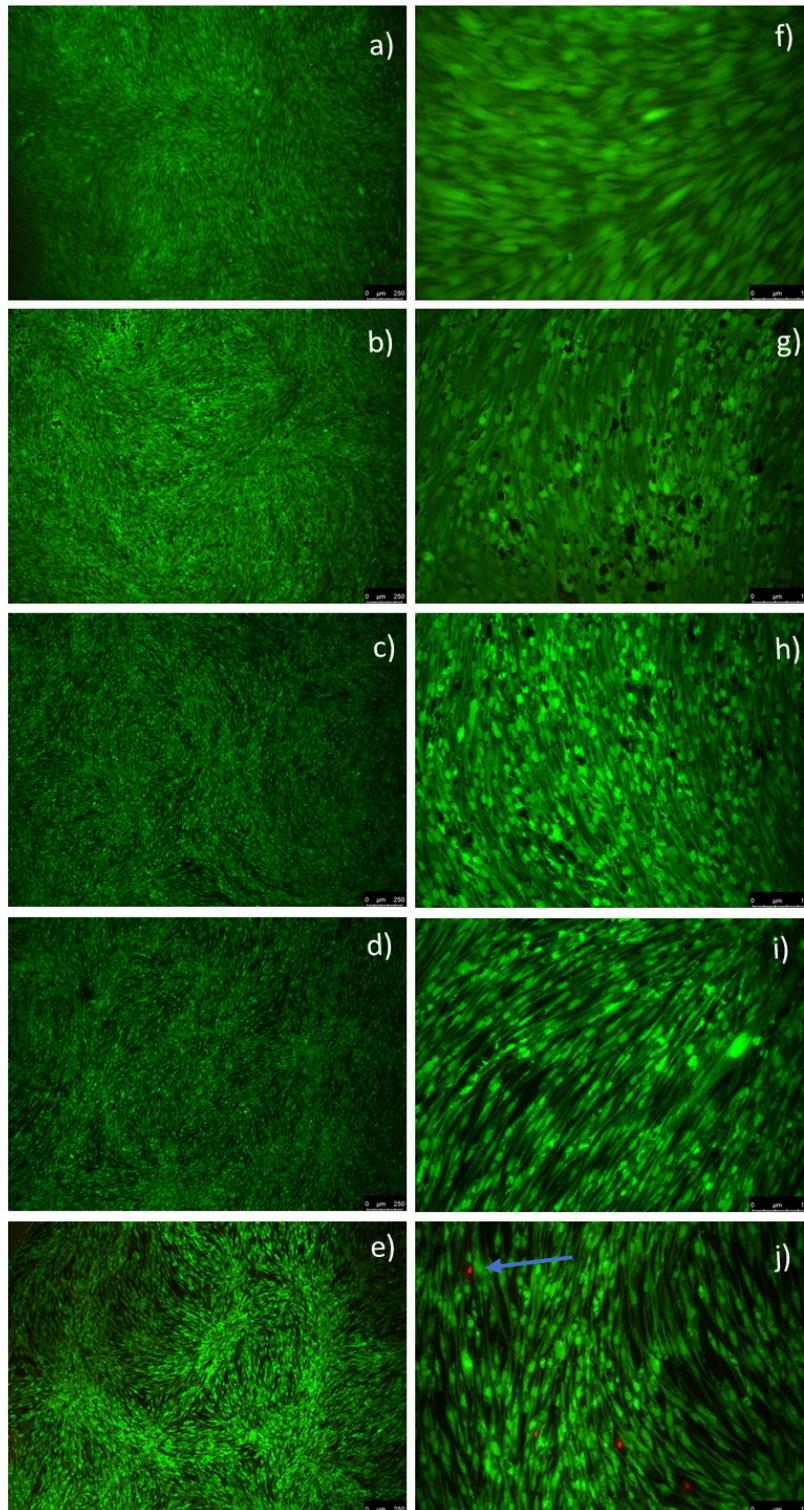


Figura 5.10 Imagens de microscopia de fluorescência com a marcação de células vivas (todas as que estão em verde) e mortas (pontos vermelhos, como o indicado pela seta azul na imagem J) das NPS Am20. a) controle; b) Am20 100 $\mu\text{g/mL}$; c) Am20 500 $\mu\text{g/mL}$; d) Am20 1000 $\mu\text{g/mL}$; e) Am20 2000 $\mu\text{g/mL}$; aumento de 5x; e f) controle; g) Am20 100 $\mu\text{g/mL}$; h) Am20 500 $\mu\text{g/mL}$; i) Am20 1000 $\mu\text{g/mL}$; j) Am20 2000 $\mu\text{g/mL}$ 20x de aumento.

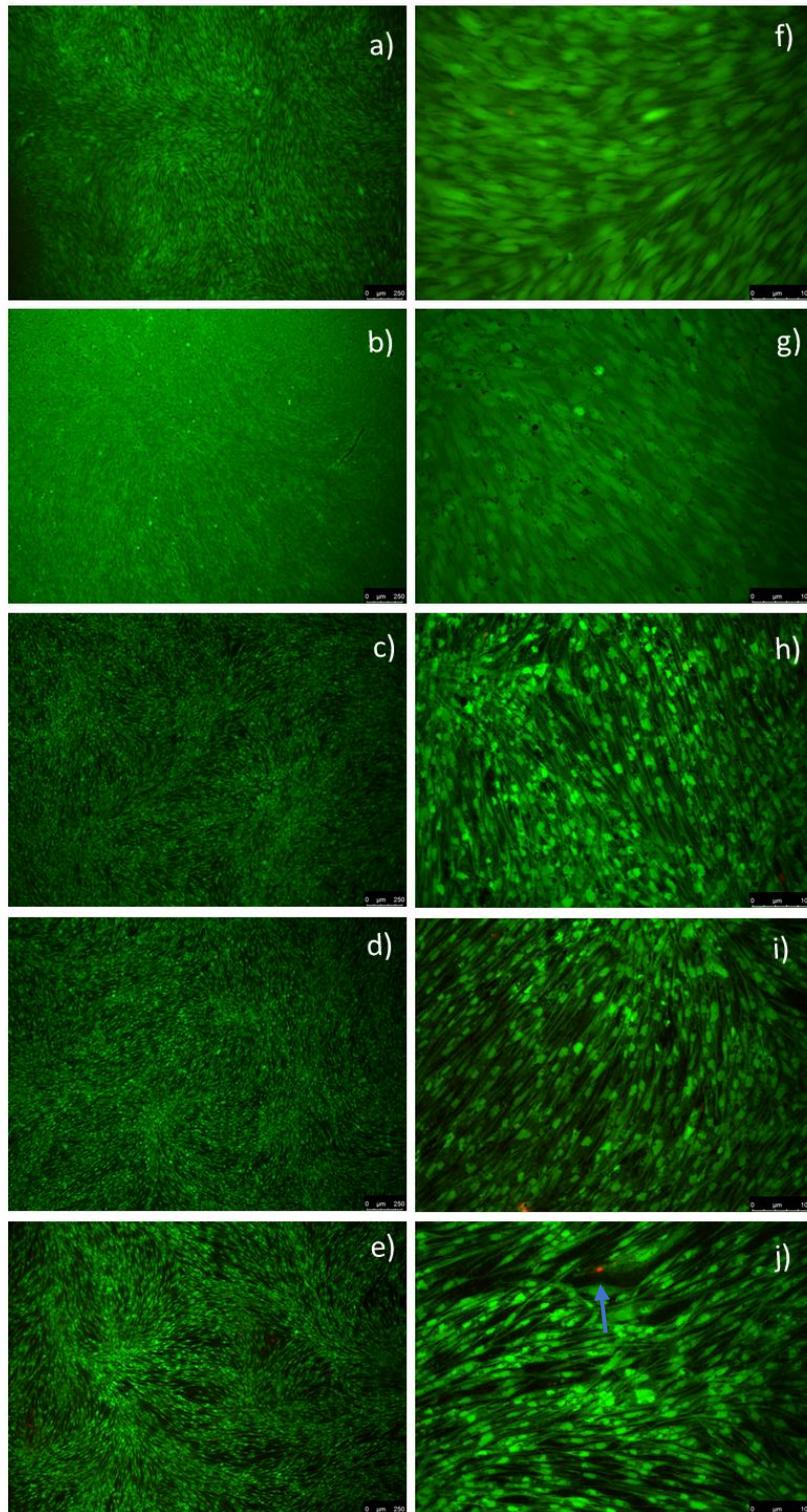


Figura 5.11 Imagens de microscopia de fluorescência com a marcação de células vivas (todas as que estão em verde) e mortas (pontos vermelhos, como o indicado pela seta azul na imagem J) das NPs Am40. a) controle; b) Am40 100 µg/mL; c) Am40 500 µg/mL; d) Am40 1000 µg/mL; e) Am40 2000 µg/mL; aumento de 5x; e f) controle; g) Am40 100 µg/mL; h) Am40 500 µg/mL; i) Am40 1000 µg/mL; j) Am40 2000 µg/mL 20x de aumento.

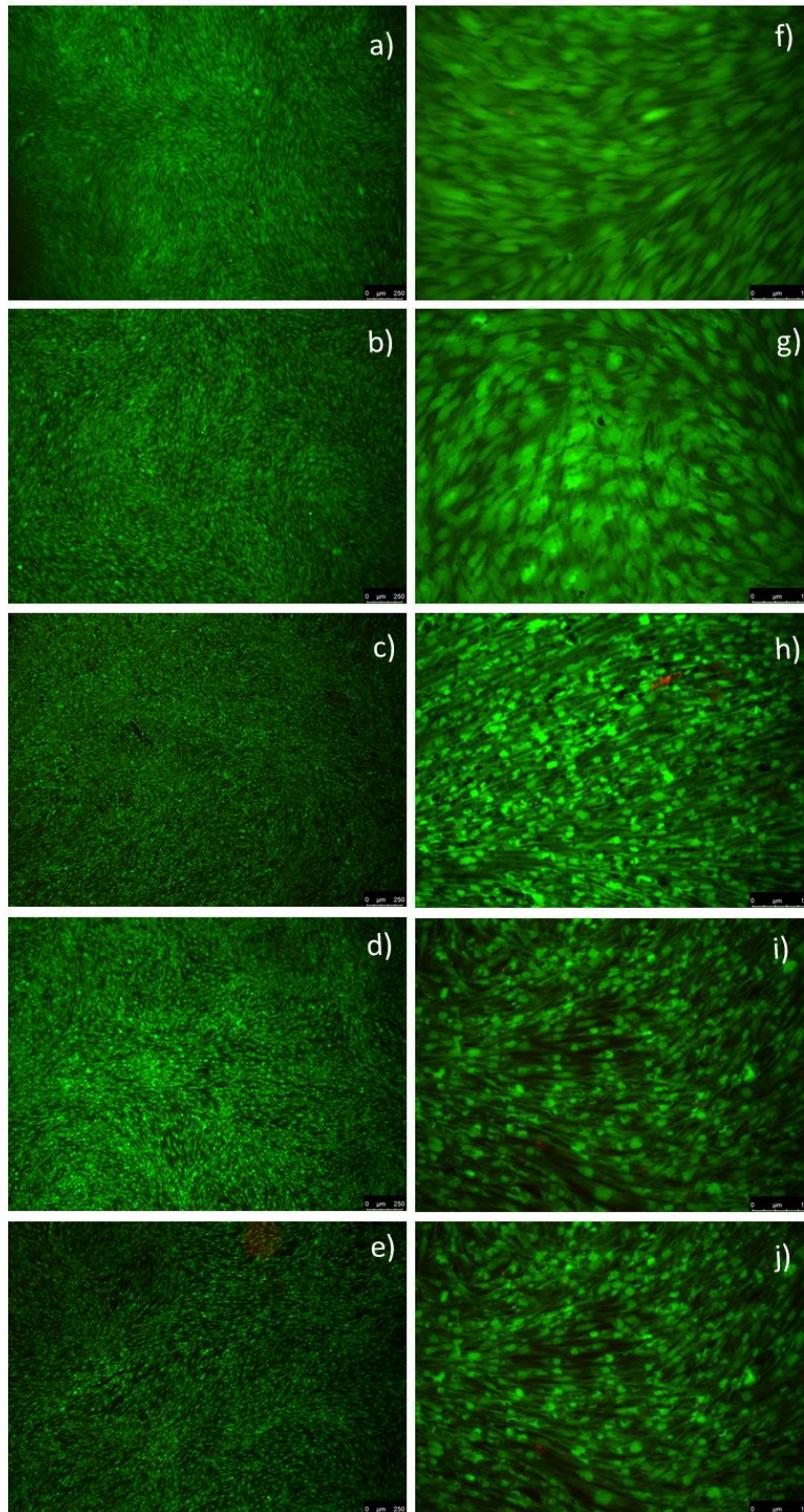


Figura 5.12 Imagens de microscopia de fluorescência com a marcação de células vivas (todas em verde) e mortas (pontos vermelhos) das NPS Am60. a) controle; b) Am60 100 µg/mL; c) Am60 500 µg/mL; d) Am60 1000 µg/mL; e) Am60 2000 µg/mL; aumento de 5x; e f) controle; g) Am60 100 µg/mL; h) Am60 500 µg/mL; i) Am60 1000 µg/mL; j) Am60 2000 µg/mL 20x de aumento.

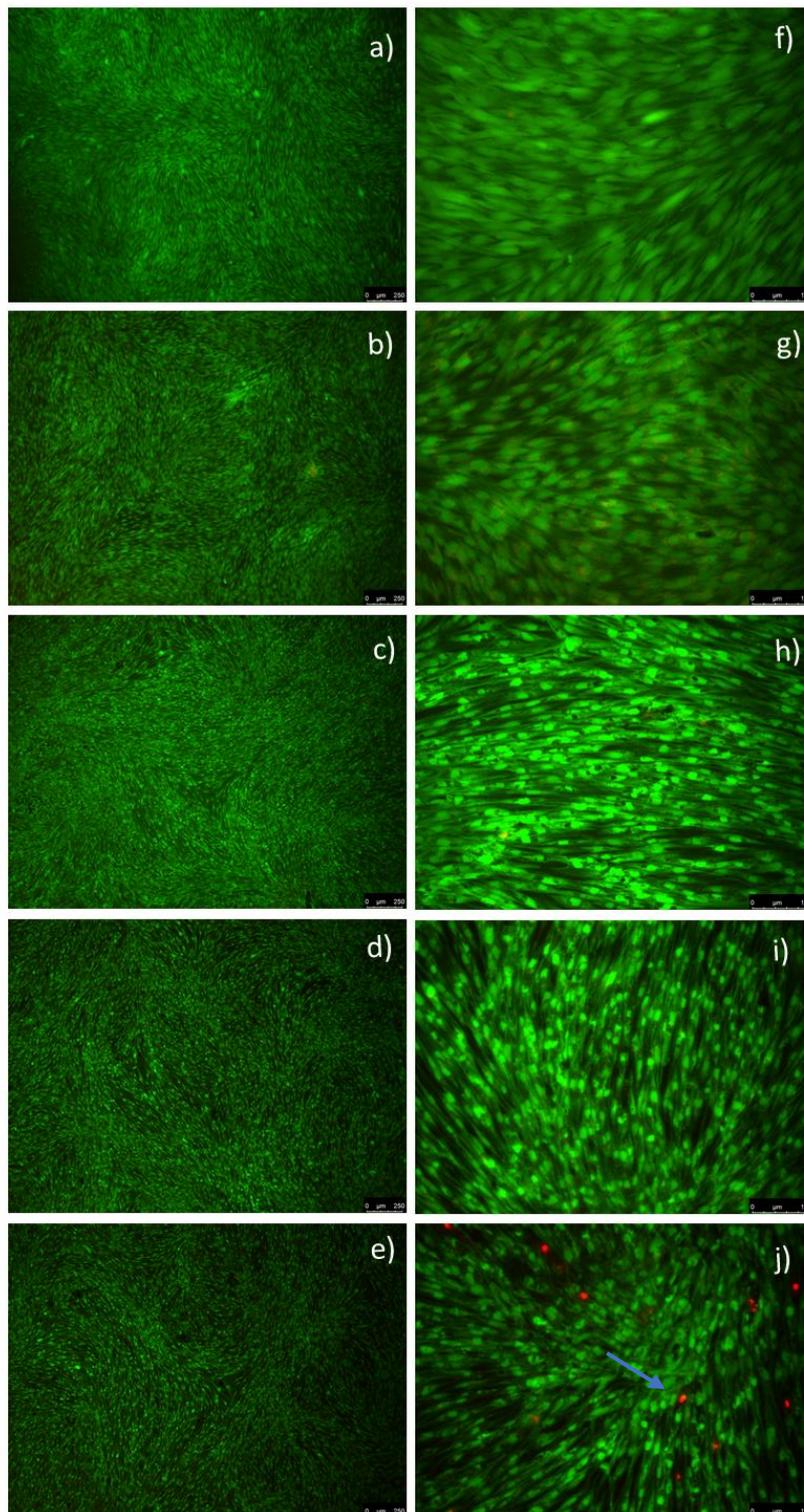


Figura 5.13 Imagens de microscopia de fluorescência com a marcação de células vivas (todas em verde) e mortas (pontos vermelhos, como o representado pela seta na imagem J) NPS PCL80. a) controle; b) Am80 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; c) Am80 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; d) Am80 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; e) Am80 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; aumento de 5x; e f) controle g) Am80 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; h) Am80 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$; i) Am80 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; j) Am80 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 20x de aumento.

PRINCIPAIS ACHADOS, QUAL O INDICADO

Assim com esses resultados é possível notar que por

6. CONCLUSÕES

Após a realização do trabalho experimental, é possível inferir as seguintes conclusões:

- A metodologia aplicada consegue produzir nanopartículas de óxido de ferro de tamanho satisfatório para aplicação nos tratamentos de câncer como DDS e hipertermia e com comportamento superparamagnético;

- Foi possível confirmar que as nanopartículas eram majoritariamente magnetitas, como o desejado, por meio do DRX;

- Por meio de ensaios microscópicos, foi possível notar que as partículas apresentavam homogeneidade morfológica, com pouca diferença nos tamanhos médios, e com certa tendência a formar aglomerados;

- Foi possível incorporar o polímero PCL nas nanopartículas pelo presente método, e foi possível constatar por FTIR sua presença nas NPs tratadas;

- O DSL mostrou que a presença do polímero na superfície diminuiu o tamanho hidrodinâmico das partículas, mostrando uma maior estabilidade coloidal dessas, o que favorece seu uso em aplicações biomédicas.

- O VSM comprovou o comportamento superparamagnético, indicando que as nanopartículas poderiam ser utilizadas como tratamento de hipertermia, bem como seria possível um direcionamento das mesmas com a utilização de um gradiente de campo magnético, para utilização de hipertermia localizada e liberação controlada de fármacos;

- Pelo VSM foi possível constatar que a presença do polímero não alterou as propriedades magnéticas das nanopartículas, como o ocorrido com revestimentos mais espessos, permitindo assim uma possível utilização otimizada delas para tratamento de hipertermia e liberação controlada de fármacos;

- Os ensaios de viabilidade celular mostraram que as nanopartículas não eram citotóxicas por si só na maioria das concentrações, confirmando sua possível utilização sistêmica no corpo sem causar danos aos tecidos e células sadias à medida que é encaminhado para o lugar de interesse;

- Por meio da microscopia de fluorescência foi possível notar que na dosagem mais alta, principalmente para a NP com maior quantidade de polímero, ocorre o início de certa citotoxicidade, podendo perceber um limite da concentração que poderia ser utilizada como veículo de tratamento;

- Foi possível concluir que as NPs produzidas por esse método apresentam propriedades magnéticas e biocompatíveis que às conferem um potencial de aplicação biomédica para tratamento do câncer como DDS e hipertermia, podendo utilizar o polímero como ancora para princípios ativos, e as NPs como veículos para produzir a hipertermia. Acrescenta-se a isso que o método é de baixo custo, tanto pela matéria-prima empregada quanto pela simplicidade de sua rota processual.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho teve um maior enfoque na produção, modificação superficial das nanopartículas de magnetita, e assim uma observação nas alterações que suas propriedades de interesse poderiam sofrer, para confirmar sua possível aplicação como veículos para tratamento de câncer, de modo a ser uma metodologia barata, de fácil reprodução e passível a um escalonamento.

Confirmada a manutenção das propriedades de interesse, como o magnetismo e a biocompatibilidade, os próximos passos seriam a incorporação de princípios ativos, que são utilizados no tratamento de câncer, a fim de conseguir um tratamento mais direcionado, com uma menor quantidade do fármaco sendo necessária, evitando assim maiores efeitos colaterais e maior eficiência. Necessitando a realização de estudos dessa incorporação, bem como do tempo e perfil de liberação, para que dosagens adequadas fossem estabelecidas.

Outra diretriz a ser tomada seriam testes *in vitro* da hipertermia das NPs, para verificar sua eficácia no tratamento do câncer por essa vertente, e assim acoplando mais de um tratamento no mesmo vetor, que já seria um vetor biocompatível, e assim otimizaria o tratamento.

Poderia também ser estudada a possibilidade de concentrações maiores de polímeros, ou ainda a incorporação de um outro polímero em conjunto, para que conseguisse uma maior abrangência de fármacos que poderiam ser utilizados, e as concentrações que seria possível inserir do mesmo, contemplando uma maior bioestabilidade.

Testes posteriores *in vitro* também poderiam ser feitos, uma vez definida as questões anteriores, para comprovar o direcionamento das NPs por meio de um gradiente de campo, e liberação de princípios ativos nos locais de interesse, bem como avaliar os efeitos colaterais obtidos por metodologias mais direcionadas dos fármacos utilizados para o tratamento de cânceres, e a eficácia da hipertermia em conjunto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMICI, J. et al. Polymer grafting onto magnetite nanoparticles by “click” reaction. **Journal of Materials Science**, v. 47, n. 1, p. 412–419, 30 jan. 2012.

AZIZ, A. et al. Chitosan Oligomers and Copper Sulfate Induce Grapevine Defense Reactions and Resistance to Gray Mold and Downy Mildew. 2006.

BECKHAM, J. T. et al. Microarray analysis of cellular thermotolerance. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, n. 10, p. 752–765, 2010.

BERTRAND, N.; LEROUX, J. C. The journey of a drug-carrier in the body: An anatomo-physiological perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 152–163, 2012.

BLIEM, R. et al. Subsurface cation vacancy stabilization of the magnetite (001) surface. **Science**, v. 346, n. 6214, 2014.

BOTTEZINI, P. A. **Efeito da remoção seletiva de tecido cariado nas características imunofenotípicas apresentadas por células-tronco mesenquimais da polpa de dentes decíduos humanos.** [s.l: s.n.].

CHAUGHULE, R. S.; PURUSHOTHAM, S.; RAMANUJAN, K. V. Magnetic nanoparticles as contrast agents for magnetic resonance imaging. **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section A - Physical Sciences**, v. 82, n. 3, p. 245–249, 2012a.

CHAUGHULE, R. S.; PURUSHOTHAM, S.; RAMANUJAN, K. V. Magnetic nanoparticles as contrast agents for magnetic resonance imaging. **Proceedings of the National Academy of Sciences India Section A - Physical Sciences**, v. 82, n. 3, p. 245–249, 23 set. 2012b.

CHEN, C. et al. Design and construction of polymerized-glucose coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for delivery of aspirin. **Powder Technology**, 2013.

CHOWDHURY, A. D. et al. Multifunctional GQDs-Concanavalin A@Fe₃O₄ nanocomposites for cancer cells detection and targeted drug delivery. **Analytica Chimica Acta**, v. 1027, p. 109–120, 16 out. 2018.

CORREIA, D. M. et al. Processing and size range separation of pristine and

magnetic poly(l-lactic acid) based microspheres for biomedical applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 476, p. 79–86, 15 ago. 2016.

DUTTA, B. et al. pH sensitive surfactant-stabilized Fe₃O₄ magnetic nanocarriers for dual drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 162, p. 163–171, 1 fev. 2018a.

DUTTA, B. et al. PEG mediated shape-selective synthesis of cubic Fe₃O₄ nanoparticles for cancer therapeutics. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 737, p. 347–355, 15 mar. 2018b.

FARAJI, M.; YAMINI, Y.; REZAEI, M. Iranian Chemical Society Magnetic Nanoparticles : Synthesis , Stabilization , Functionalization , Characterization , and Applications. **J. Iran. Chem. Soc.**, v. 7, n. 1, p. 1–37, 2010.

GANTA, S. et al. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 126, n. 3, p. 187–204, 2008.

GHANBARI, M.; SHAMSPUR, T.; FATHIRAD, F. In Situ Preparation of Magnetic Fe₃O₄ Nanoparticles in Presence of PLGA and PVA as Magnetite Nanocarrier for Targeted Drug Delivery. **Journal of Pharmaceutics & Drug Delivery Research**, 2017a.

GHANBARI, M.; SHAMSPUR, T.; FATHIRAD, F. In Situ Preparation of Magnetic Fe₃O₄ Nanoparticles in Presence of PLGA and PVA as Magnetite Nanocarrier for Targeted Drug Delivery. **Journal of Pharmaceutics & Drug Delivery Research**, v. 06, n. 02, 6 set. 2017b.

GOLDSTEIN, L. S. et al. **Summary, conclusions and recommendations: Adverse temperature levels in the human body**. International Journal of Hyperthermia. **Anais...**Taylor & Francis, maio 2003

GOU, M. et al. Curcumin-loaded biodegradable polymeric micelles for colon cancer therapy in vitro and in vivo. **Nanoscale**, v. 3, n. 4, p. 1558–1567, abr. 2011.

GRADMANN, C. Magic bullets and moving targets: Antibiotic resistance and experimental chemotherapy, 1900-1940. **Dynamis**, v. 31, n. 2, p. 305–321, 2011.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide

nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995–4021, jun. 2005.

HARRISON, B. S. Magnetically stimulated ciprofloxacin release from polymeric microspheres entrapping iron oxide nanoparticles. p. 4447–4458, 2015.

HENEWEER, C.; GENDY, S. E. M.; PEÑATE-MEDINA, O. Liposomes and inorganic nanoparticles for drug delivery and cancer imaging. **Therapeutic delivery**, v. 3, n. 5, p. 645–56, maio 2012.

HILDEBRANDT, B. et al. **The cellular and molecular basis of hyperthermia** *Critical Reviews in Oncology/Hematology* Elsevier, , 1 jul. 2002.

Hyperthermia in Cancer Treatment - National Cancer Institute. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/surgery/hyperthermia-fact-sheet>>. Acesso em: 27 mar. 2020.

HYUN, D. C. Magnetically-controlled, pulsatile drug release from poly(ϵ -caprolactone) (PCL) particles with hollow interiors. **Polymer**, 2015.

INCA. **Estatísticas de câncer | INCA - Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 21 maio. 2019.

INCA, I. N. DE C. **Estimativa Incidência de Câncer no Brasil 2020**. Rio de Janeiro: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: 29 abr. 2020.

ISO/TS 80004-2:2015. **Nanotechnologies -- Vocabulary -- Part 2: Nano-objects** Organisation Internationale de Normalisation (ISO), , 2015. Disponível em: <<https://www.iso.org/standard/54440.html>>. Acesso em: 25 maio. 2019

JAIN, K. K. (KEWAL K. . **The handbook of nanomedicine**. [s.l.] Humana Press, 2010.

JIA, Y. et al. Co-encapsulation of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles and doxorubicin into biodegradable PLGA nanocarriers for intratumoral drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, 2012a.

JIA, Y. et al. Co-encapsulation of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles and doxorubicin

into biodegradable PLGA nanocarriers for intratumoral drug delivery. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 1697–1708, 2012b.

KAMARAJ, S. et al. Curcumin drug delivery by vanillin-chitosan coated with calcium ferrite hybrid nanoparticles as carrier. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 116, p. 48–60, 30 abr. 2018.

KARIMI, Z. et al. Pegylated and amphiphilic Chitosan coated manganese ferrite nanoparticles for pH-sensitive delivery of methotrexate: Synthesis and characterization. **Materials Science and Engineering C**, 2017.

KNOBEL, M. Partículas Finas : Superparamagnetismo e Magnetoresistência Gigante I Introdução. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, n. 3, p. 387–395, 2000.

KRUKIEWICZ, K.; ZAK, J. K. **Biomaterial-based regional chemotherapy: Local anticancer drug delivery to enhance chemotherapy and minimize its side-effects** **Materials Science and Engineering C** Elsevier Ltd, , 1 maio 2016.

KUCHIBHATLA, S. V.; KARAKOTI, A. S.; SEAL, S. Colloidal stability by surface modification. **JOM**, v. 57, n. 12, p. 52–56, dez. 2005.

KUMAR, C. S. S. R.; MOHAMMAD, F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 9, p. 789–808, 2011.

LAURENT, S. et al. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 6, p. 2064–2110, jun. 2008.

LIU, G. et al. Core-interlayer-shell Fe₃O₄@mSiO₂@lipid-PEG-methotrexate nanoparticle for multimodal imaging and multistage targeted chemo-photodynamic therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 521, n. 1–2, p. 19–32, 15 abr. 2017.

LIU, W. et al. PLGA Hollow Microbubbles Loaded with Iron Oxide Nanoparticles and Doxorubicin for Dual-mode US/MR Imaging and Drug Delivery. **Current Nanoscience**, v. 10, n. 4, p. 543–552, 10 jun. 2014.

MARTINS, A. F. N. **OSCILAÇÃO DA MAGNETIZAÇÃO MAGNETITA/MAGHEMITA**

REVESTIDA COM POLIANILINA. Recife: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, 9 mar. 2019.

MARTINS, M. G. **ENCAPSULAMENTO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EM POLÍMEROS ACRÍLICOS E AVALIAÇÃO DE HIPERTERMIA PARA POTENCIAL TRATAMENTO DE CÂNCER.** [s.l.] Unifersidade federal do Rio de Janeiro, 2017.

MCKNIGHT, J. A. Principles of Chemotherapy Board Review.pdf. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 2, p. 67–72, 2003.

MELLO, P. O. et al. **Estudo da influência das variáveis no Recobrimento de nanopartículas magnéticas de Ferrita com Quitosana** Botucatu Universidade Estadual Paulista, , 2014.

MOSAFER, J. et al. Preparation and characterization of uniform-sized PLGA nanospheres encapsulated with oleic acid-coated magnetic-Fe₃O₄ nanoparticles for simultaneous diagnostic and therapeutic applications. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 2017.

NARAYAN, R. **Biomedical materials.** [s.l.] Springer US, 2009.

NEL, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. **Nature Publishing Group**, v. 8, n. 7, p. 543–557, 2009.

NEUBERGER, T. et al. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, n. 1, p. 483–496, 2005.

OLSON, J. S. **The history of cancer : an annotated bibliography.** [s.l.] Greenwood Press, 1989.

OMS. **Cancer.** Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1>. Acesso em: 28 abr. 2020.

OPAS. **Folha informativa - Câncer.** Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214109X16301437>>. Acesso em: 21 maio. 2019.

PANKHURST, Q. A. et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics To cite this article**, v. 36, p. 167–181,

2003.

PANTA, P. C. **Obtenção de nanopartículas de óxido de ferro por coprecipitação, sua estabilização com surfactantes e caracterização quanto à morfologia, cristalinidade e comportamento magnético.** [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

PARK, K. Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. **Journal of Controlled Release**, v. 190, p. 3–8, 2014.

PEER, D. et al. **Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.nature.com/naturenanotechnology>.

PIPPA G., C. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. **Medicine**, v. 36, n. 1, p. 24–28, 2008.

PRICE, P. (CLINICAL ONCOLOGIST); SIKORA, K. **Treatment of cancer.** [s.l: s.n.].

ROA, J. P. B. et al. Síntese e caracterização do copolímero poli(3-hidroxi-butilato-co- ϵ -caprolactona) a partir de poli(3- hidroxi-butilato) e poli(ϵ -caprolactona). **Polimeros**, v. 20, n. 3, p. 221–226, jul. 2010.

ROCKWELL, S. Experimental Radiotherapy: A Brief History. **Radiation Research**, v. 150, n. 5, p. S157, nov. 1998.

ROSE J PAPAC. Origins of Cancer Therapy. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 74, n. May, p. 391–398, 2001.

SAFARI, J. et al. Water-dispersible Fe₃O₄ nanoparticles stabilized with a biodegradable amphiphilic copolymer. **Comptes Rendus Chimie**, 2014.

SCHMIDT, A. M. Thermoresponsive magnetic colloids. **Colloid and Polymer Science**, v. 285, n. 9, p. 953–966, 6 jun. 2007.

SHAFI, K. V. P. M. et al. Sonochemical preparation of nanosized amorphous Fe-Ni alloys. **Journal of Applied Physics**, v. 81, n. 10, p. 6901–6905, 15 maio 1997.

SHAN, D. et al. Electrospun magnetic poly(l-lactide) (PLLA) nanofibers by incorporating PLLA-stabilized Fe₃O₄ nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 6, p. 3498–3505, 1 ago. 2013.

SHARIFI, I.; SHOKROLLAHI, H.; AMIRI, S. Ferrite-based magnetic nanofluids used in hyperthermia applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 324, n. 6, p. 903–915, 1 mar. 2012.

SHARIFI, S. et al. Injectable in situ forming drug delivery system based on poly(ϵ -caprolactone fumarate) for tamoxifen citrate delivery: Gelation characteristics, in vitro drug release and anti-cancer evaluation. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 6, p. 1966–1978, jul. 2009.

SHI, Y. **Superparamagnetic Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging (MRI) Diagnosis School of Chemical Engineering The University of Adelaide.** [s.l: s.n.].

SHISHKOVSKY, I. et al. Biocompatible features of magnetic nano-oxide core / PCL shell 3D composites fabricated via SLS / M process. n. January, 2018.

SINHA, V. R. et al. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 1, p. 1–23, 18 jun. 2004.

SIQUEIRA, D. D. et al. Otimização da Funcionalização de um Polímero Biodegradável Utilizando Planejamento Fatorial. v. 3, n. 2017, p. 192–198, 2018.

SRIDHAR, R. et al. Curcumin-and natural extract-loaded nanofibres for potential treatment of lung and breast cancer: In vitro efficacy evaluation. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 25, n. 10, p. 985–998, 3 jul. 2014.

SUSLICK, K. S.; PRICE, G. J. APPLICATIONS OF ULTRASOUND TO MATERIALS CHEMISTRY. **Annual Review of Materials Science**, v. 29, n. 1, p. 295–326, 28 ago. 1999.

TEJA, A. S.; KOH, P. Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. **Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials**, v. 55, n. 1–2, p. 22–45, 2009.

VARAN, C.; BILENSOY, E. Development of implantable hydroxypropyl- β -cyclodextrin coated polycaprolactone nanoparticles for the controlled delivery of docetaxel to solid tumors. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 80, n. 1–2, p. 9–15, 2014.

VISWANADH, M. K. et al. Nanotheranostics : Emerging Strategies for Early Diagnosis and Therapy of Brain Cancer. v. 2, 2018.

WANG, G. et al. Drug-loaded poly (ϵ -caprolactone)/Fe₃O₄ composite microspheres for magnetic resonance imaging and controlled drug delivery. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 456, p. 316–323, 15 jun. 2018a.

WANG, G. et al. Controlled synthesis of L-cysteine coated cobalt ferrite nanoparticles for drug delivery. **Ceramics International**, v. 44, n. 12, p. 13588–13594, 15 ago. 2018b.

WANG, J. J. et al. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 765–774, 2011.

WEB OF SCIENCE. **Web of Science Análise de resultados de tópicos “nanoparticles” e “drug delivery”**. Disponível em: <http://wcs.webofknowledge.com/RA/analyze.do?product=WOS&SID=6AvJbbOw8gbtJXzRlib&field=PY_PublicationYear_PublicationYear_en&yearSort=true>. Acesso em: 25 maio. 2019.

WEINA, L. et al. PLGA Hollow Microbubbles Loaded with Iron Oxide Nanoparticles and Doxorubicin for Dual-mode US/MR Imaging and Drug Delivery. **Current Nanoscience**, 2014.

WIDDER, K. J.; SENYEI, A. E.; RANNEY, D. F. **In Vitro Release of Biologically Active Adriamycin by Magnetically Responsive Albumin Microspheres**. **CANCER RESEARCH**. [s.l.: s.n.].

WILLARD, M. A. et al. Chemically prepared magnetic nanoparticles. **International Materials Reviews**, v. 49, n. 3–4, p. 125–170, 18 jun. 2004.

WOŹNIAK, A. et al. Head and neck cancer - history. **Przegl Lek**, n. May, p. 728432, 2012.

YANG, Y. et al. Injectable PLGA/Fe₃O₄ implants carrying cisplatin for. **PLoS ONE**, 2017a.

YANG, Y. et al. Injectable PLGA/Fe₃O₄ implants carrying cisplatin for synergistic magnetic hyperthermal ablation of rabbit VX2 tumor. **PLoS ONE**, maio 2017b.

YAO, J.; YANG, M.; DUAN, Y. Chemistry, Biology, and Medicine of Fluorescent Nanomaterials and Related Systems: New Insights into Biosensing, Bioimaging, Genomics, Diagnostics, and Therapy. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 12, p. 6130–6178, 2014.

YOU, L. et al. Synthesis of multifunctional Fe₃O₄@PLGA-PEG nano-niosomes as a targeting carrier for treatment of cervical cancer. **Materials Science and Engineering C**, v. 94, p. 291–302, 1 jan. 2019.

ZAMAN, M. H. **The role of engineering approaches in analysing cancer invasion and metastasis** **Nature Reviews Cancer**, ago. 2013.

ZHANG, J. et al. 3D-printed magnetic Fe₃O₄/MBG/PCL composite scaffolds with multifunctionality of bone regeneration, local anticancer drug delivery and hyperthermia. 2014.

ZHUO, J.; CHENG, C. Superparamagnetic Iron (III) Oxide Nanoparticle Polymer (SPIONP): Fabrication and Properties by Jia Zhuo (Cheryl) Cheng Department of Electronics Abstract : n. July, 2012.