

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAIO JOSÉ PERECIN

Nanopartículas Superparamagnéticas
Encapsuladas com Polímeros para
Tratamento de Câncer por Hipertermia

São Carlos

2016

CAIO JOSÉ PERECIN

Nanopartículas Superparamagnéticas Encapsuladas com Polímeros
para Tratamento de Câncer por Hipertermia

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades Bioengenharia - Escola
de Engenharia de São Carlos /
Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto / Instituto de Química de São
Carlos da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de mestre em
Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientador: Prof. Dr. Sergio Akinobu
Yoshioka

Versão corrigida.

São Carlos

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

P434n Perecin, Caio José
Nanopartículas Superparamagnéticas Encapsuladas com Polímeros para Tratamento de Câncer por Hipertermia / Caio José Perecin; orientador Sergio Akinobu Yoshioka. São Carlos, 2015.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, 2015.

1. Nanopartículas magnéticas. 2. Superparamagnetismo. 3. Encapsulação polimérica. 4. Nano Spray Dryer. 5. Hipertermia. 6. Câncer. 7. Theranostics. I. Título.



Programa de Pós-Graduação
Interunidades Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

CAIO JOSÉ PERECIN

Título: "Nanopartículas superparamagnéticas encapsuladas com polímeros para tratamento de câncer por hipertermia"

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS - GRADUAÇÃO INTERUNIDADES EM
BIOENGENHARIA - EESC/FMRP/IQSC DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE
BIOENGENHARIA.

Data da defesa: 01/02/2016

Prof. Dr.: Sérgio Akinobu Yoshioka (Orientador)

Instituto de Química de São Carlos / USP

Assinatura: Sérgio A. Yoshioka

Resultado: Aprovado

Prof. Dr.: Adriano Marin de Oliveira

Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Assinatura: Adriano Marin de Oliveira

Resultado: APROVADO

Prof. Dr.: Alberto Tannús

Instituto de Física de São Carlos / USP

Assinatura: Alberto Tannús

Resultado: APROVADO

Homologado em: ___/___/___

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sérgio e Glaucia, pelo apoio incondicional, pelos conselhos e por proverem para que eu pudesse me dedicar aos estudos tranquilamente.

À minha namorada, Lorena, pelo amor, companheirismo e paciência para aguentar minhas “enjoeiras”.

Ao meu irmão Danilo, que sempre dividiu tudo comigo, até “quartinho de empregada”.

Ao orientador Sérgio, pela orientação e idealização do projeto.

À co-orientadora Natália, que não aparece na capa, mas foi quem fez tudo acontecer neste projeto! Que mesmo nos fins de semana, não perde a alegria de trabalhar.

A todos do IPT, lugar que adorei trabalhar e espero logo estar de volta. Primeiramente a todos os amigos do Núcleo Bionano do IPT, Thais, Ariane, Valker, Bianca, Sheila, Leilane, Tati, Fernanda, Jocasta, Douglas, Maria Helena e os demais, por me acolherem muito bem e me ajudarem sempre com experimentos e discussões. Também agradeço muito à Patricia Léo e à Catia Fredericci, duas pessoas maravilhosas que me ajudaram com experimentos. Sem esquecer do Adriano, sempre presente ajudando nos principais momentos.

À Virgínia, pela paciência e ajuda nos experimentos em São Carlos. Ao Marcio, ao Aldimar e ao Prof. Laudemir Varanda, pela ajuda com as caracterizações das partículas.

Aos eternos banos!

E ao pessoal da república, pela amizade e companheirismo desde o Fabão, Pato, Renatão, Lucão, Lost, Figura, Ike, até o Felipe.

RESUMO

PERECIN, C. J. **Nanopartículas superparamagnéticas encapsuladas com polímeros para tratamento de câncer por hipertermia.** 2016. Dissertação (mestrado) – Programa Interunidades Bioengenharia, Universidade de São Paulo, 2016.

O câncer é uma das maiores causas de mortalidade no Brasil e no mundo, com potencial de crescimento nas próximas décadas. Um tipo de tratamento promissor é a hipertermia magnética, procedimento no qual as células tumorais morrem pelo efeito do calor gerado por partículas magnéticas após a aplicação de campo magnético alternado em frequências adequadas. Tais partículas também são capazes de atuar como agentes de contraste para imageamento por ressonância magnética, um poderoso método de diagnóstico para identificação de células neoplásicas, formando a combinação conhecida como *theranostics* (terapia e diagnóstico). Neste trabalho foram sintetizadas nanopartículas de óxido de ferro por método de coprecipitação com posterior encapsulação por técnica de *nano spray drying*, visando sua aplicação no tratamento de câncer por hipertermia e como agente de contraste para imageamento por ressonância magnética. Para a encapsulação foram utilizadas matrizes poliméricas de Maltodextrina com Polissorbato 80, Pluronic F68, Eudragit® S100 e PCL com Pluronic F68, escolhidos com o intuito de formar partículas que dispersem bem em meio aquoso e que consigam atingir alvo tumoral após administração no corpo do paciente. Parâmetros de secagem pelo equipamento Nano Spray Dryer, como temperatura, solvente e concentração de reagentes, foram avaliados. As partículas formadas foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura, Difração de Raios-X, Análise Termogravimétrica, Espalhamento de Luz Dinâmico, Espectroscopia de Infravermelho, magnetismo quanto a magnetização de saturação e temperatura, citotoxicidade e potencial de aquecimento. Tais procedimentos indicaram que o método de coprecipitação produziu nanopartículas de magnetita de tamanho em torno 20 nm, superparamagnéticas a temperatura ambiente, sem potencial citotóxico. A técnica de *nano spray drying* foi eficiente para a formação de partículas com tamanho em torno de 1 μm , também superparamagnéticas, biocompatíveis e com propriedades magnéticas adequadas e para aplicações pretendidas. Destaca-se a amostra com Pluronic, OF-10/15-1P, que apresentou magnetização de saturação de 68,7 emu/g e interação específica com células tumorais.

Palavras-chave: Nanopartículas magnéticas. Superparamagnetismo. Encapsulação polimérica. Nano Spray Dryer. Hipertermia. Câncer. Theranostics.

Abstract

PERECIN, C. J. **Superparamagnetic nanoparticles encapsulated with polymers for cancer therapy by hyperthermia**. 2016. Dissertação (mestrado) – Programa Interunidades Bioengenharia, Universidade de São Paulo, 2016.

Cancer is one of the greatest causes of mortality in Brazil and in the world, with growing potential for the next decades. A promising treatment alternative is magnetic hyperthermia, in which tumor cells die by the heat generated by magnetic nanoparticles after application of an alternate magnetic field in adequate frequencies. Such particles are also capable of acting as contrast agents for magnetic resonance imaging, a powerful method of diagnosis for the identification of neoplastic cells, which characterizes the combination of properties known as theranostics (therapy and diagnosis). In this work, iron oxide nanoparticles were synthesized by coprecipitation method with subsequent encapsulation by nano spray drying technique, aiming their application on cancer treatment by hyperthermia and on magnetic resonance imaging as a contrast agent. Polymeric matrices of Maltodextrin with Polysorbate 80, Pluronic F68, Eudragit® S100 and PCL with Pluronic F68 were employed for encapsulation, chosen carefully to create particles that disperse well in aqueous media and that are able to address the tumoral target after administration into the patient's body. Drying parameters of the Nano Spray Dryer equipment, such as temperature, dispersing medium and reagent concentrations, were evaluated. The generated particles were characterized by Scanning Electron Microscopy, X-Ray Diffraction, Thermogravimetric Analysis, Dynamic Light Scattering, Infrared Spectroscopy, by magnetism in matters of applied magnetic field and temperature, cytotoxic potential and heating potential. Such methods indicated that the coprecipitation method was able to produce magnetite nanoparticles with size of approximately 20 nm, superparamagnetic at room temperature and with no cytotoxic potential. The nano spray drying technique was efficient to produce particles with size of around 1 µm, biocompatible, superparamagnetic and with adequate magnetic properties for the intended applications. The sample OF-10/15-1P stands out with a saturation magnetization of 68.7 emu/g and presenting specific interactions with the tumour cells.

Key-words: Magnetic nanoparticles. Superparamagnetism. Polymeric encapsulation. Nano Spray Dryer. Hyperthermia. Cancer. Theranostics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Exemplo de esquema de procedimento para aplicação de hipertermia magnética. As nanopartículas são aplicadas via intravenosa e então é aplicado um campo magnético alternado na região do tumor, para gerar o aquecimento.	18
Figura 2 - Aplicador de campo magnético alternado para hipertermia MFH 300F® (MagForce Nanotechnologies AG, Berlin, Germany).	19
Figura 3 – Esquema de aplicação de nanopartículas magnéticas para drug-delivery após administração intravenosa. As partículas são direcionadas para o alvo (em amarelo) por um campo magnético externo.	20
Figura 4 - Variação da coercitividade intrínseca H_{ci} com o diâmetro da partícula D . SPM é sigla para Superparamagnético. “Estável” significa que os momentos magnéticos estão estáveis em uma direção, e “instável” que sua direção varia. DC e DS são respectivamente os diâmetros críticos para superparamagnetismo e para mono-domínio.	22
Figura 5 - Gráfico de SLP em função da magnetização de saturação.	24
Figura 6 - Gráfico de R_2 em função da magnetização de saturação M_s	25
Figura 7 - Estrutura química da Maltodextrina.	29
Figura 8 - Estrutura do Eudragit®, copolímero de ácido metacrílico e metil metacrilato.	29
Figura 9 - Estrutura do Polissorbato 80.	30
Figura 10 - Estrutura química do polímero Policaprolactona.	30
Figura 11 - Estrutura química do Pluronic F68, ou Poloxamer 188.	30
Figura 12 - Esquema do equipamento Nano Spray Dryer. 1: Entrada de gás; 2: Aquecedor elétrico; 3: Sensor de temperatura de entrada; 4: Controle e bico do vaporizador; 5: Gotículas de partículas; 6: Cilindro vaporizador e seção de secagem; 7: Produto final no eletrodo coletor de partículas; 8: Eletrodo coletor de partículas; 9: Eletrodo de alta voltagem; 10: Sensor de temperatura de saída; 11: Filtro de saída; 12: Saída do gás de secagem.	33
Figura 13 - Esquema de uma suspensão de nanopartículas com polímeros, da formação de uma gota da suspensão pelo Nano Spray Dryer e de uma partícula final formada pela secagem da gota, de nanopartículas envoltas por polímero.	34
Figura 14 - Foto do equipamento Nano Spray Dryer B-90 utilizado para encapsulação.	38
Figura 15 - Detalhe das gotas da dispersão de nanopartículas sendo secas após passarem pela membrana do Nano Spray Dryer B-90.	39
Figura 16 - Pó de nanopartículas de óxido de ferro, da amostra OF-30/45.	45
Figura 17 - Imagem de MEV da amostra OF-inicial, com aumento de 150 mil vezes.	46
Figura 18 - Imagem de MEV da amostra OF-10/15, com aumento de 150 mil vezes.	46
Figura 19 - MEV da amostra OF-30/45, com aumento de 100 mil vezes.	47
Figura 20 - MEV da amostra OF-60/90, com aumento de 100 mil vezes.	47
Figura 21 - Resultado de medida de tamanho por DLS em distribuição por número, apresentado pelo Zetasizer Software. Comparação das medidas das amostras 10/15, 30/45 e 60/90.	48
Figura 22 - Espectro de difração de raios-x da amostra OF-inicial, comparada aos espectros de referência de magnetita, goetita e NH_4Cl	50
Figura 23 - Espectro de difração de raios-x da amostra OF-30/45 e comparação com a ficha de magnetita da literatura, para fonte de $CoK\alpha$	51

Figura 24 - Espectros de FTIR das amostras OF-10/15, OF-30/45, OF-60/90 e OF-inicial.	52
Figura 25 - Análise Termogravimétrica da amostra OF-10/15, de 25 a 1000 °C.....	53
Figura 26 - Medidas de magnetização M (emu/g) versus campo magnético H (kOe), a 300 K.	54
Figura 27 - Medidas de magnetização M (emu/g) versus campo magnético H (kOe), a 1,7 K.	55
Figura 28 - Gráfico das medidas de magnetização (emu/g) por temperatura (K) por procedimento ZFC/FC das amostras OF-inicial, OF-10/15, OF-30/45 e OF-60/90.....	57
Figura 29 - Gráfico de temperatura (°C) em função do tempo (s) de aplicação do campo magnético (interrompido nos momentos indicados pelas barras verticais), da amostra OF-30/45, a 5,10 e 20 mg/mL.	59
Figura 30 - Imagem de MEV das nanopartículas poliméricas magnéticas formadas por Eudragit®, Eudra, com detalhe do tamanho das partículas, entre 320 e 955 nm. Aumento de 25 mil vezes.	61
Figura 31 - MEV da amostra OF-10/15-1E. Aumento de 5 mil vezes.	63
Figura 32 - OF-10/15-3E. Aumento de 10 mil vezes.....	63
Figura 33 - MEV de OF-10/15-3MT com medidas de tamanho pelo software ImageJ. Aumento de 30 mil vezes.....	64
Figura 34 - MEV de OF-10/15-3MT. Aumento de 10 mil vezes.....	64
Figura 35 - MEV da amostra PCL 1.0, com aumento de 5 mil vezes.	65
Figura 36 - MEV da amostra OF-10/15-4P, com aumento de 100 mil vezes.	66
Figura 37 - Imagem de microscopia eletrônica da amostra OF-10/15-1P, com aumento de 20 mil vezes.	67
Figura 38 - Imagem do resultado da medida de tamanho por DLS da amostra Malto, calculado pelo software do equipamento Zetasizer Nano ZS. Distribuição de tamanho por intensidade.	67
Figura 39 - Imagem do software do equipamento Zetasizer Nano ZS, com as porcentagens de partículas referentes aos picos da distribuição de tamanho por DLS para a amostra Eudra.....	68
Figura 40 - Espectro de difração de raios-x da amostra OF-10/15-1P comparado ao espectro do polímero Pluronic F68.	70
Figura 41 – Espectros de difração de raios-x das amostras OF-30/45 e da amostra PCL 1.0. Fonte de cobre.	71
Figura 42 - Espectroscopia de Infravermelho das amostras que contêm Pluronic, OF-10/15-1P e OF-10/15-4P, comparadas a OF-10/15 e ao próprio polímero Pluronic F68.....	72
Figura 43 - Espectros de Infravermelho das amostras que contêm Eudragit, OF-10/15-1E e OF-10/15-3E, comparadas a OF-10/15 e ao próprio polímero Eudragit S100.	73
Figura 44 - Espectros de Infravermelho da amostra PCL 1.0, comparada aos seus constituintes PCL, Pluronic F68 e OF-30/45.....	74
Figura 45 – Espectros de Infravermelho das amostras Malto e OF-10/15-3MT, comparadas a OF-10/15, Maltodextrina e Tween 80.	75
Figura 46 - TGA das amostras OF-10/15-1P e OF-10/15-4P ao polímero Pluronic F68 e OF-10/15 como referência de óxido de ferro.	76
Figura 47 - TGA das amostras OF-10/15-1E, OF-10/15-3E e Eudra em relação ao seu polímero constituinte Eudragit S100.	77
Figura 48 - TGA da amostra OF-10/15-3MT comparado com OF-10/15, Maltodextrina e Tween 80..	77
Figura 49 - Magnetização (emu/g) das partículas de óxido de ferro com polímeros em função do campo magnético H, a 300 K.	79
Figura 50 - Magnetização (emu/g) das partículas de óxido de ferro com polímeros em função do campo magnético H, a 1,7 K.....	79

Figura 51 - Gráfico de magnetização (M) versus temperatura (T) das amostras OF-10/15-1E, OF-10/15-3E, OF-10/15-1P e OF-10/15-4P.....	81
Figura 52 – Gráfico de magnetização (M) versus temperatura (T) das amostras PCL 1.0, PCL 1.5, Eudra e Malto.	81
Figura 53 - Gráfico de temperatura (°C) versus tempo (s) para amostra OF-10/15-4P, submetida a um campo magnético de 112 kHz e amplitude de 25 mT pico-a-pico. O campo foi interrompido no momento indicado pela barra vertical que corta as curvas.....	84
Figura 54 - Gráfico de temperatura (°C) versus tempo (s) para as amostras OF-10/15-1P e OF-10/15-3E, submetidas a um campo magnético de 112 kHz e amplitude de 25 mT pico-a-pico. O campo foi interrompido no momento indicado pela barra vertical que corta as curvas.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das sínteses de nanopartículas de óxido de ferro. Concentrações prévias ao gotejamento da base.	37
Tabela 2 - Descrição das partículas encapsuladas por Nano Spray Dryer, com os reagentes, solventes e membranas utilizados. As massas de reagente são para cada 100 mL de solvente.....	40
Tabela 3 - Diâmetros hidrodinâmicos médios das nanopartículas de óxido de ferro, medidos por DLS.	49
Tabela 4 - Resíduos das análises termogravimétricas das amostras de óxido de ferro.....	54
Tabela 5 - Magnetização de saturação a 300 K e a 1,7 K, em emu/g.....	56
Tabela 6 - Temperatura de Bloqueio das nanopartículas de óxido de ferro.	57
Tabela 7 - Viabilidade celular em função da concentração de nanopartículas a qual as culturas celulares foram submetidas, em função do controle.....	58
Tabela 8 – Diâmetros principais, diâmetros médios e Índices de Polidispersividade obtidos por DLS para as partículas encapsuladas com diferentes polímeros, e comparação com a estimativa de diâmetro médio obtido por MEV.	68
Tabela 9 - Resíduos de análise termogravimétrica até 1000 °C das amostras com polímeros.	78
Tabela 10 - Resíduos de análise termogravimétrica até 1000 °C dos polímeros e surfactantes utilizados.	78
Tabela 11 - Magnetizações de saturação das amostras com polímeros.....	80
Tabela 12 - Temperaturas de Bloqueio das partículas encapsuladas.	82
Tabela 13 - Viabilidade das células HepG2, Hela e 929 quando em contato com diferentes concentrações das amostras OF-10/15-4P, OF-10/15-1P, PCL 1.0 e Malto.....	83

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
AC	Corrente Alternada
DC	Corrente Direta
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
emu	Unidade eletromagnética
FC	Field-Cooling
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramas
K	Graus Kelvin
K	Constante Anisotrópica
k_B	Constante de Boltzmann
L	Litro
MD	Multi-domain
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
M_w	Massa molecular
nm	Nanômetro
Oe	Oersted (unidade eletromagnética)
PCL	Policaprolactona
SD	Single-domain
SP	Superparamagnético
T_B	Temperatura de Bloqueio
TGA	Análise Termogravimétrica
μm	Micrômetro
ZFC	Zero-Field-Cooling

SUMÁRIO

1	Introdução	15
2	Revisão da Literatura.....	16
2.1	Câncer	16
2.2	Hipertermia	17
2.3	Nanopartículas de óxido de ferro	19
2.5	Mecanismos de geração de calor	23
2.6	Aplicação em imageamento por ressonância magnética (IRM)	25
2.7	Rotas de síntese de nanopartículas de óxido de ferro	26
2.8	Micro/nanoencapsulação.....	27
2.8.1	Polímeros para encapsulação.....	28
2.8.2	Nanospray drying como técnica de nanoencapsulação.....	31
4.	Materiais e Métodos	35
4.1	Materiais	35
4.2	Sínteses de óxido de ferro.....	36
4.3	Encapsulações.....	37
4.4	Caracterizações	41
4.4.1	Difração de Raios-x.....	41
4.4.2	Espalhamento de Luz Dinâmico	41
4.4.3	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	42
4.4.4	Análise Termogravimétrica	42
4.4.5	Espectroscopia de Infravermelho	42
4.4.6	Medidas magnéticas	42
4.4.7	Testes de citotoxicidade.....	43
4.4.8	Potencial de aquecimento.....	44
5.	Resultados e Discussão.....	44
5.1	Síntese e caracterizações das nanopartículas de óxidos de ferro.....	44

5.1.1	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	45
5.1.2	Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).....	48
5.1.3	Difração de raios-x.....	49
5.1.4	Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR).....	51
5.1.5	Análise Termogravimétrica.....	52
5.1.6	Medidas magnéticas em função do campo externo H.....	54
5.1.7	Medidas magnéticas em função da temperatura.....	56
5.1.8	Citotoxicidade.....	58
5.1.9	Testes de Aquecimento.....	58
5.2	Síntese e Caracterização das partículas encapsuladas com polímeros.....	60
5.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	61
5.2.2	Espalhamento de Luz Dinâmico.....	67
5.2.3	Difração de raios-x.....	69
5.2.4	Espectroscopia de Infravermelho.....	71
5.2.5	Análise Termogravimétrica.....	75
5.2.6	Medidas magnéticas em função de campo H.....	78
5.2.7	Medidas magnéticas em função da temperatura.....	80
5.2.8	Citotoxicidade.....	82
5.2.9	Potencial de aquecimento.....	84
6.	Conclusão.....	86
	Referências Bibliográficas.....	87

1 Introdução

O câncer tem se tornado uma das doenças que mais causam mortes no Brasil e no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Apesar dos constates avanços da medicina nesta área, seu diagnóstico e tratamento continuam sendo um desafio.

Um tipo de tratamento de câncer muito promissor é a hipertermia. Ela se baseia no fato que as células tumorais são mais sensíveis ao calor do que as células saudáveis, ao serem mortas a 42 °C, enquanto as saudáveis resistem (CAVALIERE, CIOCATTO, *et al.*, 1967). A administração intravenosa de um fluido magnético com subsequente aplicação de um campo magnético alternado na região do tumor pode gerar o calor necessário para matar seletivamente as células tumorais.

Tal fluido magnético pode ser composto por nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro. São partículas de tamanho abaixo de aproximadamente 50 nm (o tamanho limite exato para superparamagnetismo depende da composição da partícula e da temperatura), que apresentam magnetização apenas quando um campo magnético externo é aplicado. Seu aquecimento pode acontecer através dos mecanismos de relaxação de Néel (relativa ao seu momento magnético) e de relaxação Browniana (relativa ao seu movimento rotacional) (PANKHURST, CONNOLLY, *et al.*, 2003). Além do aquecimento, suas propriedades magnéticas também possibilitam seu direcionamento até o tumor por um campo magnético gradiente externo e o imageamento por ressonância magnética (YOO, LEE, *et al.*, 2011), respectivamente para aumentar a concentração de partículas na região alvo, aumentando seu potencial terapêutico e diminuindo seus efeitos colaterais em outras regiões, e para acompanhar a evolução do tratamento através de imagens das esperadas regressões do tumor.

No entanto, as nanopartículas de apenas óxido de ferro não são estáveis em meio aquoso ou sanguíneo e dificilmente seriam capazes de atingir seu alvo após administração intravenosa. Uma estratégia que pode torná-las dispersas no sangue e capazes de atingir os tumores é a encapsulação polimérica. O polímero é escolhido de forma a mascarar características físico-químicas das partículas encapsuladas e a modificação de sua superfície permite o prolongamento do seu tempo de circulação no sangue, além de poder promover interações químicas com as células. Poloxamer 188, por exemplo, interage com tumores

resistentes a fármacos, resultando em sua drástica sensibilização com respeito a vários agentes anticancerígenos, após promover a interiorização das partículas (BATRAKOVA e KABANOV, 2008).

Um método de encapsulação recentemente desenvolvido é a nebulização por *nano spray drying*. Esta técnica permite a formação de partículas abaixo de 2 micrômetros, principalmente em função da tecnologia de atomização empregada. Neste trabalho, a técnica de *nano spray drying* foi empregada para obtenção do óxido de ferro encapsulado por matriz polimérica a partir das dispersões de diferentes composições. Não é reportada na literatura a encapsulação de nanopartículas magnéticas por esta técnica, o que configura a novidade do trabalho desenvolvido.

2 Revisão da Literatura

2.1 Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 tipos diferentes de doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo. Sua origem se dá por diversos fatores, que podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover o câncer (carcinogênese) ((INCA), INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2014). O câncer é uma das maiores causas de mortalidade no mundo, com aproximadamente 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes relacionadas só em 2012. É esperado que o número de novos casos aumente aproximadamente 70% nas próximas duas décadas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

O Brasil vem sofrendo mudanças em seu perfil demográfico, consequência, entre outros fatores, do processo de urbanização populacional, da industrialização e dos avanços da ciência e da tecnologia. Esse processo de mudança demográfica, denominado de “envelhecimento” da população, associado à transformação nas relações entre as pessoas e seu ambiente, trouxe uma alteração importante no perfil de morbimortalidade. Tal cenário está diminuindo a ocorrência das doenças infectocontagiosas e colocando as doenças crônico-degenerativas como novo centro de atenção da saúde da população brasileira. A estimativa

para o ano de 2015 foi de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer ((INCA), INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2014).

Hoje, os tipos de tratamentos de câncer disponíveis são diversos, como cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia, terapia fotodinâmica, transplante de células tronco, entre outros. Cada um deles tem suas vantagens e efeitos colaterais. Um outro tipo que tem atraído atenção é a hipertermia, que, apesar de ser usada há algum tempo, novas ferramentas prometem melhorar significativamente sua eficácia (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

2.2 Hipertermia

Hipertermia significa um aumento anormal da temperatura corpórea. Nas últimas décadas do século XIX, foi verificado que pacientes com febres altas demonstravam reduções incomuns de células. Também se notou que temperaturas moderadamente elevadas (menores que 45 °C) causavam regressão significativa ou mesmo destruição completa de tumores (SALUNKHE, KHOT e PAWAR, 2014). E mais importante, diversos estudos mostraram que células tumorais são mais sensíveis ao calor do que células saudáveis (CAVALIERE, CIOCATTO, *et al.*, 1967) (MONDOVI, AGRO, *et al.*, 1969).

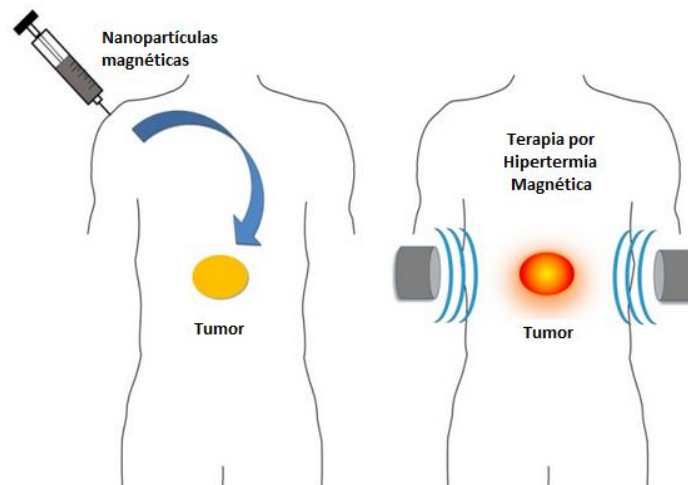
Portanto, a hipertermia pode ser usada como um tipo de tratamento no qual o corpo é exposto a altas temperaturas para danificar ou matar células tumorais, ou para ao menos torná-las mais sensíveis aos efeitos de outras terapias, como radiação e por fármacos antitumorais (SALUNKHE, KHOT e PAWAR, 2014).

O aumento de temperatura altera o funcionamento de diversas proteínas enzimáticas e estruturais, influenciando o crescimento celular e diferenciação, que pode induzir apoptose. Mudanças causadas por hipertermia afetam a síntese de ácidos nucleicos e também levam a redução no transporte transmembrânico, desestabilizando seu potencial (SILVA, OLIVEIRA, *et al.*, 2011). Além disso, elevadas temperaturas (41-42,5 °C) interferem em mecanismos de reparo de DNA, ao induzir a degradação da proteína BRCA2 e inibir o reparo de recombinações homólogas defeituosas (KRAWCZYKA ET AL., 2011). Dessa forma, se a temperatura puder ser mantida a 42 °C por 30 min, o câncer é destruído (PANKHURST, CONNOLLY, *et al.*, 2003).

O tratamento por hipertermia pode ser externo ou interno. Para a hipertermia externa são aplicados ultrassom, radiofrequências e micro-ondas por fora do corpo, enquanto que a hipertermia interna se utiliza de substâncias inseridas no corpo para agir como fontes de calor (SALUNKHE, KHOT e PAWAR, 2014). O segundo tipo tem a vantagem de poder ser aplicado de forma mais específica a regiões de difícil acesso.

Uma forma de aplicar a hipertermia interna é via administração de um fluido composto por partículas magnéticas, chamada hipertermia magnética. A aplicação de um campo magnético alternado de adequadas magnitude e frequência a este fluido gera calor.

Figura 1 – Exemplo de esquema de procedimento para aplicação de hipertermia magnética. As nanopartículas são aplicadas via intravenosa e então é aplicado um campo magnético alternado na região do tumor, para gerar o aquecimento.



Fonte: Adaptado de (ANDRADE, FERREIRA, *et al.*, 2011).

Já em 1979, foi reportado experimento no qual células tumorais foram destruídas seletivamente após injeção intravenosa e aplicação de campo magnético alternado em ratos (GORDON, HINES e GORDON, 1979). Mais recentemente, por exemplo, nanopartículas de Fe/Fe₃O₄ revestidas com porfirina foram testadas via intravenosa e via subcutânea, sendo capazes de regredir significativamente o tamanho de melanomas em ratos, sem os efeitos colaterais associados com a quimioterapia tradicional (BALIVADA, RACHAKATLA, *et al.*, 2010). Outro estudo pré-clínico similar reportou prolongação de sobrevivência de ratos com glioblastoma em 4,5 vezes (JORDAN, SCHOLZ, *et al.*, 2006).

O primeiro estudo clínico sobre hipertermia magnética foi iniciado em março de 2003 (MAIER-HAUFF, ROTHE, *et al.*, 2007). Pacientes com glioblastoma multiforme foram

submetidos a seções de aplicação de campo magnético pelo equipamento MFH 300F® (MagForce Nanotechnologies AG, Berlin, Germany) após sofrerem injeção intracraniana de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com aminosilano (produto comercial MFL AS, MagForce Nanotechnologies AG, Berlin, Germany), combinadas com aplicação de radioterapia. Foi demonstrado que a terapia pode ser aplicada de forma segura, pois os efeitos colaterais foram muito reduzidos. O tempo médio de sobrevivência após as seções foi de 14,5 meses, o que foi considerado promissor.

Figura 2 - Aplicador de campo magnético alternado para hipertermia MFH 300F® (MagForce Nanotechnologies AG, Berlin, Germany).



Fonte: (THIESEN e JORDAN, 2008)

Outro estudo clínico para verificação da viabilidade da terapia foi realizado com dez pacientes com carcinoma de próstata. As mesmas nanopartículas MFL AS foram administradas através de injeção transperineal e o mesmo aplicador de campo MFH 300F® foi utilizado. O material ficou retido na próstata pelo intervalo de 6 semanas do tratamento, fazendo com que apenas uma aplicação fosse necessária, porém sem apresentar toxicidade sistêmica pelo acompanhamento até 17,5 meses. Foi observada diminuição dos níveis de PSA em oito pacientes (JOHANNSEN, THIESEN, *et al.*, 2010).

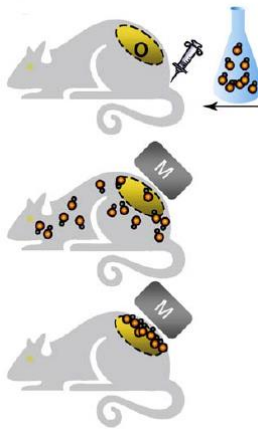
2.3 Nanopartículas de óxido de ferro

Mais especificamente, nanopartículas de óxido de ferro magnéticas de magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) apresentam biocompatibilidade e propriedades magnéticas adequadas para serem utilizadas em aplicações biológicas, como o tratamento de tumores

por hipertermia (PANKHURST, CONNOLLY, *et al.*, 2003). Outros materiais altamente magnéticos, como cobalto e níquel, têm potencial tóxico (ANDRADE, FERREIRA, *et al.*, 2011), o que contraindica sua aplicação.

As nanopartículas magnéticas são uma interessante plataforma para o desenvolvimento de *drug-delivery* (carreamento de terapêuticos), pois seu magnetismo permite o direcionamento por um campo magnético externo. Dessa forma, a acumulação e retenção dessas nanopartículas em tumores podem ser aumentadas pela atração delas ao alvo terapêutico (CHERTOK, DAVID, *et al.*, 2007). Tal propriedade é importante pois evita efeitos colaterais inerentes a tratamentos não específicos, como a quimioterapia, na qual os fármacos são administrados por via intravenosa e são distribuídos ao corpo todo, afetando tanto células saudáveis quanto tumorais.

Figura 3 – Esquema de aplicação de nanopartículas magnéticas para *drug-delivery* após administração intravenosa. As partículas são direcionadas para o alvo (em amarelo) por um campo magnético externo.



Fonte: (CORCHERO e VILLAVARDE, 2009)

Nanopartículas de óxido de ferro também são ótimos agentes de contraste para imageamento por ressonância magnética (MRI), ao reduzirem os tempos de relaxação dos prótons, após serem excitados por um campo externo. Há ainda diversas outras aplicações para as nanopartículas magnéticas. Separação de substâncias pode ser feita por nanopartículas com superfície modificada, que se ligam às moléculas-alvo, para depois serem extraídas do meio por um campo magnético (PANKHURST, CONNOLLY, *et al.*, 2003).

Para que as nanopartículas possam ser usadas nessas aplicações biológicas, há características preferenciais que devem ser buscadas em sua síntese, como tamanho, forma, magnetismo, composição, entre outras. O tamanho, por exemplo, influencia diretamente nas propriedades magnéticas das nanopartículas, como sua classificação como ferrimagnético ou superparamagnético e sua magnetização de saturação.

2.4 Propriedades magnéticas

Materiais ferromagnéticos e ferrimagnéticos são divididos em domínios magnéticos, pequenas regiões espontaneamente magnetizadas à sua saturação (material multi-domínio) (CULLITY e GRAHAM, 2009). No entanto, abaixo de um determinado tamanho crítico, o material apresenta apenas um domínio, sendo chamado de mono-domínio.

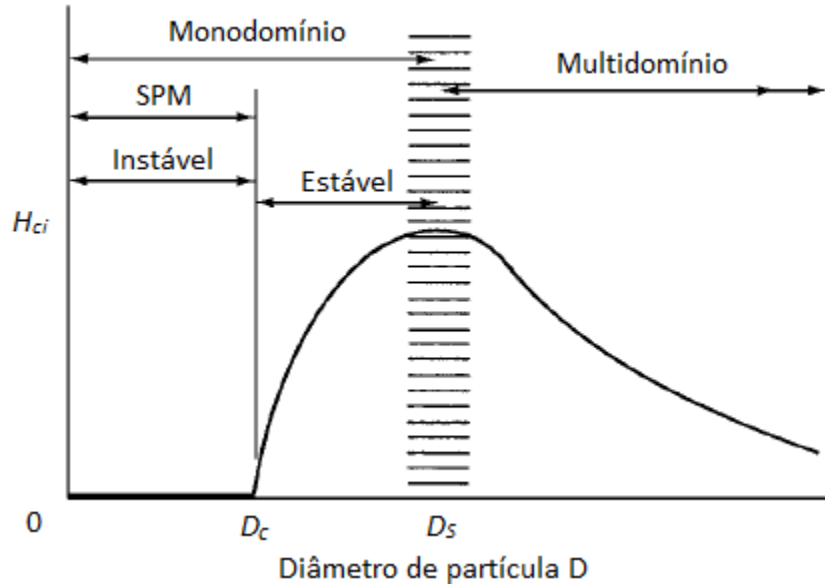
A energia anisotrópica por partícula, que é responsável por manter os momentos magnéticos em uma certa direção (eixo fácil de magnetização), pode ser expressa por:

$$E(\theta) = K V \sin^2 \theta \quad (\text{Equação 1})$$

Em que V é o volume da partícula, K é a constante anisotrópica (dependente do material e da temperatura) e θ é o ângulo entre a direção da magnetização externa e o eixo de fácil magnetização. A barreira de energia $K V$ separa os dois estados de magnetização do eixo fácil. Com a diminuição do tamanho da partícula, a energia térmica $k_B T$ (k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura) excede esta barreira energética a magnetização é facilmente invertida. Portanto, quando $k_B T > K V$, o sistema se torna superparamagnético (LU, SALABAS e SCHUTH, 2007). Portanto, uma partícula superparamagnética é um sistema mono-domínio que tem sua magnetização invertida espontaneamente.

A coercitividade e a remanência de um material superparamagnético são nulas. Coercitividade de um material é a intensidade do campo magnético necessária para reduzir a magnetização deste material a zero, a partir da sua magnetização de saturação. A remanência é a magnetização de um material após a remoção de um campo magnético aplicado a ele.

Figura 4 - Variação da coercitividade intrínseca H_{ci} com o diâmetro da partícula D . SPM é sigla para Superparamagnético. “Estável” significa que os momentos magnéticos estão estáveis em uma direção, e “instável” que sua direção varia. D_c e D_s são respectivamente os diâmetros críticos para superparamagnetismo e para mono-domínio.



Fonte: Adaptado de CULLITY, B. D.; GRAHAM, C. D. (CULLITY e GRAHAM, 2009).

O efeito de histerese irá aparecer e o de superparamagnetismo irá desaparecer quando o tamanho da partícula, a temperatura constante, aumentar do diâmetro crítico, D_c (ou volume crítico, V_c), ou quando partículas de um determinado tamanho são resfriadas até abaixo de determinada temperatura chamada Temperatura de Bloqueio (T_B) (CULLITY e GRAHAM, 2009).

Cada material tem um volume crítico característico para se tornar superparamagnético, dado por (CULLITY e GRAHAM, 2009):

$$V_c = \frac{25 k_B T}{K} \quad (\text{Equação 2})$$

Mantendo-se o volume fixo, a temperatura a partir da qual o sistema é considerado superparamagnético é chamada de temperatura de bloqueio, T_B , que é dada por (CULLITY e GRAHAM, 2009):

$$T_B = \frac{K V}{25 k_B} \quad (\text{Equação 3})$$

A rápida relaxação dos momentos magnéticos, inerente a nanopartículas superparamagnéticas, é essencial para a aplicação para imageamento por ressonância

magnética e para mecanismos de liberação de energia na forma de calor. Além disso, a propriedade de superparamagnetismo evita a aglomeração devido a atração magnética entre as partículas (YOO, LEE, *et al.*, 2011), o que seria um obstáculo para aplicações biológicas.

2.5 Mecanismos de geração de calor

Existem diversos mecanismos de aquecimento, associados a perda de susceptibilidade, perda de histerese e aquecimento viscoso (agitação) (VALLEJO-FERNANDEZ, WHEAR, *et al.*, 2013). O tipo de mecanismo depende das propriedades da partícula e do campo aplicado.

Partículas ferro e ferri-magnéticas multi-domínios sofrem aquecimento por perda de histerese. Quando expostas a um campo magnético, o domínio com magnetização na direção do campo externo cresce e os outros diminuem. O deslocamento das paredes dos domínios é um fenômeno irreversível e gera calor (MORNET, VASSEUR, *et al.*, 2004). Nanopartículas superparamagnéticas não possuem paredes de domínio, portanto não podem ser aquecidas por este mecanismo.

Quando um campo magnético aplicado às nanopartículas superparamagnéticas é removido, sua magnetização relaxa a zero devido a energia termal do ambiente. Esta relaxação pode corresponder tanto a rotação física das partículas no fluido, quanto a rotação dos momentos magnéticos atômicos de cada partícula. A rotação das partículas é a chamada “rotação Browniana” e a rotação do momento magnético é a “relaxação de Néel” (PANKHURST, CONNOLLY, *et al.*, 2003).

No caso da relaxação de Néel, o campo magnético fornece energia às partículas e gira os momentos magnéticos da partícula, vencendo a barreira energética $E = KV$. No retorno dos momentos à orientação de equilíbrio, ocorre a dissipação de energia. Este fenômeno é caracterizado pelo tempo de relaxação de Néel:

$$t_N = t_0 e^{\frac{KV}{k_B T}} \quad (\text{Equação 4})$$

Em que $t_0 = 10^{-9}$ s, k_B é a constante de Boltzmann. A frequência ν_N para máximo aquecimento por relaxação de Néel é dado pela equação: $2 \pi \nu_N t_N = 1$ (MORNET, VASSEUR, *et al.*, 2004).

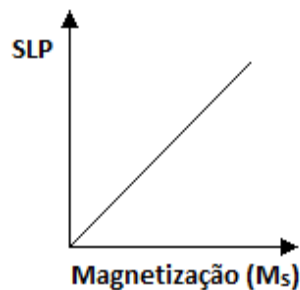
A rotação Browniana é gerada pelo torque exercido pelo campo magnético AC externo no momento magnético da partícula como um todo. Neste caso, a barreira energética para reorientação da partícula é determinada pela fricção rotacional dela com o meio líquido. Esta rotação é caracterizada pelo tempo de relaxação Browniano:

$$t_B = \frac{3\eta V_B}{k_B T} \quad (\text{Equação 5})$$

Em que η é a viscosidade do meio líquido e V_B é o volume hidrodinâmico da partícula. A frequência ν_N para máximo aquecimento por rotação Browniana é dada pela equação: $2\pi\nu_B t_B = 1$ (MORNET, VASSEUR, *et al.*, 2004).

A capacidade de gerar de calor das partículas é medida pela chamada SLP, do inglês *Specific Loss Power*, que denota seu poder de liberação de energia específico. A SLP varia com o tamanho, a constante anisotrópica e a magnetização de saturação, sendo diretamente proporcional a esta última (YOO, LEE, *et al.*, 2011).

Figura 5 - Gráfico de SLP em função da magnetização de saturação.



Fonte: Adaptado de (YOO, LEE, *et al.*, 2011).

A capacidade de uma amostra de nanopartículas aquecer um determinado meio é mensurada pela SAR (Specific Absorption Rate). Sua equação depende da capacidade calorífica do meio (C), da diferença de temperatura gerada (ΔT) e do tempo necessário para esta mudança (Δt) (SHUBITIDZE, KEKALO, *et al.*):

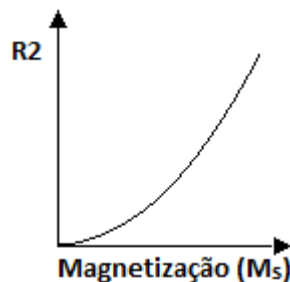
$$SAR = C \cdot \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad (\text{Equação 6})$$

2.6 Aplicação em imageamento por ressonância magnética (IRM)

O diagnóstico precoce e apurado de doenças é de extrema importância, pois torna seu tratamento muito mais simples e efetivo. Diversos tipos de câncer, como o pancreático, são muito difíceis de serem detectados em fase inicial. Nanopartículas magnéticas podem auxiliar no diagnóstico dessas doenças através de imageamento por ressonância magnética (IRM), ao aumentar o contraste entre o tecido patogênico e o tecido normal (YOO, LEE, *et al.*, 2011).

Quando submetidas a um campo magnético externo, as nanopartículas magnéticas geram um campo magnético secundário, que causa uma diminuição do tempo de relaxação T2 dos prótons das moléculas de água. A taxa de relaxação transversa R2 é um indicador de sensibilidade do agente de contraste para imageamento por T2, e é definido como $1/T2$. Um dos principais fatores que influenciam R2 é a magnetização de saturação das nanopartículas; R2 cresce exponencialmente com a M_s (YOO, LEE, *et al.*, 2011).

Figura 6 - Gráfico de R2 em função da magnetização de saturação M_s .



Fonte: Adaptado de (YOO, LEE, *et al.*, 2011).

Os agentes de contraste mais comuns disponíveis são à base de gadolínio, um material fortemente magnético, sendo um metal de terra rara. No entanto, nanopartículas de óxido de ferro têm potencial de gerar um sinal de contraste muito maior. Além disso, o óxido de ferro tem menor toxicidade, ou seja, é mais seguro para aplicações *in vivo* (TONG, HOU, *et al.*, 2010). Alguns compostos a base de óxido de ferro já foram aprovados pelo US Food and Drug Administration (FDA) para atuarem como agentes do contraste, como Feridex I.V.[®], Resovist[®], Gastromark[™] e Ferumoxytol. Os três primeiros já foram descontinuados e o último está sendo avaliado em testes clínicos (ANSELMO e MITRAGOTRI, 2015).

Além do diagnóstico de diversas doenças, os progressos de tratamentos por hipertermia magnética podem ser acompanhados por IRM. Portanto, as mesmas partículas

utilizadas para o tratamento do tumor por hipertermia podem ajudar a avaliar sua eficácia por imageamento. Desta forma, a combinação de um agente de terapia e diagnóstico em uma mesma nanoestrutura, e possibilidade de acompanhamento da evolução da terapia, caracteriza esta plataforma como um “theranostic” (YOO, LEE, *et al.*, 2011).

2.7 Rotas de síntese de nanopartículas de óxido de ferro

Há diversos métodos de síntese de nanopartículas de óxido de ferro. Um dos mais difundidos deles é o de coprecipitação. Nesta técnica, as nanopartículas são obtidas através da coprecipitação de solução aquosa de sais de ferro pela adição de uma base. O controle de tamanho, forma e composição das partículas depende do tipo de sal usado (cloretos, sulfatos, nitratos, entre outros), as concentrações de Fe^{2+} e Fe^{3+} , o pH da solução e a força iônica do meio (GUPTA e GUPTA, 2005).

Uma estratégia para aperfeiçoar a síntese por coprecipitação é o borbulhamento de nitrogênio ao meio de solução. Ao criar um meio inerte, tal procedimento protege as partículas contra oxidação indesejada e ainda reduz o tamanho das partículas, quando comparado a métodos que não removem o oxigênio do meio (GUPTA e GUPTA, 2005). Outra é a aplicação de ultrassom. Síntese sob irradiação ultrassônica pode reduzir a aglomeração das partículas e melhorar a distribuição de tamanho e morfologia, devido a agitação uniforme do meio causada pelas ondas ultrassônicas (AHMADI, MALEK, *et al.*, 2011).

Decomposição termal, feita em altas temperaturas (< 200 °C) a partir de precursores organometálicos em um solvente orgânico apolar, também tem apresentado sucesso na síntese de nanopartículas de Fe_3O_4 monodispersas. Outras rotas de síntese, como por micelas reversas, coloides orgânicos, entre outras, também têm sido utilizadas. O método de coprecipitação tem a vantagem de ser simples, barato e ter um ótimo rendimento em relação a outras técnicas (KARAAGAC, KOCKAR, *et al.*, 2010).

Um dos maiores desafios de partículas da escala nanométrica consiste na instabilidade por longos períodos de tempo. Partículas desta ordem de tamanho tendem a formar aglomerados para reduzir a energia associada à sua alta razão de área de superfície por volume. Além disso, nanopartículas metálicas são quimicamente ativas e são facilmente oxidadas pelo ar, resultando em perda de magnetismo. Para diversas aplicações, é crucial

desenvolver estratégias de proteção para estabilizá-las quimicamente contra degradação durante e após sua síntese (LU, SALABAS e SCHUTH, 2007). A encapsulação polimérica é uma alternativa para evitar esses efeitos indesejáveis (AKBARZADEH, MIKAEILI, *et al.*, 2012).

2.8 Micro/nanoencapsulação

O conceito de encapsulação surgiu da idealização do modelo celular. Neste conceito, a membrana que envolve e protege o citoplasma e os demais componentes exerce ao mesmo tempo outras funções, como controlar a entrada e saída de material da célula. De modo semelhante, uma microcápsula consiste, em geral, em uma camada de polímero que atua como um filme protetor, isolando a substância ativa e evitando os efeitos de sua exposição inadequada. Essa membrana desfaz-se sob estímulos específicos, liberando a substância em locais específicos ou na taxa mais adequada ao tratamento. Uma outra possibilidade de encapsulação, além das cápsulas, é a formação de microesferas. Neste segundo caso, o material ativo encontra-se disperso em uma matriz sólida de polímero (OLIVEIRA, 2008).

Os métodos mais comuns para produção de nanopartículas poliméricas podem ser divididos em: (i) métodos físico-químicos, empregando polímeros pré-formados, podendo ser emulsificação/evaporação de solvente, difusão/evaporação de solvente, coacervação simples ou complexa, dentre outros; (ii) métodos de químicos, empregando polimerização *in situ*, podendo ser polimerização ou policondensação interfacial, polimerização *in situ*, polimerização em emulsão, dentre outros; (iii) métodos físicos, também empregando polímeros pré-formados, podendo ser *spray drying*, *spray chilling*, leite fluidizado, dentre outros (OLIVEIRA, 2008).

Convencionalmente, as partículas são constituídas por um material encapsulante, que pode ser um polímero, um ativo de interesse que terá suas propriedades modificadas, podendo ser protegido contra degradação química, ou mesmo liberado de forma controlada para o meio, e demais aditivos como estabilizantes (por exemplo, emulsificantes), solubilizantes, dentre outros. As partículas ou encapsulados, como também são conhecidos podem estar em uma escala de tamanho de micrômetros ou nanômetros, podendo ser classificadas como micro ou nanopartículas.

2.8.1 Polímeros para encapsulação

Polímeros são macromoléculas formadas a partir de unidades estruturais menores (os monômeros), e são muito usados como material encapsulante na formação de partículas, dando origem às partículas poliméricas, que podem ser formadas de polímeros naturais ou artificiais sintéticos contendo o princípio ativo (fármaco ou material biologicamente ativo), que pode ser associado com a partícula por diversas formas, como adsorção, dissolução, encapsulação ou ligação covalente (WOHLFART, GELPERINA e KREUTER, 2012).

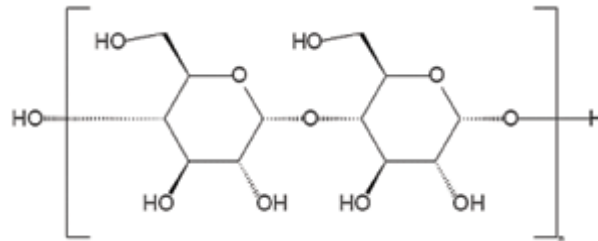
Nanopartículas biodegradáveis são frequentemente usadas para melhorar a biodisponibilidade, solubilidade e tempo de retenção de substâncias terapêuticas. Essas estruturas protegem tais substâncias de degradação prematura e interação com o meio biológico, aumentando a absorção por um certo tecido, biodisponibilidade, tempo de retenção e promovendo penetração intracelular.

O polímero é escolhido de forma a mascarar características físico-químicas das partículas encapsuladas e a modificação de sua superfície permite sua entrada no cérebro após administração intravenosa via mecanismo mediado por receptores. Por exemplo, o tratamento de tumores cerebrais é muito facilitado pelo eficiente *drug-delivery* de terapêuticos anti-tumorais, com o uso de polímeros como Tween 80 (SUN, XIE, *et al.*, 2014), Pluronic (MEI, ZHANG, *et al.*, 2009), entre outros. Há inúmeras opções de polímeros que podem ser testadas para atingir o objetivo desejado para cada caso. Alguns deles serão citados a seguir.

Maltodextrina é um polissacarídeo formado por unidades de D-glicose. Carboidratos, como a Maltodextrina, apresentam papéis importantes em muitos processos biológicos, como sinalização celular, adesão, migração celular e no desenvolvimento e metástase de tumores. Dessa forma, carboidratos podem atuar como marcadores para as nanopartículas atingirem alvos moleculares. Por exemplo, há estudos que indicam que funcionalizações com lactose e glicose aumentam a internalização das partículas em células tumorais (SUR, CAM, *et al.*, 2010). Monossacarídeos ancorados à superfície de nanopartículas conferem a elas estabilidade em meio aquoso, ao garantir hidrofiliabilidade. Além disso, tais nanopartículas podem ter o potencial de ultrapassar barreiras biológicas como a membrana plasmática e a barreira

hemato-encefálica, permitindo seu uso no tratamento de tumores cerebrais, como o glioblastoma (MOROS, HERNAEZ, *et al.*, 2012).

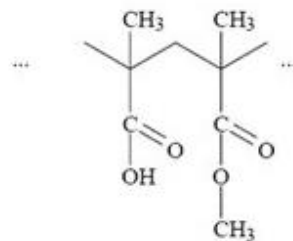
Figura 7 - Estrutura química da Maltodextrina.



Fonte: (CARARETO, FILHO, *et al.*, 2010)

Eudragit® S 100 é um copolímero aniônico de ácido metacrílico e metil metacrilato, na proporção 1:2, desenvolvido para granulação de fármacos para liberação controlada. Por ser sensível ao pH e dissolver-se em pH básico, é utilizado para a encapsulação de ativos visando o *drug-delivery* ao intestino após administração oral. Sua massa molar é de aproximadamente 125000 g/mol (EVONIK INDUSTRIES).

Figura 8 - Estrutura do Eudragit®, copolímero de ácido metacrílico e metil metacrilato.

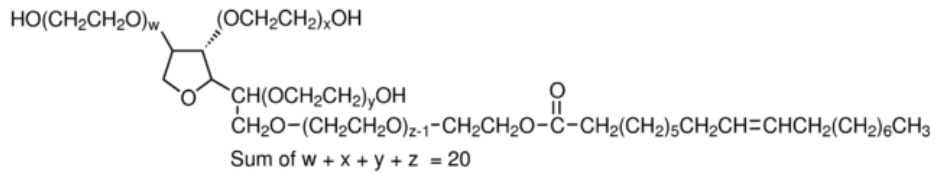


Fonte: Evonik (EVONIK INDUSTRIES).

Tween 80, ou Polissorbato 80, é um tensoativo hidrofílico não iônico. É muito empregado nas técnicas de encapsulação, como emulsificante para auxiliar na estabilização dos sistemas formados. Estudos indicam que nanopartículas com Tween 80 em sua superfície têm a capacidade de penetrar no cérebro, atribuindo essa capacidade à interação do surfactante com as células endoteliais dos micro-vasos sanguíneos que compõem a barreira hemato-encefálica. Polissorbato 80 ancora a alipoproteína E (Apo E), proteína que participa no transporte de lipídeos ao cérebro por receptores de lipoproteína de baixa densidade (LDL). Assim, as nanopartículas mascaradas por Apo E podem interagir com os receptores de LDL das

células endoteliais e sofrerem endocitose (WOHLFART, GELPERINA e KREUTER, 2012) (SUN, XIE, *et al.*, 2014).

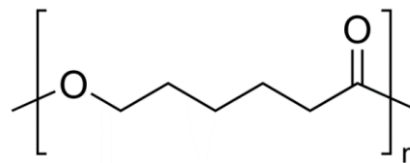
Figura 9 - Estrutura do Polissorbato 80.



Fonte: Sigma-Aldrich (SIGMA-ALDRICH, 2015).

Poli- ϵ -caprolactona (PCL) é um polímero cristalino sintético. Bastante resistente a hidrólise, este poliéster apresenta alta permeabilidade e pouca toxicidade. É altamente hidrofóbico e degrada-se muito lentamente *in vitro* na ausência de enzimas e *in vivo* (MA, HUANG, *et al.*, 2010). Aprovado pelo FDA (MEI, ZHANG, *et al.*, 2009), este polímero tem sido amplamente usado em diversas aplicações biológicas, principalmente para *drug-delivery*.

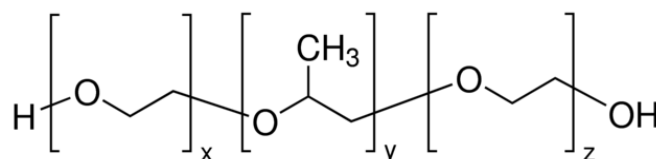
Figura 10 - Estrutura química do polímero Policaprolactona.



Fonte: Sigma-Aldrich (SIGMA-ALDRICH, 2015).

Poloxamer 188, um copolímero de três blocos composto de poli (óxido de etileno)-poli (óxido de propileno)-poli (óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO), também conhecido como Pluronic F68, tem sido muito utilizado na funcionalização de materiais de aplicação biológica. Este polímero, também aprovado pelo FDA (MA e SONG, 2007), é solúvel em água e em solventes orgânicos.

Figura 11 - Estrutura química do Pluronic F68, ou Poloxamer 188.



Fonte: Sigma-Aldrich (SIGMA-ALDRICH, 2015).

Foi demonstrado que Pluronic interage com tumores resistentes a fármacos, resultando em drástica sensibilização desses tumores com respeito a vários agentes anticancerígenos. O atributo-chave para sua atividade biológica é sua capacidade de incorporação às membranas seguido de penetração às células, afetando diversas funções celulares (BATRAKOVA e KABANOV, 2008). Dessa forma, o polímero auxilia no transporte das nanopartículas pela barreira hemato-encefálica e barreiras intestinais (MEI, ZHANG, *et al.*, 2009). Além disso, o Pluronic possui transições estruturais entre estados relaxados e colapsados de acordo com a temperatura (PARK, KIM, *et al.*, 2012), que podem ser muito úteis para liberação controlada de fármacos.

Matrizes de PCL e Pluronic F68 têm sido testadas para aplicações diversas, mostrando-se biologicamente seguras e adequadas para uso como sistema de *drug-delivery* (MA e SONG, 2007).

2.8.2 Nanospray drying como técnica de nanoencapsulação

A técnica de *spray drying* é relatada na literatura como um método de microencapsulação porque pode ser adaptada pela criação de um sistema matricial do tipo esférico, partindo de uma mistura líquida complexa contendo um material ativo solubilizado, disperso, ou mesmo emulsificado, com um polímero na fase aquosa ou em solvente orgânico. Este tipo de processo permite a formação de microesferas ou microcápsulas, dependendo da formulação inicial (RÉ, 2006).

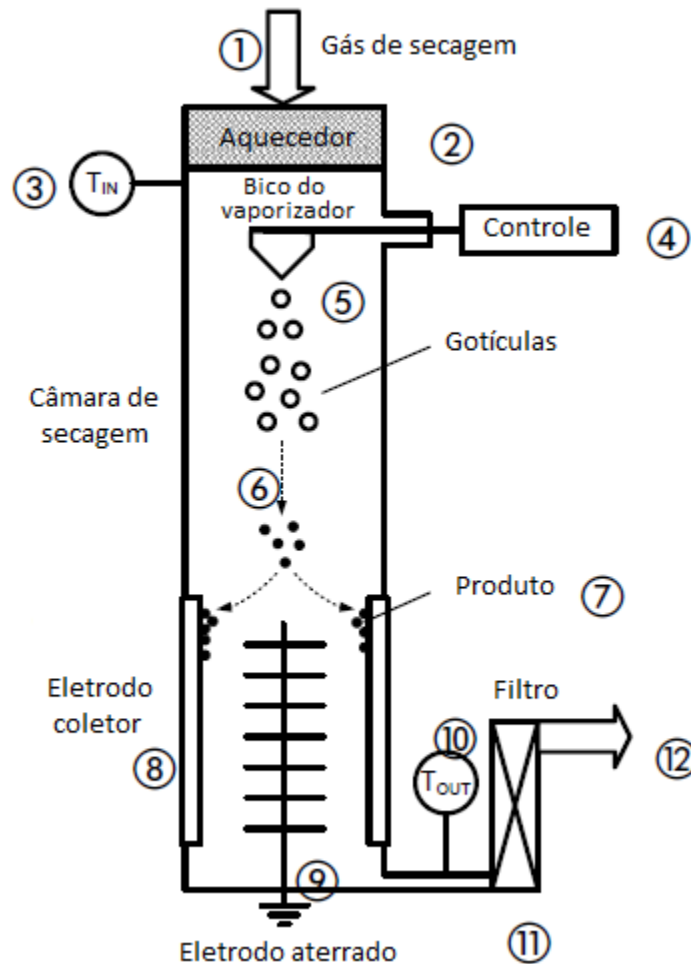
O princípio básico de funcionamento do *spray dryer* é a conversão um líquido (emulsão, solução, suspensão e/ou dispersão) em um material seco, particulado, por meio da atomização do fluxo de alimentação em uma câmara de secagem aquecida (RÉ, 2006). *Spray drying* tem sido utilizado em estudos de tecnologia farmacêutica com a proposta de secagem de materiais sensíveis à temperatura, melhoria de propriedades de fluidez, preparo de grânulos “*free-flowing*” para produção de comprimidos, e melhoria da solubilidade de substâncias pouco solúveis em água (RÉ, 2006).

Neste contexto, foi desenvolvido um novo equipamento que utiliza a técnica de *spray drying* para a produção de nanopartículas, modificando os princípios de atomização e recuperação do material produzido, que pode ser empregado na nanoencapsulação de ativos

de interesses diversos. Nesta nova configuração é possível gerar um material nanoestruturado, com tamanho de partícula entre 0,3 μm e 5 μm . Este procedimento foi concebido baseado na atomização por membranas piezoelétricas, que reduzem o tamanho da gota a ser aspergida. Além disso, o equipamento supera uma limitação da técnica de *spray dryer* que consiste na recuperação de materiais nanoparticulados através da coleta em uma câmara eletrostática. Este recurso permite ainda uma eficiência de no mínimo 90 % do material seco (BUCHI, 2009).

O funcionamento do equipamento está esquematizado na Figura 12. O gás de secagem entra pela parte superior do equipamento, é aquecido até a temperatura escolhida pelo usuário, flui pela câmara de secagem e sai pelo filtro de saída. O líquido da amostra alimenta a bico do spray por bombeamento desde seu reservatório. A geração de gotas é baseada em um sistema piezoelétrico, que faz vibrar uma fina membrana de aço inoxidável perfurada por buracos de tamanho micrométrico (membranas de 4,0, 5,5 e 7,0 μm estão disponíveis). A vibração do sistema é ultrassônica (em torno de 60 kHz), o que faz gerar gotas de tamanhos muito próximos. Estas finas gotas são secas em partículas sólidas enquanto passam pela câmara de secagem, então sofrem força eletrostática e são defletidas para serem coletadas pelo eletrodo coletor. Por fim, a base do equipamento é retirada e o pó de partículas formado é coletado usando uma espátula de borracha (LI, ANTON, *et al.*, 2010).

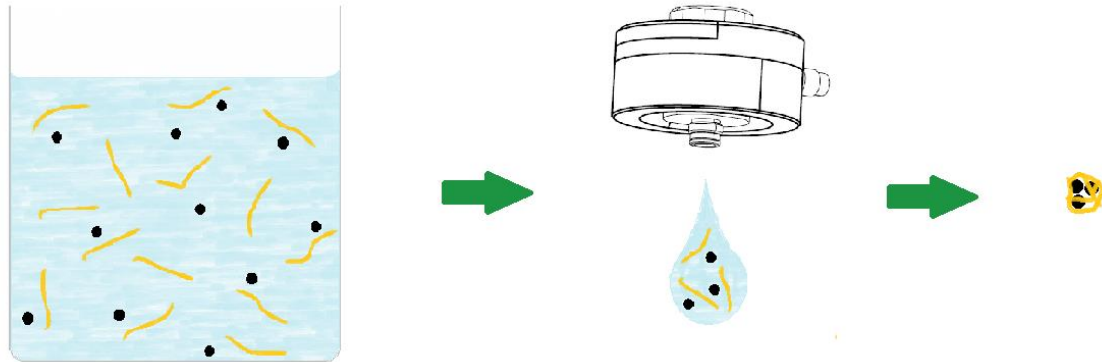
Figura 12 - Esquema do equipamento Nano Spray Dryer. 1: Entrada de gás; 2: Aquecedor elétrico; 3: Sensor de temperatura de entrada; 4: Controle e bico do vaporizador; 5: Gotículas de partículas; 6: Cilindro vaporizador e seção de secagem; 7: Produto final no eletrodo coletor de partículas; 8: Eletrodo coletor de partículas; 9: Eletrodo de alta voltagem; 10: Sensor de temperatura de saída; 11: Filtro de saída; 12: Saída do gás de secagem.



Fonte: Adaptado do manual do equipamento Nano Spray Dryer B-90 (BUCHI, 2009).

O líquido a ser introduzido no Nano Spray Dryer pode conter uma solução, suspensão ou uma emulsão (BUCHI, 2009). Para a encapsulação de partículas, estas devem estar suspensas no líquido, juntamente com a substância encapsulante, um polímero, por exemplo. A gota gerada pelo equipamento é seca pelo gás de secagem, e então é formada a partícula com a nanopartícula envolta pelo encapsulante, como mostra o esquema da Figura 13.

Figura 13 - Esquema de uma suspensão de nanopartículas com polímeros, da formação de uma gota da suspensão pelo Nano Spray Dryer e de uma partícula final formada pela secagem da gota, de nanopartículas envoltas por polímero.



Fonte: autoria própria.

O equipamento Nanospray Dryer B-90 foi desenvolvido e colocado no mercado há apenas 6 anos (em 2009), sendo que a sua aplicação para a nanoencapsulação polimérica é bastante recente. Alguns trabalhos a partir de 2010 apresentam o uso do Nanospray para encapsulação de ativos. Lee et al. descreveram a secagem de nanopartículas de proteínas, mas não contemplando a encapsulação (LEE, HENG, *et al.*, 2011). Marim, et al. descreveram a encapsulação de ingredientes farmacêuticos ativos hidrofílicos (OLIVEIRA, GUIMARÃES, *et al.*, 2013). Haggag e Faheem avaliaram a técnica de nanospray dryer na formulação de peptídeos e proteínas encapsulados (HAGGAG e FAHEEM, 2015). Harsha et al apresentou a encapsulação polimérica de vildagliptin com gelatina (HARSHA, ALDHUBIAB, *et al.*, 2015).

Sendo assim este trabalho teve a finalidade de sintetizar nanopartículas magnéticas de óxido de ferro e empregar a técnica de *nano spray drying* para obtenção de partículas poliméricas magnéticas, visando aplicações biológicas como uma plataforma para *theranostics*. Considerando o potencial de imageamento e terapia por hipertermia magnética das nanopartículas superparamagnéticas encapsuladas com polímeros estas podem ser aplicadas no tratamento e diagnóstico do câncer.

3. Objetivo

Este trabalho tem como objetivos principais a obtenção e caracterização de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas pela técnica de coprecipitação e posterior encapsulação com polímeros, seguida da caracterização das partículas para avaliação do potencial de aplicação no tratamento de câncer por hipertermia. Visando cumprir o objetivo principal, destacam-se os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Obtenção de nanopartículas superparamagnéticas pela técnica de co-precipitação;
- ✓ Caracterização das nanopartículas magnéticas com relação às propriedades físicas (tamanho, morfologia), magnéticas e segurança biológica;
- ✓ Nanoencapsulação das nanopartículas de óxido de ferro empregando diferentes polímeros funcionais de origem natural e/ou sintética, através do processo de secagem por técnica de *nano spray drying*;
- ✓ Caracterização das partículas encapsuladas obtidas quanto às características físicas, de superfície, magnéticas e segurança biológica.

4. Materiais e Métodos

4.1 Materiais

Cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), cloreto ferroso tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich e NH_3 (25%), da Merck. Eudragit[®] S100 da Evonik Industries ($M_w = 125000$), Maltodextrina da Givaudan e Tween 80 (Polissorbato 80) da Mapric Produtos Farmacoscéticos ($M_w = 1310$) também foram utilizados. Policaprolactona da Sigma-Aldrich ($M_w \sim 14000$). Kolliphor[®] P188 (Poloxamer 188) da Sigma-Aldrich ($M_w \sim 8350$). Os reagentes foram utilizados sem mais purificações.

Fibroblastos de camundongo NCTC-929 foram adquiridos do Instituto Adolfo Lutz Institute (São Paulo, Brazil), HeLa (cervix) e HepG2 (hepatoma) foram cedidas por Hemocentro – USP, Ribeirão Preto; meio de cultura DMEM, trypsin-EDTA e PBS foram adquiridos de Sigma, EUA e soro fetal bovino de Invitrogen, EUA.

4.2 Sínteses de óxido de ferro

As sínteses de óxido de ferro foram realizadas aplicando o método de co-precipitação. Este método gera óxidos de ferro (Fe_3O_4 ou $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) a partir de soluções de sais $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ com a adição de base a temperatura ambiente. O tamanho, a forma e a composição das nanopartículas magnéticas dependem dos tipos de sais utilizados (cloretos, sulfetos, nitratos e outros), da temperatura da reação, do pH e da força iônica do meio (LU, SALABAS e SCHUTH, 2007).

Na primeira síntese, realizada com base na literatura (KARAAGAC, KOCKAR, *et al.*, 2010), foram solubilizados 100 mmol (19,89 g) de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 150 mmol (40,55 g) de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 140 mL água destilada e 50 mL de NH_3 foi adicionada gota a gota, em um sistema com agitação mecânica de 300 rpm e aplicação de ultrassom com frequência de 40 kHz constantes. A adição da base durou 5 min e, após mais 40 min de agitação e sonicação, a suspensão foi coletada e lavada 3 vezes com o auxílio de um ímã para separar magneticamente as partículas. Por fim, a amostra foi seca em estufa. Esta amostra foi chamada de “OF-inicial”.

Posteriormente, a síntese foi aperfeiçoada pelo aborbulhamento de nitrogênio à solução. O gás é injetado ao meio de solução desde a preparação da solução FeCl_2 e FeCl_3 , durante o gotejamento da base e até o fim da síntese. Sonicação, agitação mecânica e os outros aspectos foram mantidos como no processo descrito acima. Dessa forma, foram realizadas três sínteses nas quais as concentrações de ferro foram variadas, conforme informa a **Tabela 1**. As três amostras obtidas dessas sínteses foram chamadas de “OF-10/15”, “OF-30/45” e “OF-60/90”, com valores que remetem à quantidade em mmol de FeCl_2 e FeCl_3 , respectivamente, adicionadas à solução. O objetivo da variação das concentrações de ferro era obter tamanhos variados de nanopartículas nas diferentes sínteses.

As sínteses seguintes foram modificadas pela adição de estabilizantes e surfactantes ao meio de solução previamente ao gotejamento da base. Elas utilizaram as mesmas concentrações e condições físicas da síntese de OF-10/15. Foram utilizados Pluronic F68 para sintetizar OF-10/15-4P e OF-10/15-1P, Eudragit S100 para OF-10/15-1E e Tween 80 para OF-10/15-1T. As três últimas amostras não foram secas em estufa.

Tabela 1 - Descrição das sínteses de nanopartículas de óxido de ferro. Concentrações prévias ao gotejamento da base.

Nome	Massa de reagente			Volume de solução	Concentração de reagente			N ₂	Seca em Estufa
	FeCl ₂ . 4H ₂ O	FeCl ₃ . 6H ₂ O	Surfactante		FeCl ₂ . 4H ₂ O	FeCl ₃ . 6H ₂ O	Surfactante		
OF-inicial	19,86 g	40,69 g	Não	100 mL	1 mol/L	1,5 mol/L	Não	Não	Sim
OF-10/15	1,99 g	4,05 g	Não	200 mL	5 . 10 ⁻² mol/L	7,5 . 10 ⁻² mol/L	Não	Sim	Sim
OF-30/45	5,967 g	12,16 g	Não	200 mL	15 . 10 ⁻² mol/L	22,5 . 10 ⁻² mol/L	Não	Sim	Sim
OF-60/90	11,93 g	24,33 g	Não	200 mL	30 . 10 ⁻² mol/L	45 . 10 ⁻² mol/L	Não	Sim	Sim
OF-10/15-4P	1,99 g	4,05 g	Pluronic F68 - 3,984 g	200 mL	5 . 10 ⁻² mol/L	7,5 . 10 ⁻² mol/L	Pluronic F68 – 2,4.10 ⁻³ mol/L	Sim	Sim
OF-10/15-1P	1,99 g	4,05 g	Pluronic F68 - 1,0 g	200 mL	5 . 10 ⁻² mol/L	7,5 . 10 ⁻² mol/L	Pluronic F68 – 6,0.10 ⁻⁴ mol/L	Sim	Não
OF-10/15-1E	1,99 g	4,05 g	Eudragit S100 - 1,0 g	200 mL	5 . 10 ⁻² mol/L	7,5 . 10 ⁻² mol/L	Eudragit S100- 8,0.10 ⁻⁶ mol/L	Sim	Não
OF-10/15-1T	1,99 g	4,05 g	Tween 80 – 1,0 g	200 mL	5 . 10 ⁻² mol/L	7,5 . 10 ⁻² mol/L	Tween 80 – 7,2.10 ⁻⁴ mol/L	Sim	Não

4.3 Encapsulações

As nanopartículas de óxido de ferro foram encapsuladas utilizando o equipamento Nano Spray Dryer B-90, da BUCHI, apresentado na Figura 14, no Núcleo de Bionanomanufatura do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT). Foram utilizadas suspensões de nanopartículas de magnetita com os polímeros, introduzidas como fluido de alimentação do Nano Spray Dryer. Então o equipamento foi acionado para a secagem da suspensão com os parâmetros (temperatura, fluxo de gás, entre outros) definidos pelo usuário e, por fim, o pó de nanopartículas foi coletado.

Figura 14 - Foto do equipamento Nano Spray Dryer B-90 utilizado para encapsulação.



Fonte: autoria própria.

Para a primeira encapsulação, foram pesados 0,2 g de OF-inicial, 1 g de Tween 80 e 1 g de Maltodextrina. OF-inicial foi dispersa em 100 mL de água sob aplicação de ultrassom. Então foram adicionados Tween 80 e Maltodextrina e a dispersão foi novamente submetida a ultrassom e homogeneização por Turrax®. Por fim, a suspensão foi introduzida ao Nano Spray Dryer com agitação mecânica contínua. Esta amostra foi chamada de Malto.

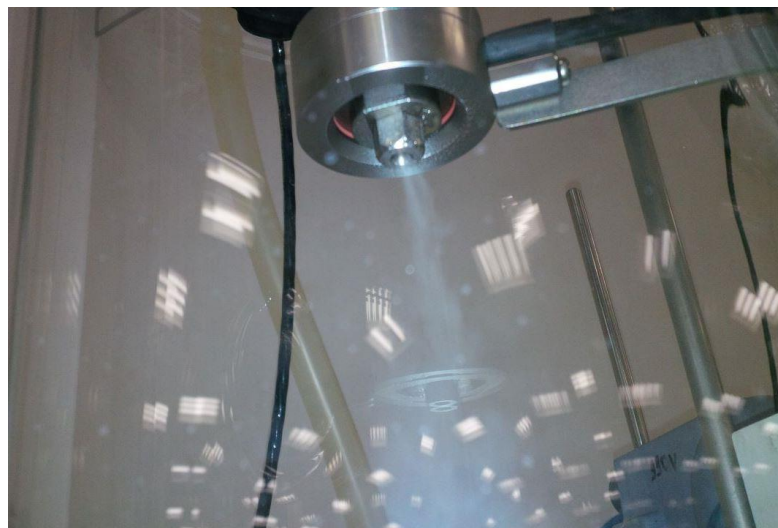
Na segunda encapsulação foi utilizado o polímero Eudragit® S100. Foi preparada suspensão de 100 mL de água com 0,01 g de OF-inicial e depois foi adicionado 0,1 g de Eudragit® S100. Neste caso, foi necessário adicionar aproximadamente 1mL de NaOH (1 M) para solubilizar o Eudragit®. Esta amostra foi chamada de Eudra. O mesmo procedimento utilizado com Malto, de sonicação da suspensão, homogeneização por Turrax® e agitação mecânica contínua durante a secagem foi seguido para esta e as demais amostras.

Para as terceira e quarta encapsulações, foram preparados dois tipos de suspensão com PCL, Pluronic F68 e nanopartículas OF-30/45 em acetona, variando as proporções dos polímeros. A primeira foi chamada de “PCL 1.5” e teve 0,2 g de 30/45, 1,5 g de PCL e 0,5 g de Pluronic F68 para 100 mL de acetona. A segunda foi “PCL 1.0” e teve 0,2 g de 30/45, 1,0 g de PCL e 1,0 g de Pluronic F68 para 100 mL de acetona. Nestes dois casos, foi necessário filtrar a suspensão para separar aglomerados de óxido de ferro.

Nas quinta e sexta secagens por *nano spray drying*, a suspensão de nanopartículas foi utilizada diretamente após serem sintetizadas, sem serem secas em estufa e sem mais adições de polímeros. As amostras OF-10/15-1P e OF-10/15-1E foram introduzidas ao Nano Spray Dryer com aproximadamente 0,8 g de material a cada 100 mL de água.

Para a sétima amostra, OF-10/15-3E, também foi utilizado o óxido de ferro OF-10/15-1E, mas com adição de mais polímero. A aproximadamente 0,4 g de OF-10/15-1E em 100 mL de água foi adicionado 0,4 g de Eudragit® S100. Para a oitava amostra, OF-10/15-3MT, foi utilizado aproximadamente 0,2 g de OF-10/15-1T em 100 mL, com adição de 0,4 g de Tween 80 e 0,4 g de Maltodextrina.

Figura 15 - Detalhe das gotas da dispersão de nanopartículas sendo secas após passarem pela membrana do Nano Spray Dryer B-90.



Fonte: autoria própria.

As condições de secagem das nanopartículas em meio dispersante de água foram: Temperatura de entrada: 120°C, Temperatura de saída: 54°C, atomização da membrana

piezoelétrica: 100%, temperatura do bico: 120°C; pressão: 70 mbar, fluxo de gás: 130 L/min. Finalmente, o particulado gerado foi coletado no compartimento eletrostático.

Quando o meio dispersante foi acetona, teve de ser empregado o módulo do Nano Spray Dryer para secagem de solvente orgânico, no qual é obrigatório manter um ambiente com baixa concentração de O₂ dentro do equipamento. Portanto, a secagem foi feita em sistema fechado, com injeção de N₂ e CO₂, mantendo a concentração de O₂ abaixo de 4 %. A temperatura também deve ser menor, pois a temperatura de ebulição da acetona é menor que da água. Os parâmetros de secagem para PCL 1.5 e PCL 1.0 foram: temperatura de entrada: 65 °C, temperatura de saída: 44 °C, atomização da membrana piezoelétrica: 100%, temperatura do bico: 65 °C, Pressão: 70 mbar, fluxo de gás: 120 l/min.

Malto e Eudra foram secas utilizando membranas com aberturas de 4,0 µm. As demais amostras utilizaram membranas de 5,5 µm. As proporções de reagentes, os meios dispersantes, as membranas utilizadas e as temperaturas de secagem para cada amostra estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição das partículas encapsuladas por Nano Spray Dryer, com os reagentes, solventes e membranas utilizados. As massas de reagente são para cada 100 mL de solvente.

Amostra	Reagentes	Dispersante	Membrana	Temperatura
Malto	0,2 g de OF-inicial 1,0 g de Maltodextrina 1,0 g de Tween 80	Água	4,0 µm	120 °C
Eudra	0,01 g de OF-inicial 0,1 g de Eudragit®S100	Água	4,0 µm	120 °C
PCL 1.0	0,2 g de OF-30/45 1,0 g de PCL 1,0 g de Pluronic F68	Acetona	5,5 µm	65 °C
PCL 1.5	0,2 g de OF-30/45 1,5 g de PCL 0,5 g de Pluronic F68	Acetona	5,5 µm	65 °C
OF-10/15-1P	0,8 g OF-10/15-1P	Água	5,5 µm	120 °C
OF-10/15-1E	0,8 g de OF-10/15-1E	Água	5,5 µm	120 °C
OF-10/15-3E	0,4 g de OF-10/15-1E 0,4 g de Eudragit®S100	Água	5,5 µm	120 °C

	0,2 g de OF-10/15-1T			
OF-10/15-3MT	0,4 g de Maltodextrina	Água	5,5 μm	120 °C
	0,4 g de Tween 80			

4.4 Caracterizações

Nesta seção, os métodos utilizados para as caracterizações por Difração de Raios-X, Espalhamento de Luz Dinâmico, Microscopia Eletrônica de Varredura, Análise Termogravimétrica e medidas magnéticas estão descritos.

4.4.1 Difração de Raios-x

A difratometria de raios-x (DRX) foi realizada para avaliar a composição e a organização estrutural das nanopartículas de óxido de ferro. Com esta técnica se mede a intensidade (I) de um feixe de raios-X em função do ângulo de espalhamento (2θ) após interação com material a ser analisado. De acordo com a Lei de Bragg, é formado um conjunto de picos de difratometria relacionados aos planos cristalográficos característicos para diferentes reticulados cristalinos. A análise das nanopartículas foi realizada em um difratômetro de raios-X da Shimadzu (Shimadzu Corporation Japan Ltd.), modelo XRD-6000, no Núcleo de Bionanomanufatura do IPT com a colaboração da pesquisadora Dra. Catia Fredericci. Foram utilizadas fontes de radiação de $\text{CuK}\alpha$ e de $\text{CoK}\alpha$, com comprimentos de onda de 1,542 Å e 1,789 Å, respectivamente. Os valores de tensão e corrente para operação do equipamento foram respectivamente fixados em 40,0 kV e 30,0 mA. As amostras de óxido de ferro puras foram maceradas previamente com um pistilo em um almofariz, até formarem pós finos convenientes para o experimento. As varreduras de ângulos foram feitas entre 10° e 80° e entre 20° e 80°, dependendo do caso, com velocidade angular de avanço de 0,5°/min e passo de 0,02°.

4.4.2 Espalhamento de Luz Dinâmico

Foram realizadas medidas de tamanho de partícula por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) pelos equipamentos Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) e Delsa™ Nano Series (Beckman Coulter GmbH). As partículas foram dispersas em água, com aplicação de ultrassom. Parte da dispersão foi inserida na cubeta apropriada e posicionada no equipamento para realização das medidas. As medidas foram realizadas em triplicata.

4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia e o tamanho das partículas foram verificados através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), por microscópio de alta resolução (SEM-FEG) da marca FEI, modelo Quanta 3D no IPT, exceto pela amostra OF-10/15-3MT. A preparação das amostras consistiu de sua deposição em fita de adesiva de cobre colada em um suporte. As amostras foram recobertas com metalização por camada de ouro.

Para a amostra OF-10/15-3MT, foi utilizado por microscópio da marca LEO, modelo 440, com um detector Oxford (Oxford Instruments Inc.), situado no IQSC. A amostra foi recoberta com carbono.

Análises das imagens obtidas foram realizadas com software ImageJ, versão 1.48v.

4.4.4 Análise Termogravimétrica

A curva TG da amostra Eudra foi obtida através da termobalança TGA/DSC 1 da Mettler Toledo. As condições experimentais empregadas foram: razão de aquecimento de 10 °C/min, de 25 °C até 1000 °C; atmosfera dinâmica de nitrogênio com vazão de 80 mL/min; cadinho de alumina aberto, com entre 5 a 20 mg de amostra.

4.4.5 Espectroscopia de Infravermelho

Os espectros de infravermelho por transformada de Fourier foram obtidos em um equipamento Shimadzu IRAffinity-1, entre comprimentos de onda de 400 e 4000 cm^{-1} . As amostras foram maceradas com KBr e prensadas para formar pastilhas, que foram introduzidas ao equipamento para medida.

4.4.6 Medidas magnéticas

As medidas de magnetização foram realizadas em equipamento Cryogenic S600 SQUID Magnetometer, com a colaboração da equipe do Prof. Valmir Chita do Laboratório de Estado Sólido e Baixas Temperaturas do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IF-USP).

Para determinar a magnetização de saturação e o perfil magnético das partículas em função de um campo magnético externo DC, foram realizadas medidas às temperaturas fixas

de 300 K e de 2 K, variando-se o campo de -65 kOe até +65 kOe (Oersted, unidade eletromagnética em sistema CGS, usada para campos magnéticos auxiliares).

A determinação da Temperatura de Bloqueio (T_B) foi realizada através de procedimento */zero-field-cooling/field-cooling/(ZFC/FC)*. Brevemente, para a obtenção da curva ZFC a amostra foi resfriada até 1,7 K em um campo magnético nulo. Então um pequeno campo magnético de 150 Oe foi aplicado e a magnetização foi registrada durante o aquecimento da amostra. A temperatura de pico da curva ZFC é a T_B . Para a obtenção da curva FC, a amostra foi resfriada até 2 K sob campo de 150 Oe, e depois sua magnetização foi medida, mantendo-se o campo magnético aplicado, durante o aquecimento.

4.4.7 Testes de citotoxicidade

A avaliação citotóxica das nanopartículas foi realizada por monitoramento de ensaio de absorção do vermelho neutro (Neutral Red Uptake – NRU) usando células de fibroblasto de camundongo NCTC-929 e células tumorais Hela de Cervix Adenocarcinoma e HepG2 de Hepatocellular Carcinoma (100 μ L; 1×10^5 cells/mL) encubadas em placas de microlitro com 96 poços e deixadas para aderir por 24 h. No dia seguinte, o meio foi removido dos poços e as células foram expostas às partículas magnéticas com concentrações de 10,08 mg/mL, 5,04, 2,52, 1,26, 0,63, 0,32, 0,16 e 0,08 mg/mL, dispersas em PBS durante 30 min em banho de ultrassom e diluídas em meio completo com 5 % de FBS (100 μ L/poço). Após exposição de 24 horas, o meio foi removido com meio completo com 5 % de FBS contendo corante vermelho neutro (1 mg/mL). As placas foram incubadas por mais 3 horas. Então o meio foi removido e após a extração do corante usando etanol/ácido acético/água (50%/1%/49%) a absorbância foi medida em 540 nm em espectrofotômetro (Titertek Multiskan plate, EUA). Medidas de absorbância das células expostas somente ao meio foram consideradas como 100 % de viabilidade (i.e. controle negativo). O efeito no crescimento celular foi calculado pela absorbância relativa ao controle não tratado em 540 nm. O ensaio de citotoxicidade foi realizado no Núcleo de Bionanomanufatura do IPT com a colaboração da pesquisadora Dra. Patricia Leo.

4.4.8 Potencial de aquecimento

Para verificar o potencial de aquecimento das nanopartículas visando sua aplicação no tratamento de câncer por hipertermia, foi utilizado o equipamento Magnetherm™, da empresa Nanotherics, situado no Laboratório do Grupo de Materiais Coloidais do IQSC, cedido para uso pelo Prof. Dr. Laudemir Varanda. O equipamento gera um campo magnético alternado e mede a alteração de temperatura produzida por suspensões de partículas.

Foram preparadas suspensões de 2 mL de água com diferentes concentrações das amostras, em tubos de eppendorf. Os tubos foram posicionados dentro de uma cápsula de isopor que fica posicionada no interior da bobina geradora do campo magnético. Um termômetro de fibra óptica foi introduzido na amostra de forma a ter sua ponta posicionada aproximadamente na metade vertical da suspensão. Então, foi ligado o campo magnético de frequência 112 kHz e amplitude de 25 mT pico-a-pico, e sua temperatura foi acompanhada através do software do equipamento.

5. Resultados e Discussão

Para desenvolvimento das nanopartículas magnéticas encapsuladas com polímeros, foram realizadas as etapas de preparação das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, caracterização destas partículas e posteriormente, encapsulação das nanopartículas magnéticas por *nano spray drying* com caracterização das partículas obtidas.

5.1 Síntese e caracterizações das nanopartículas de óxidos de ferro

A síntese das nanopartículas magnéticas consistiu em empregar um processo de coprecipitação previamente descrito na literatura (KARAAGAC, KOCKAR, *et al.*, 2010), conforme condições experimentais citadas no item 4 (metodologia). A síntese de óxido de ferro por coprecipitação resultou na geração de um pó preto, cor característica da magnetita, como pode ser observado na Figura 16. Com o tempo, as amostras não encapsuladas passam a ter um tom marrom, característico da maghemita, devido a oxidação (CORNELL e SCHWERTMANN, 2004).

As amostras de óxido de ferro foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Difração de Raios-X (DRX), Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR), citotoxicidade, por magnetização quanto ao campo externo e à temperatura e por potencial de aquecimento.

Figura 16 - Pó de nanopartículas de óxido de ferro, da amostra OF-30/45.



Fonte: autoria própria.

5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras de óxido de ferro OF-inicial, OF-10/15, OF-30/45 e OF-60/90 foram submetidas a microscopia eletrônica de varredura para verificação do tamanho e da morfologia das nanopartículas. Com o auxílio do software ImageJ, os tamanhos de 30 nanopartículas por amostra foram medidos, sendo que alguns deles foram registrados na própria imagem e a média desses valores foi calculada. Este valor médio de tamanho é uma estimativa que tem suas limitações, pois as resoluções das imagens de MEV não apresentam ótima resolução, o que dificulta a medida das nanopartículas menores, e é baseada em apenas uma amostragem do conjunto total de nanopartículas da amostra.

As nanopartículas da amostra OF-inicial, apresentadas na Figura 17, têm forma aparentemente esférica, de tamanho médio de 21,1 nm. OF-10/15, na Figura 18, tem nanopartículas de forma variada e a forte agregação dificulta sua visualização individual; o tamanho médio registrado foi de 19,5 nm. Na Figura 19, da amostra OF-30/45, o diâmetro médio foi de 25,0 nm. Na amostra OF-60/90, na Figura 20, verifica-se nanopartículas de diâmetro variado, com média de 30,6 nm.

Figura 17 - Imagem de MEV da amostra OF-inicial, com aumento de 150 mil vezes.

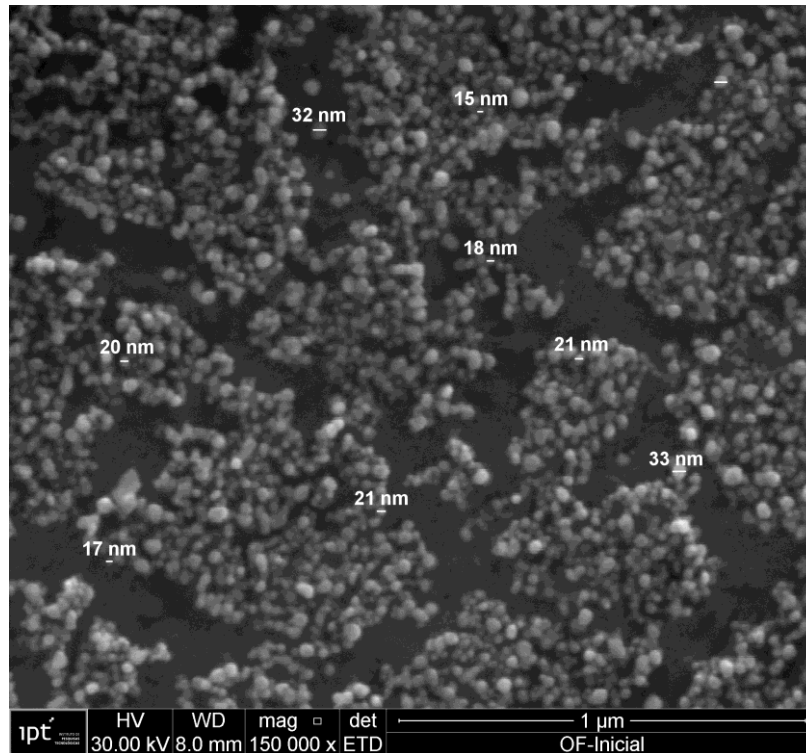


Figura 18 - Imagem de MEV da amostra OF-10/15, com aumento de 150 mil vezes.

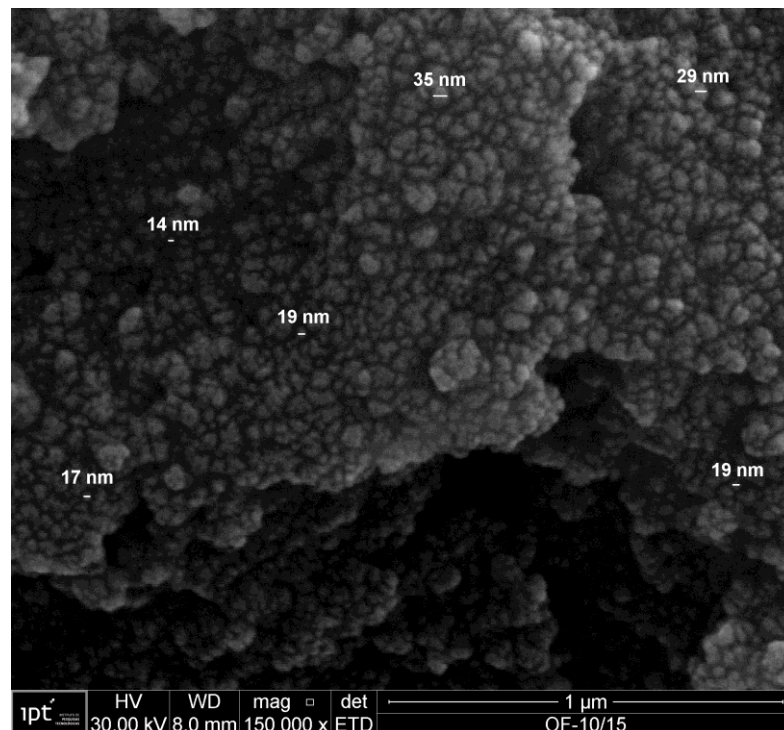


Figura 19 - MEV da amostra OF-30/45, com aumento de 100 mil vezes.

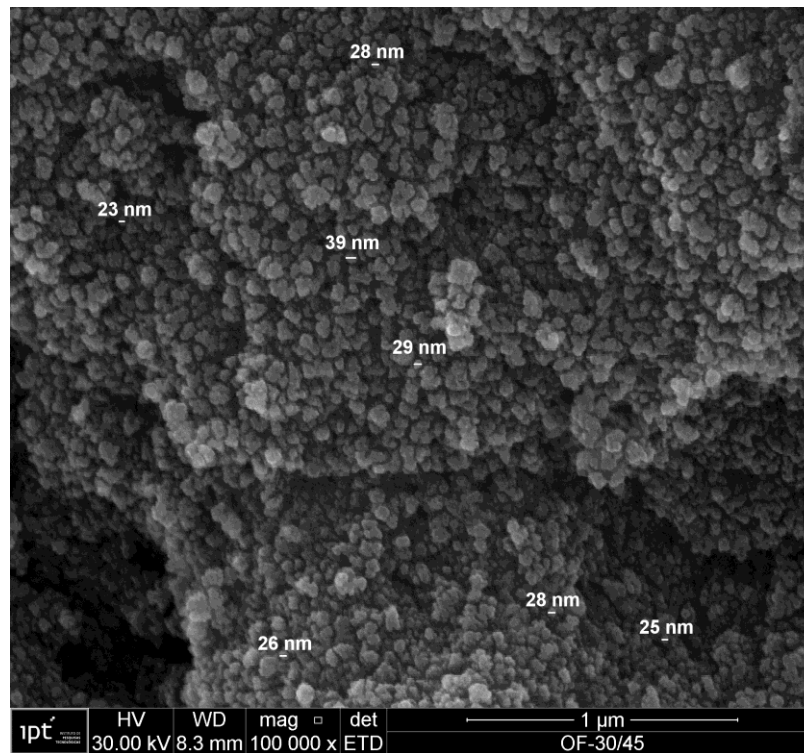
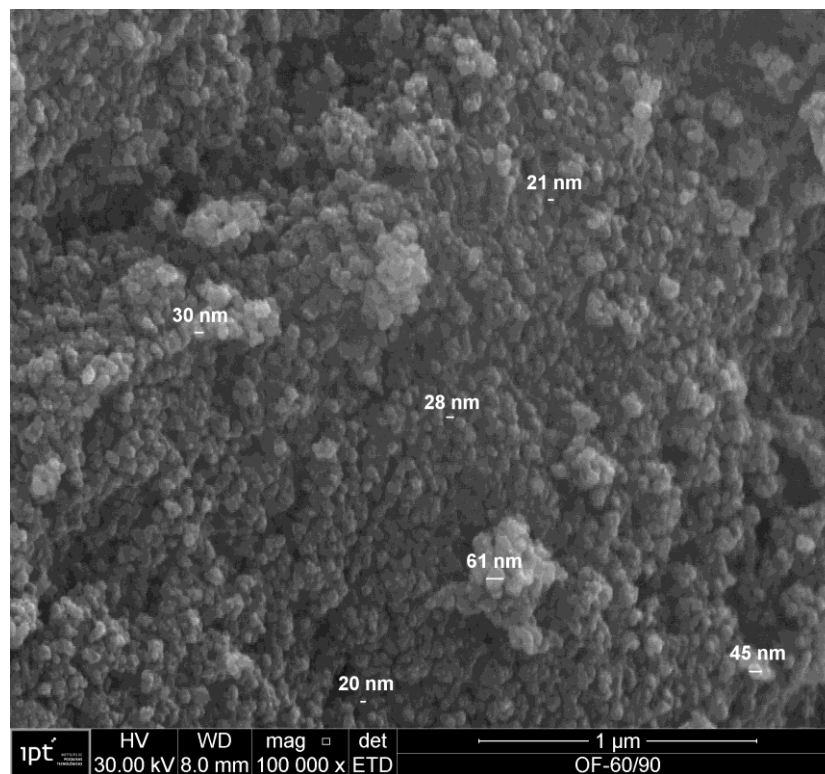


Figura 20 - MEV da amostra OF-60/90, com aumento de 100 mil vezes.



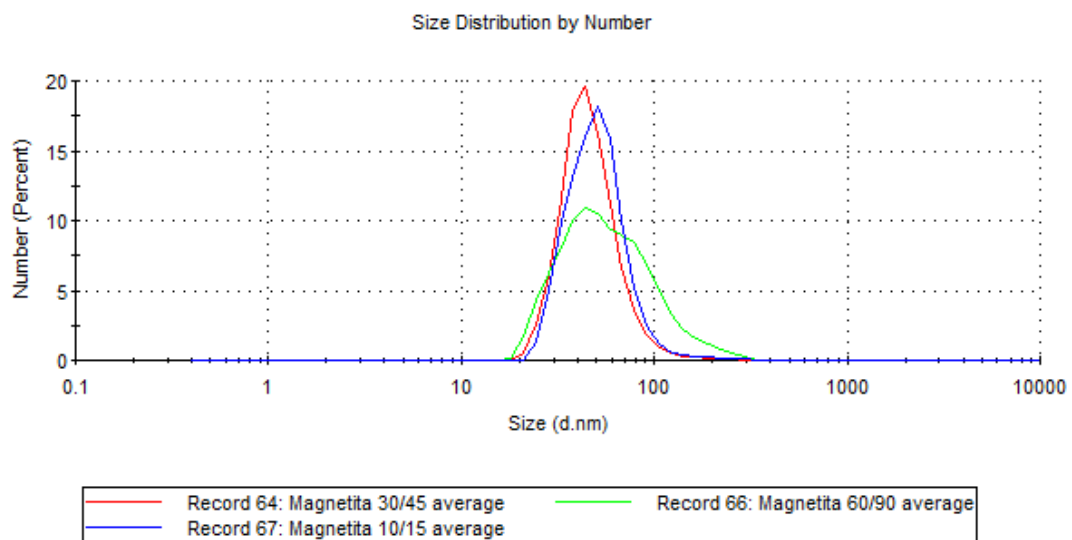
OF-10/15, OF-30/45 e OF-60/90 passaram por métodos de síntese que só diferiram na concentração de ferro em solução, crescente na ordem acima, portanto podem ser

comparadas. A estimativa de tamanho, maior para OF-60/90 e menor para OF-10/15, está de acordo com o previsto em literatura (KARAAGAC, KOCKAR, et al., 2010), que relaciona diretamente os tamanhos das nanopartículas com o aumento da concentração dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} na síntese.

5.1.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Os tamanhos hidrodinâmicos das partículas provenientes das sínteses de óxido de ferro foram medidos por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS). As amostras foram dispersas em água e a suspensão de nanopartículas foi submetida a aplicação de ultrassom. As medidas foram obtidas através equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern), cujo software apresenta como resultado a distribuição de tamanho apresentada na Figura 21, além dos valores de diâmetros principais, diâmetro médio e índice de polidispersividade.

Figura 21 - Resultado de medida de tamanho por DLS em distribuição por número, apresentado pelo Zetasizer Software. Comparação das medidas das amostras 10/15, 30/45 e 60/90.



Nota-se na Figura 21 que as curvas de distribuição de tamanho apresentam picos principais em torno de 50 nm, porém os diâmetros médios calculados ficam entre 155 e 213 nm, como mostra a Tabela 3. Partículas de óxido de ferro não encapsuladas e sem modificação de superfície possuem forte tendência a agregação. O equipamento registra o tamanho dos possíveis aglomerados de nanopartículas, e não o tamanho das partículas individualmente. A aplicação de ultrassom e à suspensão de nanopartículas e uma escolha apropriada do meio dispersante ajudam na quebra dos aglomerados, porém dificilmente são suficientes para uma dispersão completa das nanopartículas. Portanto, não se pode inferir o tamanho individual

das nanopartículas pela medida de DLS. No entanto, o resultado pode indicar como as amostras se comportam em uma suspensão em dispersante aquoso, o que é uma informação igualmente importante.

Tabela 3 - Diâmetros hidrodinâmicos médios das nanopartículas de óxido de ferro, medidos por DLS.

Amostra	Diâmetro principal	Diâmetro médio	Índice de Polidispersividade (Pdi)	Diâmetro médio por MEV
OF-inicial	59,24 nm	170,8 nm	0,270	21,1 nm
OF-10/15	53,16 nm	213,0 nm	0,496	19,5 nm
OF-30/45	48,97 nm	155,4 nm	0,323	25,0 nm
OF-60/90	64,96 nm	164,2 nm	0,251	30,6 nm

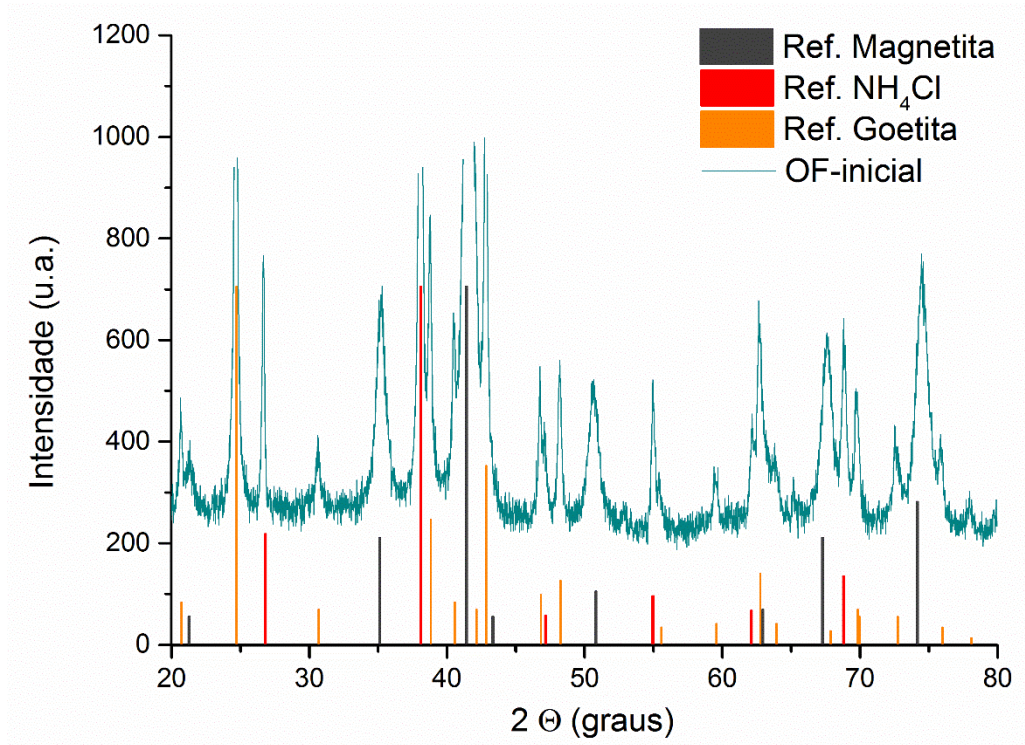
O resultado bruto obtido pelo equipamento de DLS é o espalhamento de luz causado pelas nanopartículas em suspensão. Através disso, é obtida a distribuição de tamanho por intensidade. Partículas grandes espalham muito mais luz do que partículas pequenas (o espalhamento de uma partícula é proporcional à sexta potência de seu diâmetro, de acordo com a aproximação de Rayleigh (MALVERN INSTRUMENTS LTD., 2013). Caso a distribuição por intensidade fosse escolhida, o resultado obtido estaria muito mais relacionado ao diâmetro dos grandes aglomerados do que das partículas em si. Portanto, foi analisada a distribuição por número, na qual o resultado passa cálculos que visam ponderar a magnitude de espalhamento para fornecer uma distribuição de tamanho mais fiel a realidade.

Os resultados das medidas não mostram uma correlação direta do tamanho das nanopartículas de acordo com a concentração dos reagentes Fe^{2+} e Fe^{3+} , como verificado por microscopia. A agregação e a interação das nanopartículas com a água tornaram os tamanhos hidrodinâmicos das amostras semelhantes.

5.1.3 Difração de raios-x

O espectro de difração de raios-x da amostra “OF-inicial” está retratado na Figura 22. Era esperado que a síntese produzisse magnetita. Ao analisar o espectro, nota-se que há picos referentes a estrutura da magnetita relatados pela literatura, porém há outros picos que não são referentes ao espectro de um óxido de ferro. Ao comparar com a base de dados do equipamento, identifica-se que tais picos são referentes aos espectros de FeO(OH) (goetita) e NH_4Cl (cloreto de amônio).

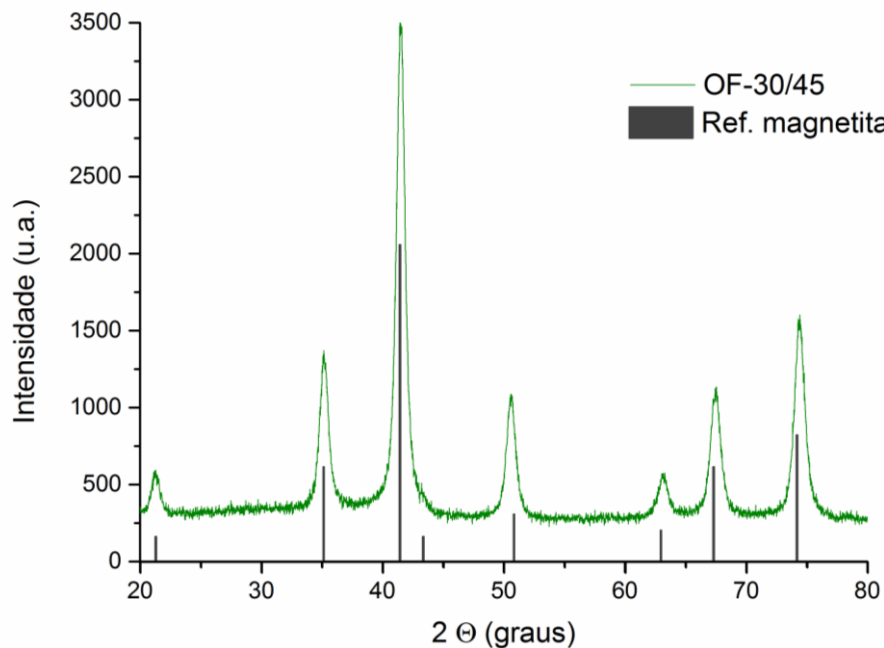
Figura 22 - Espectro de difração de raios-x da amostra OF-inicial, comparada aos espectros de referência de magnetita, goetita e NH_4Cl .



A presença de NH_4Cl pode ser devida a formação deste produto na reação de síntese. No entanto, a presença desta espécie é um problema, visto que é um material não-magnético que não contribui para a aplicação biológica, além de produzir diferenças de pH e possível toxicidade. Este resultado apontou que a parte final da síntese, na qual as partículas de óxido de ferro foram separadas do meio aquoso por atração magnética e lavagens com água destilada, deveria ser aperfeiçoada para realmente excluir o NH_4Cl do produto final.

Na Figura 23 está o espectro da amostra OF-30/45, por fonte de cobalto. Verifica-se que os picos da amostra apresentam os mesmos ângulos de incidência (ou os valores de 2θ) que os picos do espectro de magnetita da literatura. Os outros picos vistos no espectro da amostra OF-inicial não aparecem neste caso. Tal espectro indica que a amostra é composta por magnetita, e que as mudanças entre as sínteses (abornbulhamento de N_2 e centrifugação do produto obtido) funcionaram para a obtenção do produto final desejado. Na síntese da amostra OF-inicial a separação magnética aparentemente arrastava junto o resíduo de NH_4Cl ; nas sínteses posteriores, o procedimento de centrifugação aplicado se mostrou mais eficiente. O abornbulhamento de nitrogênio no meio de reação evitou a oxidação que promove o surgimento de outros óxidos de ferro durante a síntese.

Figura 23 - Espectro de difração de raios-x da amostra OF-30/45 e comparação com a ficha de magnetita da literatura, para fonte de $\text{CoK}\alpha$.



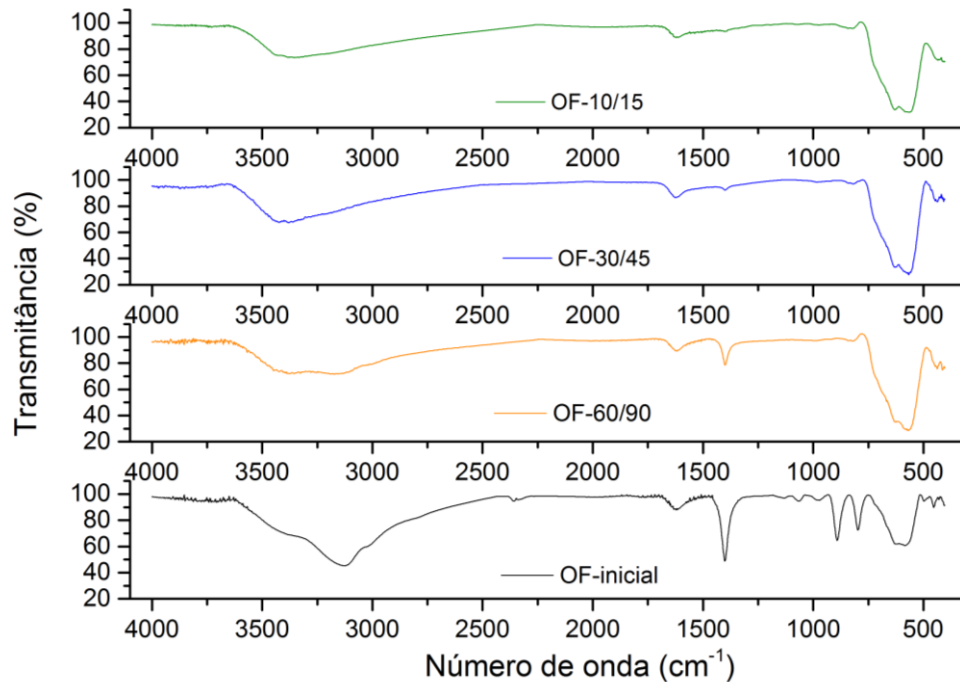
Os picos apresentados pela amostra OF-30/45 nos ângulos $2\theta \sim 21,3^\circ, 35,1^\circ, 41,4^\circ, 50,6^\circ, 63,3^\circ, 67,5^\circ$ e $74,4^\circ$ são os principais apresentados pela magnetita dentro do intervalo experimental (20° a 80°), para uma fonte de raios-x de $\text{CoK}\alpha$. Tais picos são referentes aos planos 111, 220, 311, 533, 400, 422, 511, respectivamente, da estrutura espinela inversa da magnetita (CORNELL e SCHWERTMANN, 2004).

O espectro da amostra OF-10/15 também foi obtido, com fonte de cobre. O resultado foi o mesmo, apenas com a diferença na localização dos picos devido a mudança da fonte de raios-x.

5.1.4 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de infravermelho são gráficos do percentual de radiação transmitida através das amostras (total de radiação irradiada subtraída pela radiação absorvida pela amostra) pela frequência da radiação incidente, dada em número de onda (cm^{-1}). O uso da Transformada de Fourier permite um aumento de sensibilidade e resolução ao criar médias de um grande número de espectros. A Figura 24 apresenta os espectros das amostras resultantes das sínteses de ferro OF-inicial, OF-10/15, OF-30/45, OF-60/90.

Figura 24 - Espectros de FTIR das amostras OF-10/15, OF-30/45, OF-60/90 e OF-inicial.



O espectro característico da magnetita apresenta bandas em 400 e 580 cm^{-1} devido a ligação Fe-O, como ocorre nos quatro espectros. A banda em torno de 620 cm^{-1} indica a presença também de maghemita, possivelmente devido a oxidação das superfícies das nanopartículas. As bandas em 1633 e 3400 cm^{-1} podem ser atribuídas a vibrações de estiramento de grupos hidroxila na superfície das nanopartículas (PETCHAROEN e SIRIVAT, 2012).

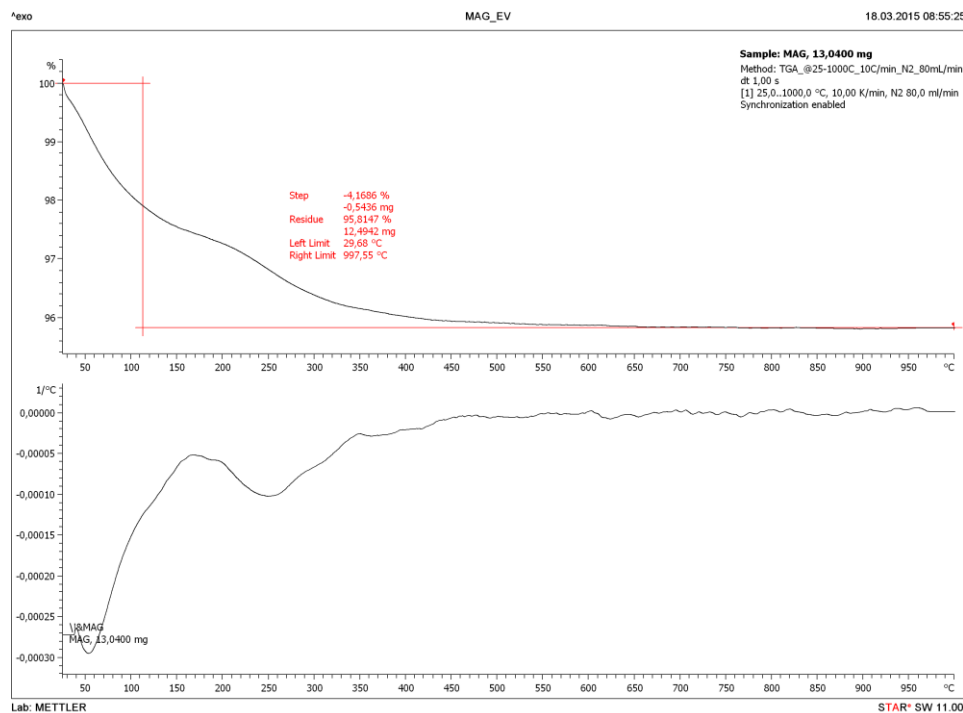
OF-inicial apresenta bandas em 892 e 795 cm^{-1} referentes a vibrações de grupos OH de goetita (CORNELL e SCHWERTMANN, 2004). As bandas em 3200 e 1425 cm^{-1} , presentes no espectro de OF-inicial e em menor intensidade em OF-60/90 provêm das ligações N-H do NH_4^+ (QING QU, 2015), resíduo da reação. Em OF-30/45 e OF-10/15, a banda de 1425 cm^{-1} é muito discreta, indicando que o resíduo foi praticamente eliminado pelo processo de centrifugação.

5.1.5 Análise Termogravimétrica

A Análise Termogravimétrica é uma ferramenta poderosa para a determinação quantitativa dos constituintes de uma amostra através da análise do seu perfil térmico. No experimento, a massa de cada amostra foi monitorada enquanto a temperatura foi aumentada desde 25 °C até 1000 °C.

O gráfico obtido para a amostra OF-10/15 está retratado na Figura 25. Até 150 °C, a amostra perde em torno de 2 % de massa, que tem relação com a água adsorvida em sua estrutura. Depois, até aproximadamente 600 °C a massa diminui até 95,8 % da massa inicial, devido à perda de massa de possíveis resíduos da reação. Os óxidos de ferro não são degradados até 1000 °C, portanto o resíduo da análise pode ser atribuído essencialmente à massa de óxido de ferro presente na amostra.

Figura 25 - Análise Termogravimétrica da amostra OF-10/15, de 25 a 1000 °C.



Os espectros de TGA das outras amostras de óxido de ferro são similares ao da OF-10/15. Apenas OF-inicial tem uma perda de massa maior referente a presença de subprodutos da reação, como indicado por DRX e FT-IR. Os resíduos da análise de TGA das quatro amostras de óxido de ferro estão descritos pela Tabela 4.

Análises de TGA de magnetita em presença de oxigênio geralmente apresentam aumento de massa devido a oxidação em maghemita (VERGES, COSTO, et al., 2008). Os experimentos aqui apresentados foram realizados em atmosfera de nitrogênio. Uma possibilidade seria a realização dos ensaios em atmosfera de oxigênio para verificar a presença de outros óxidos. Esta análise pode ser realizada em atividades futuras. Todavia, mesmo em atmosfera de oxigênio, talvez não vissemos pico referente a este fenômeno provavelmente

devido às prévias oxidações sofridas pela amostra OF-inicial (como sugere seu espectro de difração) e à interferência dos picos de degradação do polímero.

Tabela 4 - Resíduos das análises termogravimétricas das amostras de óxido de ferro, de 25 a 1000 °C.

Amostra	Resíduo
OF-inicial	67,2 %
OF-10/15	95,8 %
OF-30/45	96,4 %
OF-60/90	94,9 %

5.1.6 Medidas magnéticas em função do campo externo H

Os perfis magnéticos das amostras de óxido de ferro foram avaliados ao submetê-las a um campo magnético externo DC de magnitude variada (campo H). As curvas obtidas estão apresentadas pelas Figura 26 e Figura 27, sendo que na primeira as medidas foram realizadas a 300 K e na segunda, a 1,7 K. A magnetização é dada em emu (emu é a unidade eletromagnética do sistema CGS) dividido pela massa em g de amostra, enquanto que o campo H é dado em kOe (quilo Oersted, medida de campo magnético auxiliar).

Figura 26 - Medidas de magnetização M (emu/g) versus campo magnético H (kOe), a 300 K.

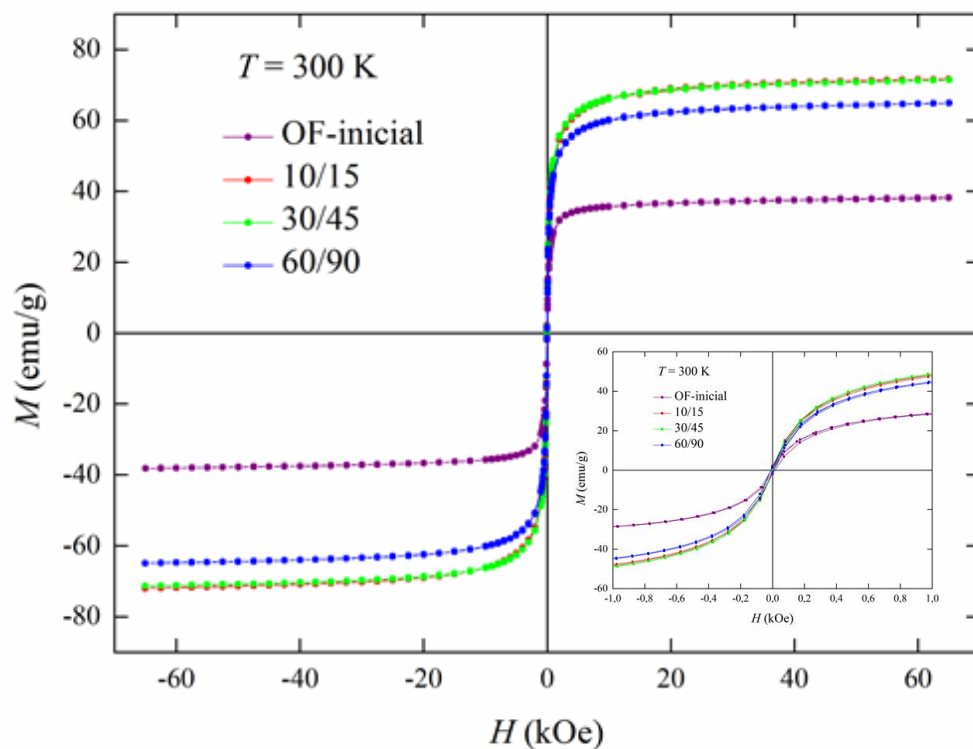
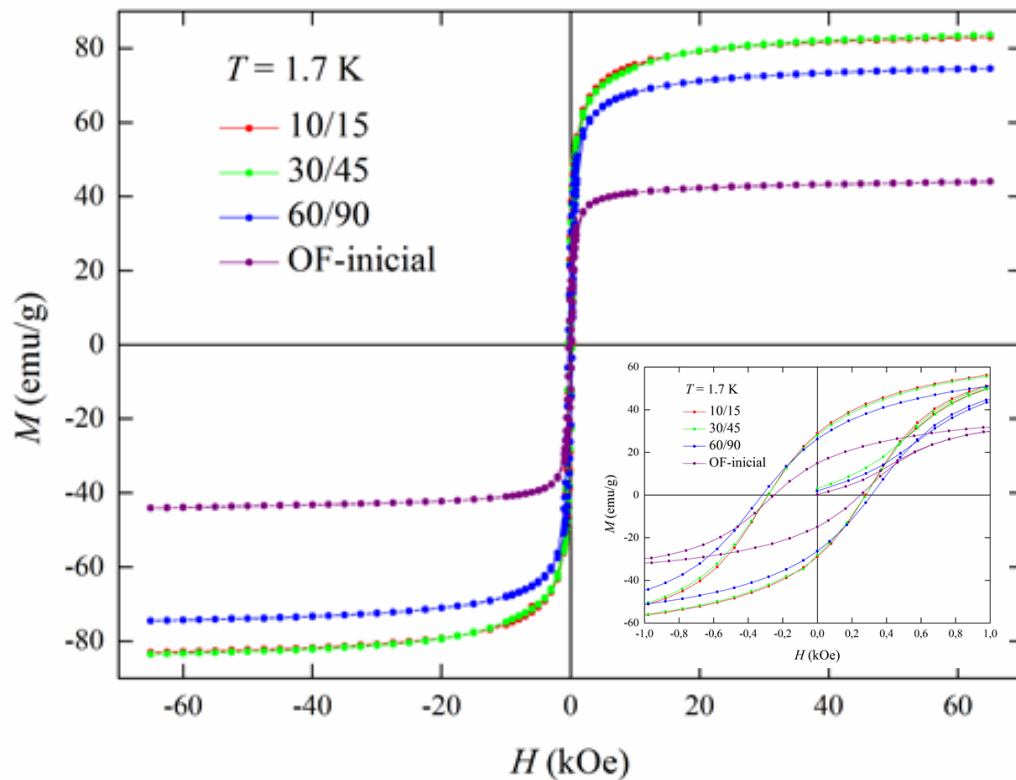


Figura 27 - Medidas de magnetização M (emu/g) versus campo magnético H (kOe), a 1.7 K.



A 300 K, nota-se que, quando o campo externo é nulo, a magnetização das nanopartículas também é nula. Tal comportamento é característico de nanopartículas superparamagnéticas a essa temperatura (detalhe da Figura 26). A 1,7 K, no entanto, há uma pequena remanência de magnetização quando o campo H é nulo (detalhe da Figura 27). Esta diferença de comportamento ocorre porque a energia termal, maior a 300 K, é capaz de alterar constantemente as direções dos momentos magnéticos das partículas, gerando um momento total nulo quando H é zero. A energia termal a 1,7 K é menor e não é capaz de randomizar os momentos magnéticos na mesma proporção, decorrendo em remanência da magnetização causada pelo campo magnético externo presente anteriormente.

A magnetização das nanopartículas cresce rapidamente com o aumento da magnitude do campo H , até estabilizar na chamada magnetização de saturação da amostra (M_s). Os valores de M_s para as duas temperaturas registradas estão contidos na Tabela 5. Os valores de M_s são maiores a 1,7 K do que a 300 K, pois a energia termal maior a 300 K impede que os momentos magnéticos sejam todos alinhados na direção do campo externo. OF-inicial e OF-

60/90 apresentam M_s menores do que OF-10/15 e OF-30/45, pois possuem menor conteúdo de óxido de ferro, como verificado por TGA e FT-IR.

Tabela 5 - Magnetização de saturação a 300 K e a 1,7 K, em emu/g.

Amostra	Magnetização de Saturação (M_s) (emu/g)	
	300 K	1,7 K
OF-inicial	38,2	44,1
OF-10/15	72,0	83,1
OF-30/45	71,4	83,5
OF-60/90	64,9	74,5

O valor de M_s é um parâmetro importante para hipertermia magnética e aumento de contraste para IRM. A SLP e a taxa de relaxação transversa (R_2), indicadores de qualidade das nanopartículas para estas aplicações, melhoram conforme M_s aumenta (YOO, LEE, *et al.*, 2011).

Feridex[®], um produto comercial, agente de contraste para IRM de nanopartículas de óxido de ferro, por exemplo, tem um valor menor de M_s reportado na literatura – 64,4 emu/g (NOHYUN LEE, 2011). Portanto, as nanopartículas OF-10/15 e OF-30/45 têm valores que podem ser considerados ótimos para as aplicações desejadas.

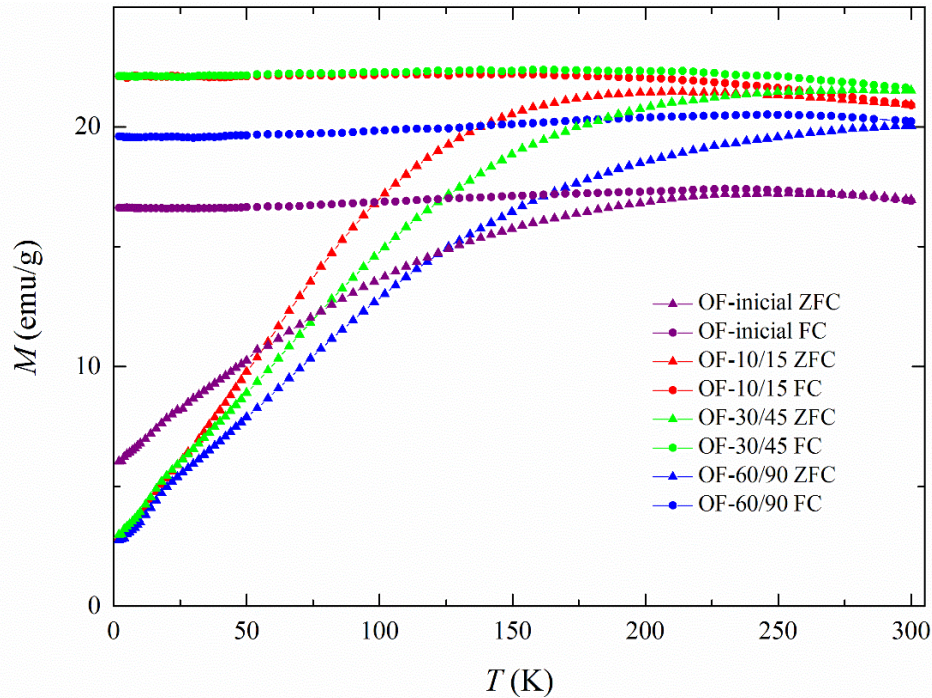
5.1.7 Medidas magnéticas em função da temperatura

A temperatura de bloqueio (T_B) indica a temperatura a partir da qual o sistema em questão torna-se superparamagnético. Seus valores para as amostras foram determinados por procedimento *zero-field-cooling/field-cooling* (ZFC/FC).

Em baixas temperaturas não há energia suficiente para a randomização dos momentos magnéticos. Conforme a temperatura aumenta, a energia termal desordena o sistema e mais partículas adquirem a energia suficiente para terem seus momentos alinhados com o a direção do campo externo. O número de momentos alinhados atinge um máximo em T_B . Acima da temperatura de bloqueio a energia termal é grande o suficiente para randomizar os momentos magnéticos, diminuindo a quantidade de partículas com momento magnético alinhado com o campo externo e resultando em decréscimo da magnitude da magnetização.

É possível ver nos gráficos este aumento da magnetização, seguido de estabilização e queda. A temperatura na qual a curva ZFC atinge seu máximo foi considerada a T_B .

Figura 28 - Gráfico das medidas de magnetização (emu/g) por temperatura (K) por procedimento ZFC/FC das amostras OF-inicial, OF-10/15, OF-30/45 e OF-60/90.



A Tabela 6 lista as temperaturas de bloqueio para as nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas. OF-inicial e OF-10/15 apresentaram comportamento superparamagnético a temperatura ambiente, enquanto que OF-30/45 e OF-60/90, não.

Podemos comparar as T_B de OF-10/15, OF-30/45 e OF-60/90, pois foram sintetizadas pelo mesmo método, somente diferindo quanto às concentrações de íons de Fe utilizadas. A amostra OF-10/15 apresentou a menor T_B entre as três, possivelmente devido a um tamanho reduzido de suas nanopartículas, esperado para menores concentrações de Fe no meio reacional.

Tabela 6 - Temperatura de Bloqueio das nanopartículas de óxido de ferro.

Amostra	Temperatura de Bloqueio (T_B) (K)
OF-inicial	254
OF-10/15	210
OF-30/45	> 300
OF-60/90	> 300

5.1.8 Citotoxicidade

A citotoxicidade das nanopartículas em relação à linhagem de células sadias 929 e às células tumorais HepG2 e Hela foi monitorada. Os resultados de viabilidade celular em função da concentração de nanopartículas (mg/mL) a qual as culturas foram submetidas, em relação ao controle de cada linhagem celular, estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Viabilidade celular em função da concentração de nanopartículas a qual as culturas celulares foram submetidas, em função do controle.

	Amostra	Linhagem Celular	Concentração de amostra (mg/mL)							
			5,04	2,52	1,26	0,63	0,32	0,16	0,08	0,04
Viabilidade (%)	OF-inicial	HepG2	115,9	108,4	111,6	99,9	103,2	109,5	98,8	94,8
		Hela	97,2	89,1	100,3	92,6	102,3	103,9	106,5	100,0
		929	48,3	87,1	106,1	100,4	104,9	100,2	96,6	109,4
	OF-10/15	HepG2	113,5	102,4	109,8	107,3	90,2	107,2	104,2	107,9
		Hela	99,0	107,4	99,1	101,5	99,5	92,5	97,1	102,3
		929	61,7	75,7	74,0	87,6	96,0	98,9	100,6	100,1
	OF-30/45	HepG2	98,2	102,6	105,6	89,1	96,7	94,7	102,2	115,0
		Hela	98,2	88,4	100,5	97,6	108,9	105,7	102,8	129,5
		929	60,9	60,5	70,3	93,3	98,0	94,9	105,2	102,0
	OF-60/90	HepG2	102,3	104,7	106,9	106,0	104,5	101,6	98,5	105,9
		Hela	116,5	111,6	116,6	118,1	113,7	116,3	110,7	108,3
		929	99,3	103,9	97,6	106,6	104,8	107,8	104,4	100,0

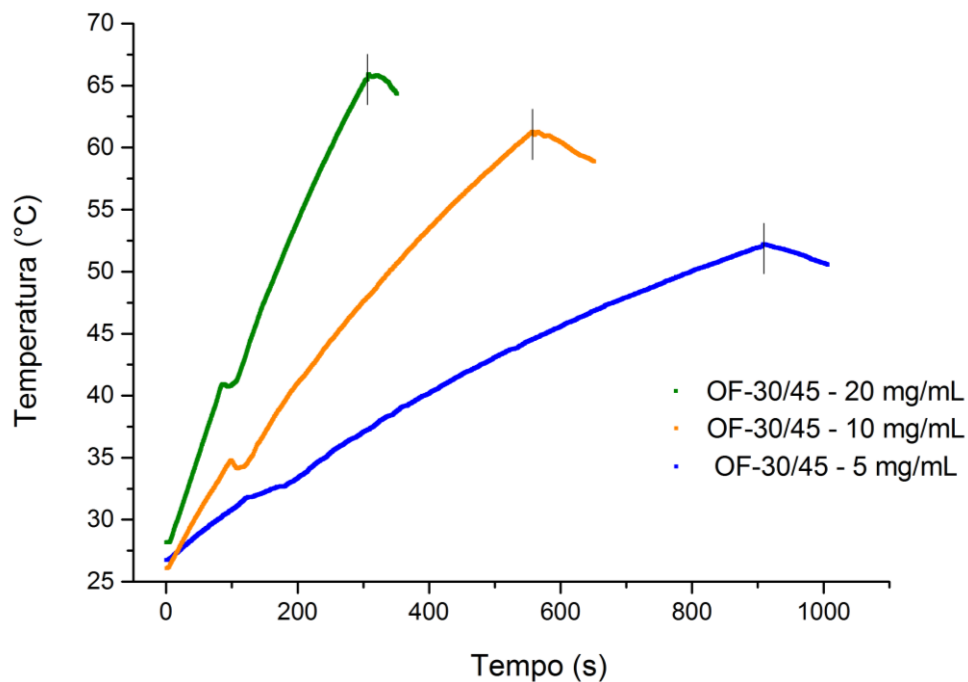
Os resultados indicam que as nanopartículas de óxido de ferro não apresentam potencial citotóxico em relação às células tumorais HeLa e HepG2. Em relação a linhagem celular NCTC 929, o potencial citotóxico é discreto e a viabilidade só é reduzida a menos de 50 % para OF-inicial acima de 5 mg/mL. De acordo com (BRACHER, FALLER e SPENGLER, 1988), substâncias com IC 50 superior a 0,175 são consideradas não irritantes. Portanto, as amostras testadas podem ser consideradas seguras para aplicações biológicas nas concentrações indicadas.

5.1.9 Testes de Aquecimento

Para avaliar seu potencial de geração de calor, foram preparadas três suspensões de 2 mL com a amostra OF-30/45 em diferentes concentrações, 5, 10 e 20 mg/mL. As suspensões foram submetidas a um campo magnético alternado de 112 kHz e intensidade máxima de 25

mT (equivalente a $19,9 \text{ kAm}^{-1}$). As mudanças de temperatura registradas em função do tempo de aplicação do campo estão apresentadas na Figura 29.

Figura 29 - Gráfico de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) em função do tempo (s) de aplicação do campo magnético (interrompido nos momentos indicados pelas barras verticais), da amostra OF-30/45, a 5,10 e 20 mg/mL.



Através destes resultados, pode ser calculada a SAR das suspensões. A capacidade calorífica (C) de 2 mL de água é igual a:

$$C (2 \text{ g de água}) = c \cdot m = 4,186 \text{ J/g } ^{\circ}\text{C} \cdot 2 \text{ g} = 8,372 \text{ J/}^{\circ}\text{C}, \text{ considerando que:}$$

1 cal = 4,186 J; massa (m) = 2 g, para 2 mL de água; calor específico da água (c) = 4,186 J/g $^{\circ}\text{C}$.

Portanto, as SAR da amostra OF-30/45, a 5 mg/mL, 10 mg/mL e a 20 mg/mL, utilizando a Equação 6, são:

- OF-30/45, 20 mg/mL:

$$\text{SAR} = C \cdot \Delta T / \Delta t = 8,372 \cdot (58,79 - 28,16) / 4 = 64,1 \text{ J/min} = 1068 \text{ mW};$$

- OF-30/45, 10 mg/mL:

$$\text{SAR} = C \cdot \Delta T / \Delta t = 8,372 \cdot (43,73 - 26,08) / 4 = 36,9 \text{ J/min} = 615 \text{ mW};$$

- OF-30/45, 5 mg/mL:

$$\text{SAR} = C \cdot \Delta T / \Delta t = 8,372 \cdot (34,93 - 26,74) / 4 = 17,1 \text{ J/min} = 285 \text{ mW}.$$

E $\text{SAR}_{\text{médio}} = 57 \text{ W/g}$ de amostra OF-30/45.

De acordo com a regra determinada por Atkinson e Brezovich, para o campo magnético aplicado ser considerado seguro para aplicações biológicas, o produto entre a amplitude e a frequência do campo não deve ultrapassar $4,85 \cdot 10^8 \text{ Am}^{-1}\text{Hz}$ (BREZOVICH, ATKINSON e LILLY, 1984). O valor desse produto nos testes realizados foi de $2,228 \cdot 10^9 \text{ Am}^{-1}\text{Hz}$. Portanto, ele deve ser reduzido para a aplicação prática, o que reduz a quantidade de energia liberada pelas partículas. Porém, para a aplicação no tratamento de câncer, um aumento de em torno de 5 °C da temperatura na região do tumor é suficiente para sua eficácia. As amostras produzem um aumento de temperatura bem superior, portanto a frequência e intensidade do campo podem ser reduzidos sem inviabilizar o potencial terapêutico.

5.2 Síntese e Caracterização das partículas encapsuladas com polímeros

Após a determinação de uma rota de síntese que produzisse nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas, foi testada a nanoencapsulação das mesmas, pela técnica de secagem *nano spray drying* empregando polímeros como matriz encapsulante (exceto pela amostra OF-10/15-4P, seca em estufa). As matrizes encapsulantes utilizadas foram Eudragit® S100, Pluronic F68, Maltodextrina com Tween 80 e Pluronic F68 com PCL. Apenas no último caso o meio dispersante escolhido foi acetona (em função da solubilidade do PCL), enquanto que nos restantes os experimentos foram conduzidos em meio aquoso. Primeiro os polímeros foram solubilizados, depois foram adicionadas as nanopartículas de óxido de ferro e então foram aplicados ultrassom e agitação por Turrax® para dispersar as partículas. A suspensão ainda foi mantida sob agitação durante a alimentação do fluido no processo de secagem, para garantir a homogeneidade da suspensão.

No caso dos polímeros solubilizados em acetona, foi empregado o módulo de secagem com solvente orgânico do equipamento Nano Spray Dryer, que mantém a concentração de oxigênio em até no máximo 4 % para garantir a segurança do processo. A dispersão também foi mantida sob agitação durante processo de secagem.

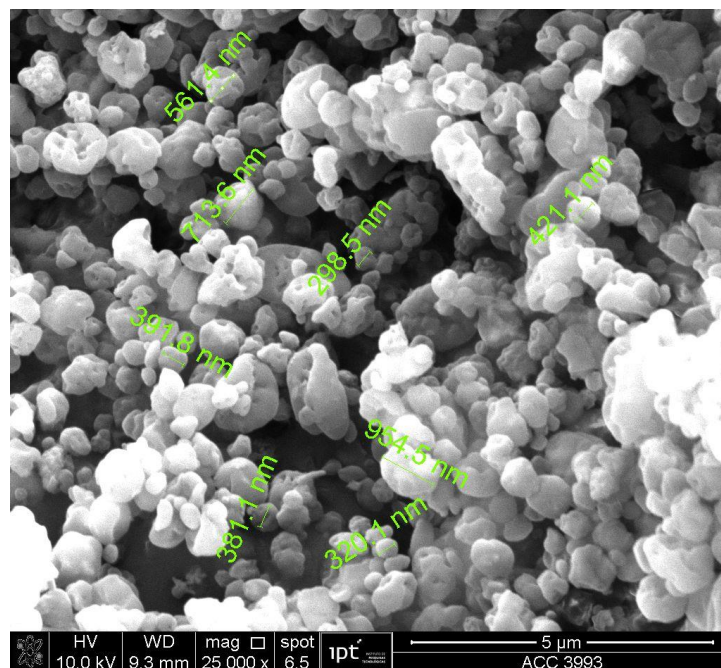
As partículas encapsuladas obtidas foram caracterizadas quanto a morfologia, distribuição de tamanho de partícula, índice de polidispersidade, perfil térmico, composição química, citotoxicidade, magnetização quanto a temperatura e a campo magnético, além de potencial de aquecimento. Os resultados estão apresentados abaixo.

5.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

As amostras de óxido de ferro com polímeros OF-10/15-1P, OF-10/15-4P, Eudra, PCL 1.0, OF-10/15-3MT, OF-10/15-1E e OF-10/15-3E foram submetidas a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As imagens obtidas estão apresentadas nesta seção. Para verificar o tamanho das partículas foi utilizado o software ImageJ; os tamanhos de 30 partículas de cada amostra foram medidos, alguns deles foram registrados na própria imagem e a média de todos os valores foi extraída.

A Figura 30 retrata a amostra Eudra, formada por nanopartículas poliméricas magnéticas formadas com o polímero Eudragit®. A ampliação de 25000x permite a avaliação do tamanho das partículas, que em sua maioria varia de aproximadamente 320 a 955 nm. A média de 30 diâmetros medidos foi de 577 nm, com desvio padrão de 286 nm.

Figura 30 - Imagem de MEV das nanopartículas poliméricas magnéticas formadas por Eudragit®, Eudra, com detalhe do tamanho das partículas, entre 320 e 955 nm. Aumento de 25 mil vezes.



Não são visualizadas nanopartículas com tamanhos inferiores a 30 nm, com aspecto de contraste escuro da imagem, o que evidenciaria nanopartículas superparamagnéticas não encapsuladas. Portanto, houve a formação das nanopartículas poliméricas contendo a magnetita.

A Figura 31 mostra as partículas OF-10/15-1E e a Figura 32 mostra as partículas OF-10/15-3E. Em ambos os casos, são observadas estruturas de diferentes formatos. Os tamanhos, em sua maioria, variam entre 500 nm e 1,1 μm . A média de 30 diâmetros foi de para a amostra OF-10/15-1E foi de 852 nm, com desvio padrão de 555 nm, e para OF-10/15-3E foi de 1020 nm, com desvio padrão de 473 nm.

Figura 31 - MEV da amostra OF-10/15-1E. Aumento de 5 mil vezes.

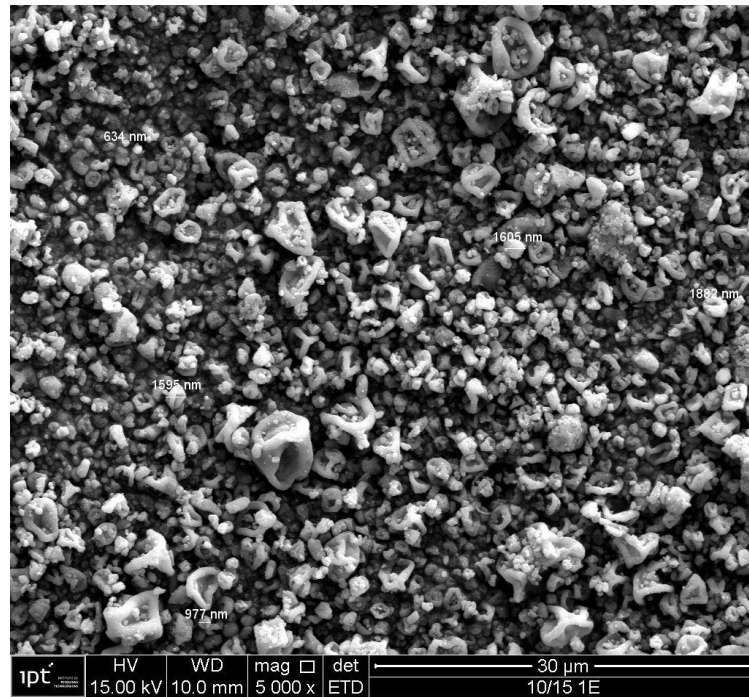
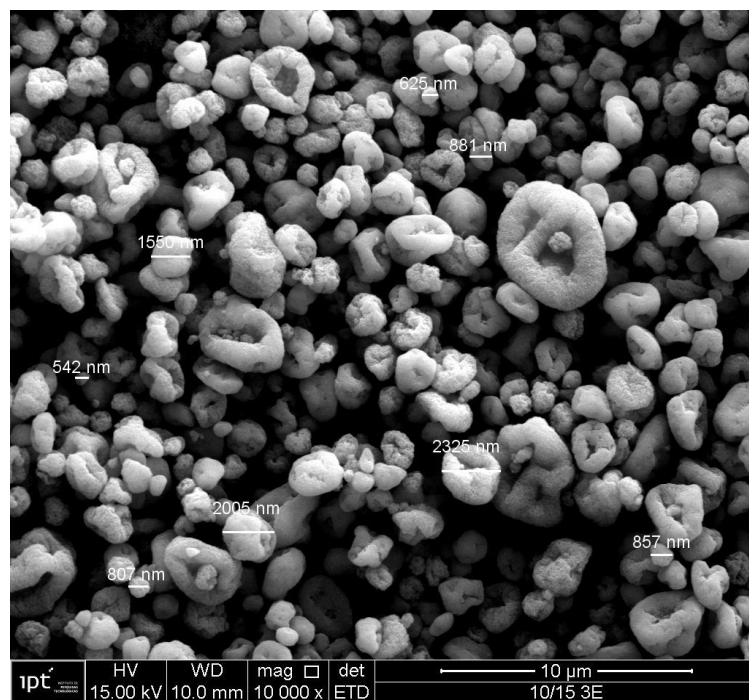


Figura 32 - OF-10/15-3E. Aumento de 10 mil vezes.



A Figura 33 e a Figura 34 mostram as partículas da amostra OF-10/15-3MT. Sua superfície é esférica. A média dos tamanhos medidos foi de 1168 nm, com desvio padrão de 548 nm.

Figura 33 - MEV de OF-10/15-3MT com medidas de tamanho pelo software ImageJ. Aumento de 30 mil vezes.

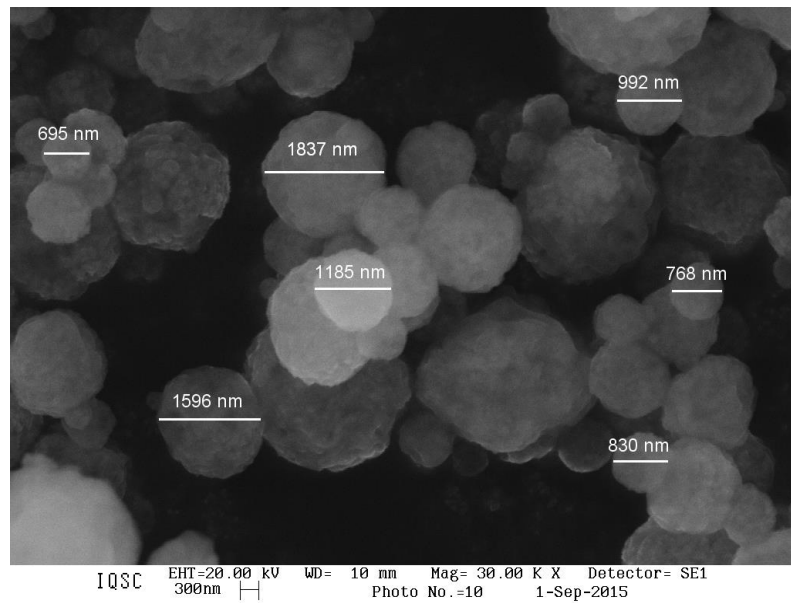
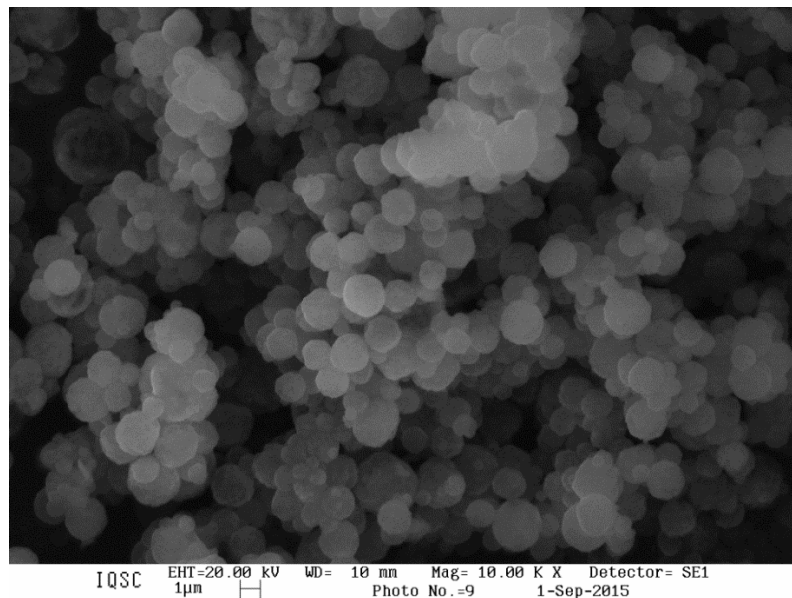
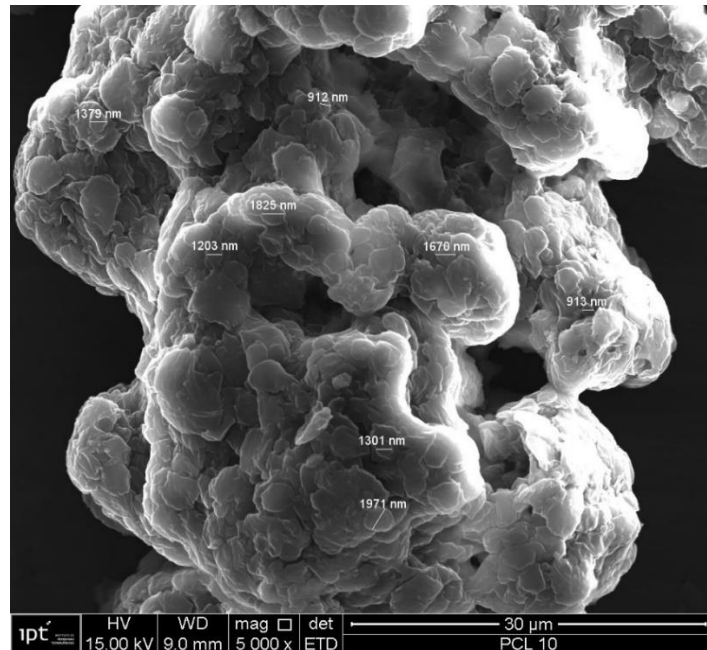


Figura 34 - MEV de OF-10/15-3MT. Aumento de 10 mil vezes.



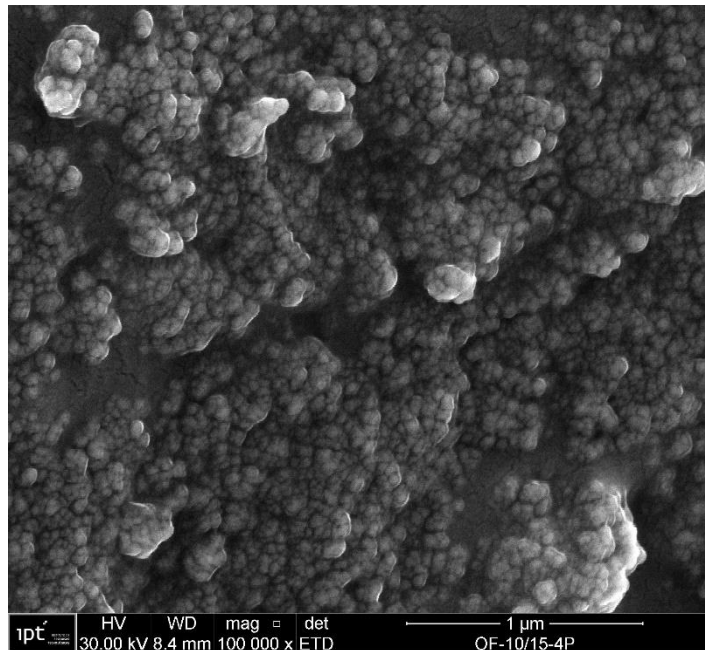
A Figura 35 apresenta imagem de MEV da amostra PCL 1.0. As partículas mostram-se muito agregadas, dificultando sua visualização individual. A tamanho médio de 30 partículas foi de 1417 nm, com desvio padrão de 430 nm.

Figura 35 - MEV da amostra PCL 1.0, com aumento de 5 mil vezes.



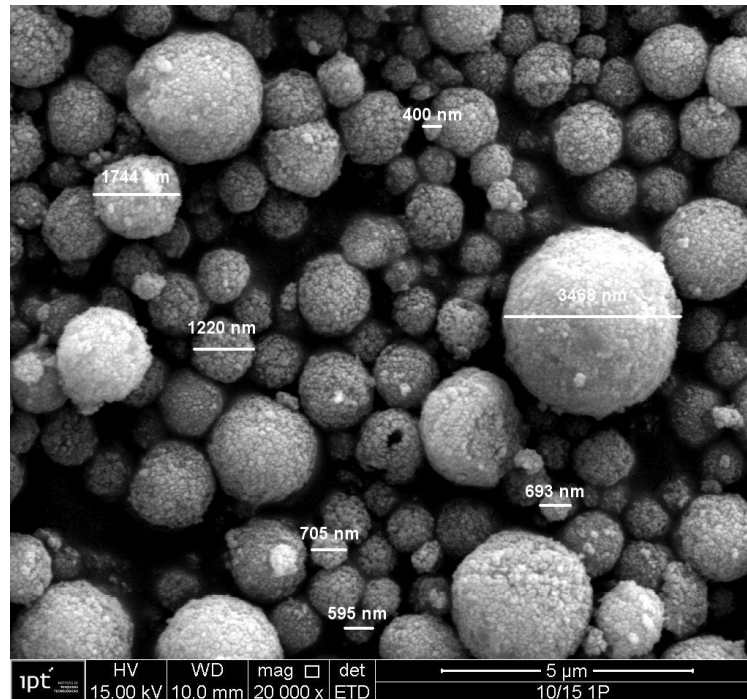
A imagem de microscopia eletrônica da amostra OF-10/15-4P Figura 36, a única formada por óxido de ferro e polímero que não foi seca por nano spray drying, é nitidamente diferente das demais. Os núcleos das partículas de magnetita funcionalizadas com Pluronic na superfície podem ser identificados, com contornos provavelmente formados pelo polímero. No entanto, não há uma organização de partículas encapsuladas, como nas imagens das outras amostras. Possivelmente apenas a adição de co-polímero durante a síntese da magnetita, empregado como estabilizante, não é suficiente para compor o revestimento completo das nanopartículas.

Figura 36 - MEV da amostra OF-10/15-4P, com aumento de 100 mil vezes.



A Figura 37 mostra as partículas OF-10/15-1P. Observa-se a presença de partículas esféricas, de superfície regular. A média dos diâmetros das 30 partículas medidas foi de 1016 nm, com desvio padrão de 724 nm. Esta amostra, em comparação com OF-10/15-4P, comprova a importância do processo de nano spray drying para a encapsulação polimérica das nanopartículas magnéticas, com adição do polímero como matriz encapsulante durante o processo de encapsulação, com a finalidade de aprimorar a dispersibilidade do óxido de ferro e garantir as propriedades biológicas conferidas pela matriz. É possível verificar a presença das nanopartículas de óxido de ferro que compõem (com o polímero Pluronic F68) cada partícula maior, caracterizando um material nanoestruturado.

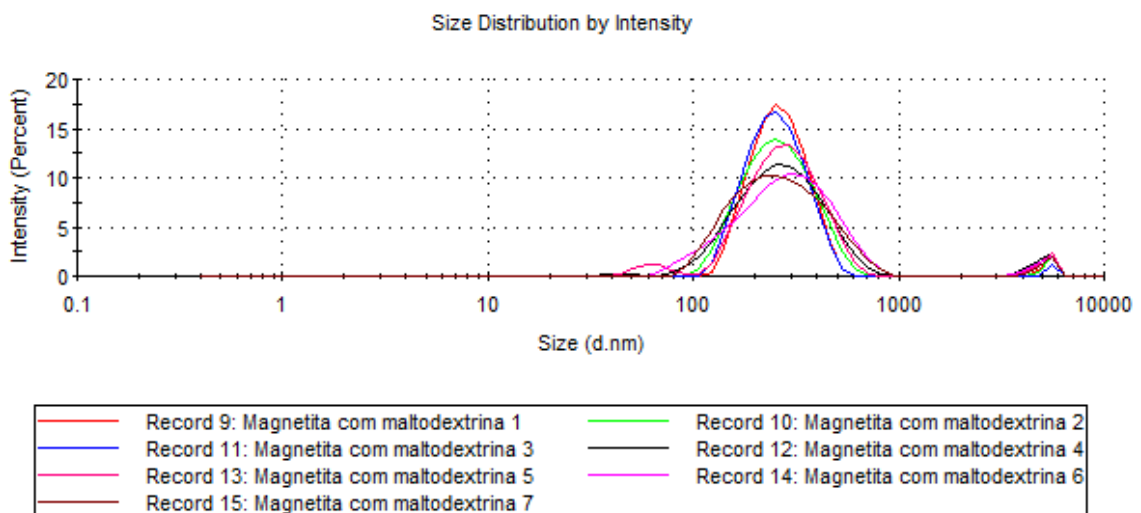
Figura 37 - Imagem de microscopia eletrônica da amostra OF-10/15-1P, com aumento de 20 mil vezes.



5.2.2 Espalhamento de Luz Dinâmico

Foram feitas as medidas de DLS para todas as partículas encapsuladas. Foram considerados os resultados correspondentes à distribuição por intensidade fornecidos pelos equipamentos Zetasizer Nano ZS (Malvern) e Nano Plus (Particulate Systems) utilizados nas medidas.

Figura 38 - Imagem do resultado da medida de tamanho por DLS da amostra Malto, calculado pelo software do equipamento Zetasizer Nano ZS. Distribuição de tamanho por intensidade.



O equipamento fornece o diâmetro principal da amostra, que consiste do diâmetro da maioria das partículas, o diâmetro médio, que corresponde à média de todos os diâmetros medidos, e o índice de polidispersividade (Pdi), que é uma medida de quanto o tamanho das partículas varia dentro da amostra – quanto menor é o índice, menor é a diferença relativa entre os diâmetros medidos, gerando uma curva de largura estreita. Tais resultados estão resumidos na Tabela 8. Também na tabela, está uma relação das estimativas de tamanho médio calculadas através das medidas de MEV.

Figura 39 - Imagem do software do equipamento Zetasizer Nano ZS, com as porcentagens de partículas referentes aos picos da distribuição de tamanho por DLS para a amostra Eudra.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Peak 1:	878,7	97,9	272,4
Peak 2:	5448	2,1	269,1
Peak 3:	0,000	0,0	0,000

Tabela 8 – Diâmetros principais, diâmetros médios e Índices de Polidispersividade obtidos por DLS para as partículas encapsuladas com diferentes polímeros, e comparação com a estimativa de diâmetro médio obtido por MEV.

Amostra	Diâmetro principal	Diâmetro médio	Índice de Polidispersividade (Pdi)	Diâmetro médio por MEV
OF-10/15-4P	181,2 nm	559,2 nm	0,538	-
Malto	280,8 nm	272,7 nm	0,326	-
Eudra	878,7 nm	1042 nm	0,346	577 nm
PCL 1.0	601,8 nm	1726 nm	0,761	1417 nm
PCL 1.5	205,0 nm	2260 nm	0,938	-
OF-10/15-1P	924,3 nm	993,1 nm	0,178	1016 nm
OF-10/15-1E	696,2 nm	812,3 nm	0,609	852 nm
OF-10/15-3E	1314,4 nm	1392,3 nm	0,145	1020 nm
OF-10/15-3MT	349,1 nm	288,0 nm	0,262	1168 nm

O resultado da amostra OF-10/15-4P, de óxido de ferro com Pluronic F68, sugere que foram formadas estruturas de óxido de ferro com Pluronic de tamanho aproximado de 181 nm, em sua maioria.

As amostras de PCL com Pluronic apresentam altos valores de Pdi, ou seja, há grande variação de tamanho entre partículas. Apesar do alto valor dos diâmetros médios, a maioria

das partículas apresenta tamanho menor, de acordo com os picos das distribuições de tamanho.

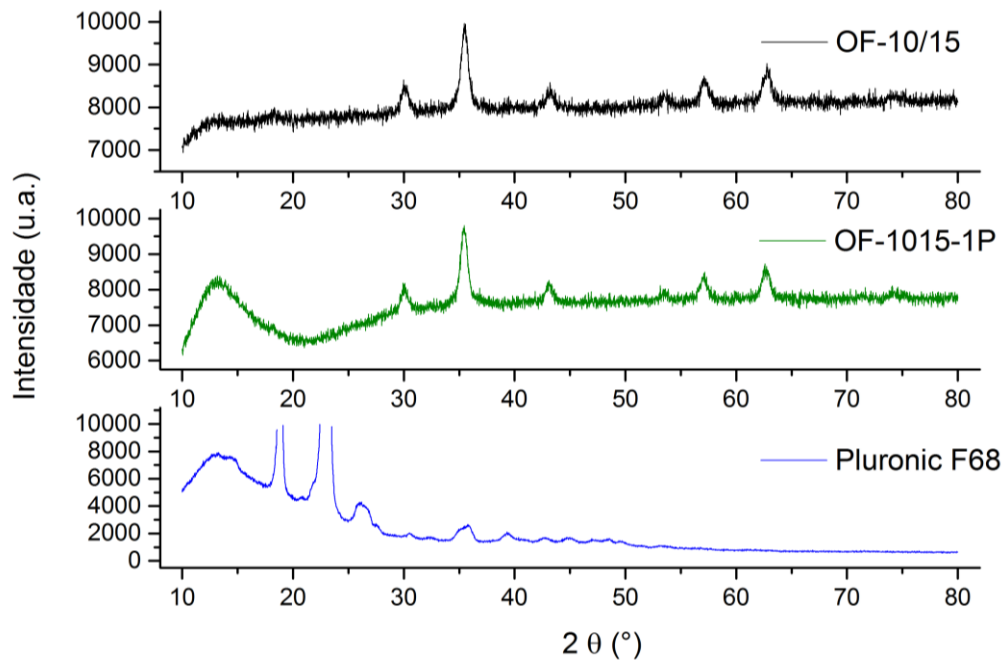
As amostras Eudra e OF-10/15-3E, formadas por óxido de ferro e Eudragit® S100, apresentaram tamanhos por DLS maiores do que por MEV. Tal diferença indica como medidas obtidas pelas diferentes técnicas podem ter resultados diferentes. No caso do DLS, o meio líquido ao redor da partícula forma uma camada de água e íons que pode aumentar o diâmetro efetivo medido da partícula. Por outro lado, OF-10/15-3MT tem tamanho menor por DLS do que por MEV. Neste caso, é possível que parte da matriz encapsulante formada por Tween 80 e Maltodextrina esteja sendo solubilizada pelo meio aquoso.

5.2.3 Difração de raios-x

Foram realizados experimentos de difração de raios-x para verificar a estrutura química das amostras. Nota-se no espectro da amostra OF-10/15-1P, apresentado na Figura 40 que estão presentes os mesmos picos referentes a magnetita do espectro de OF-10/15.

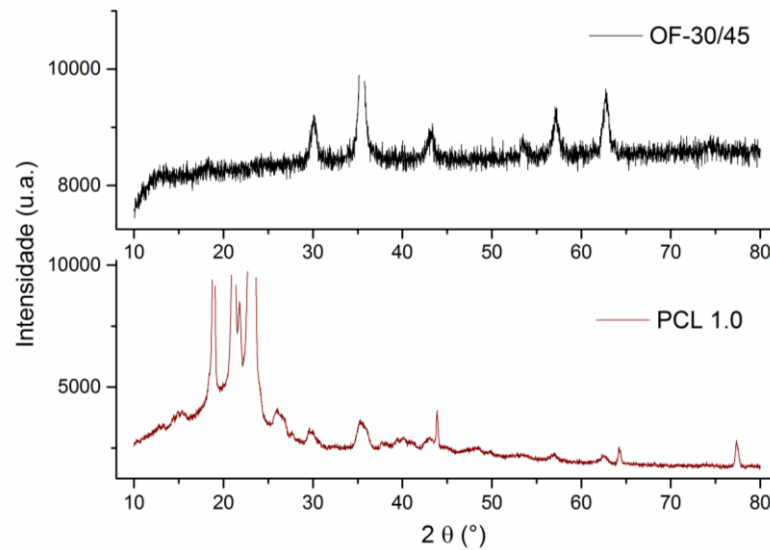
Portanto, a presença de Pluronic F68 não afetou a formação do óxido de ferro na síntese, atuando apenas como estabilizante na superfície das partículas.

Figura 40 - Espectro de difração de raios-x da amostra OF-10/15-1P comparado ao espectro do polímero Pluronic F68.



No espectro de OF-10/15-1P não são vistos os picos do espectro de Pluronic em torno de 19° e 23° , apenas o pico largo de 10° a 17° . No entanto, tais picos estão presentes no espectro da amostra PCL 1.0, formada por Pluronic F68, PCL e óxido de ferro da amostra OF-30/45, registrado na Figura 41. Neste espectro também estão presentes os picos de óxido de ferro, porém em menor intensidade, visto que OF-30/45 está em menor quantidade na amostra em relação aos polímeros, além dos picos característicos de PCL em torno de 21° e 22° (XIONG, TAM e GAN, 2006).

Figura 41 – Espectros de difração de raios-x das amostras OF-30/45 e da amostra PCL 1.0. Fonte de cobre.



Vários fatores externos à cadeia polimérica podem afetar a cristalização de um polímero. Suas cadeias poliméricas podem estar em contato com outra molécula diferente, como a superfície da magnetita, o que pode causar alguma interação entre as cadeias poliméricas e o meio externo, que refletirá na cristalinidade final. Moléculas estranhas ao polímero podem se alojar entre as cadeias dificultando o empacotamento e, portanto, reduzindo a porcentagem de cristalinidade (CANEVAROLO JR., 2006). Este deve ter sido o caso de OF-10/15-1P, na qual a presença de magnetita é bem maior que a de polímero. Em PCL 1.0, a porcentagem em massa dos polímeros é grande, permitindo a formação de estruturas cristalinas.

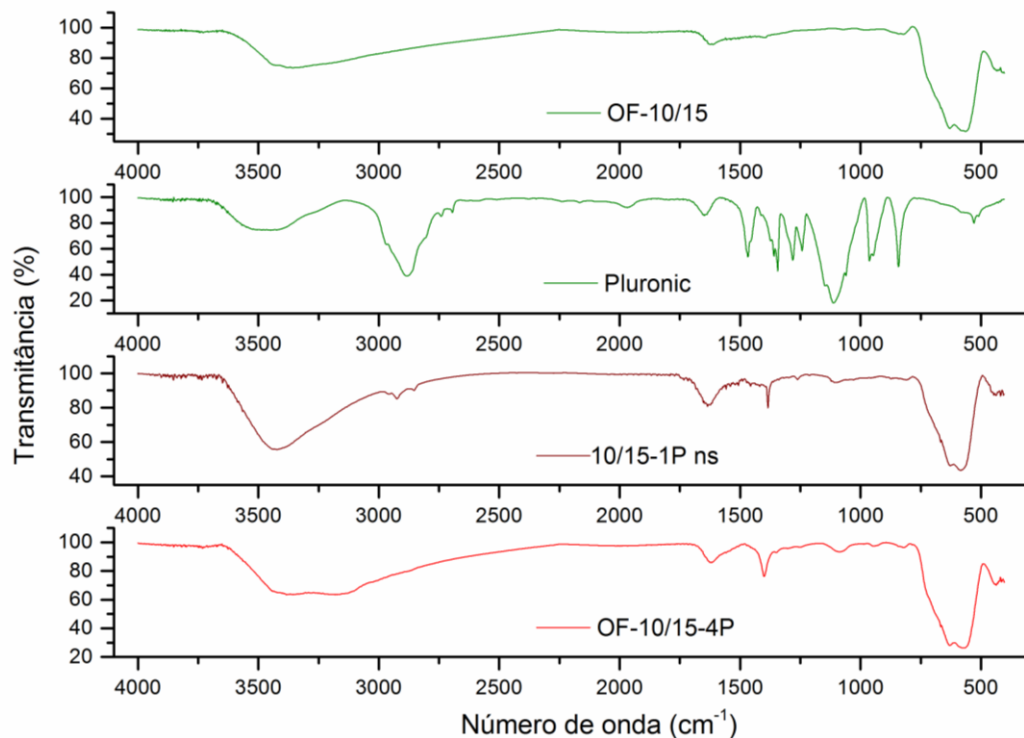
5.2.4 Espectroscopia de Infravermelho

Nesta seção estão apresentados os resultados das análises de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) das amostras de óxido de ferro com polímeros. São comparados os espectros das amostras com os dos polímeros puros e das amostras de óxido de ferro puras, para verificar se as ligações químicas foram mantidas após a encapsulação.

A Figura 42 retrata os espectros das amostras OF-10/15-4P e OF-10/15-1P, comparados ao polímero Pluronic F68 (que as constitui) e a amostra OF-10/15 de óxido de ferro puro. Nota-se que as bandas de óxido de ferro presentes em OF-10/15 em 580 cm^{-1} e

620 cm^{-1} também estão bem pronunciadas em OF-10/15-1P e OF-10/15-4P. As bandas do polímero Pluronic, como a entre 1000 e 1200 cm^{-1} referente aos estiramentos das suas ligações C-O-C (WANG, GUAN, *et al.*, 2013), estão presentes em ambas, porém em menor intensidade, o que indica que sua porção dentro da amostra é menor do que a quantidade de óxido de ferro (tal fato pode ser comprovado pela análise termogravimétrica).

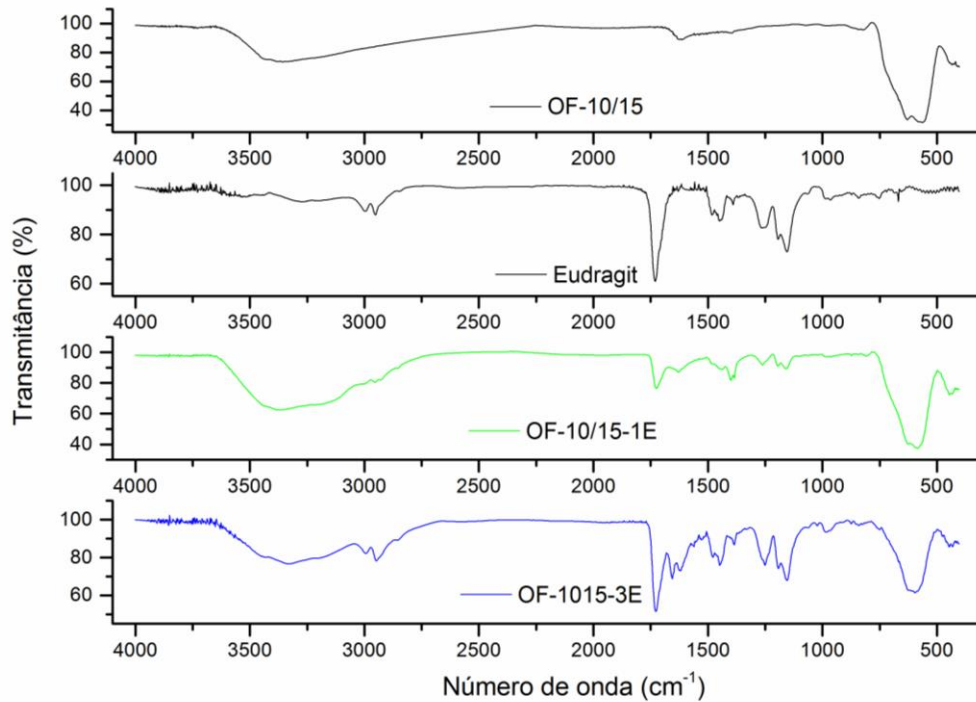
Figura 42 - Espectroscopia de Infravermelho das amostras que contêm Pluronic, OF-10/15-1P e OF-10/15-4P, comparadas a OF-10/15 e ao próprio polímero Pluronic F68.



OF-10/15-1E e OF-10/15-3E, duas amostras de óxido de ferro com o polímero Eudragit S 100, têm seus espectros apresentados na Figura 21, comparados ao próprio polímero e a amostra OF-10/15. Eudragit tem sua banda mais intensa em 1730 cm^{-1} devido a ligações C=O de suas funções éster e ácido carboxílico, presente nas duas amostras, assim como duas bandas em 2950 e 2997 cm^{-1} devido a ligações C-H e diversas bandas entre 1650 e 1100 cm^{-1} . Nota-se que a intensidade das bandas em OF-10/15-3E é maior que em OF-10/15-1E, devido

a maior quantidade do polímero no primeiro caso. As bandas de óxido de ferro também estão presentes em ambas as amostras.

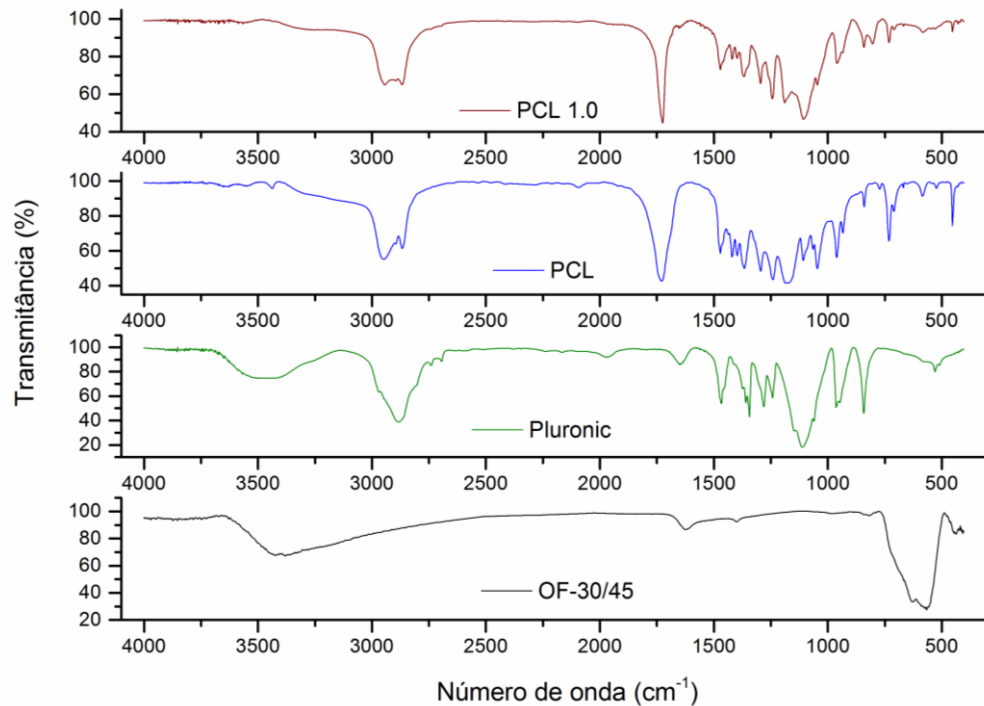
Figura 43 - Espectros de Infravermelho das amostras que contêm Eudragit, OF-10/15-1E e OF-10/15-3E, comparadas a OF-10/15 e ao próprio polímero Eudragit S100.



A Figura 44 compara o espectro da amostra PCL 1.0 aos polímeros PCL e Pluronic F68 e à amostra OF-30/45, seus constituintes. PCL, assim como Eudragit, possui banda em torno de 1730 cm⁻¹ devido às ligações C=O de sua funções cetona. Ligações C-H entre 2850 e 3000 cm⁻¹ (SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2005) estão proeminentes nos espectros dos

polímeros e da amostra PCL 1.0. As bandas de OF-30/45 estão muito sutis no espectro de PCL 1.0, pois sua presença é muito reduzida.

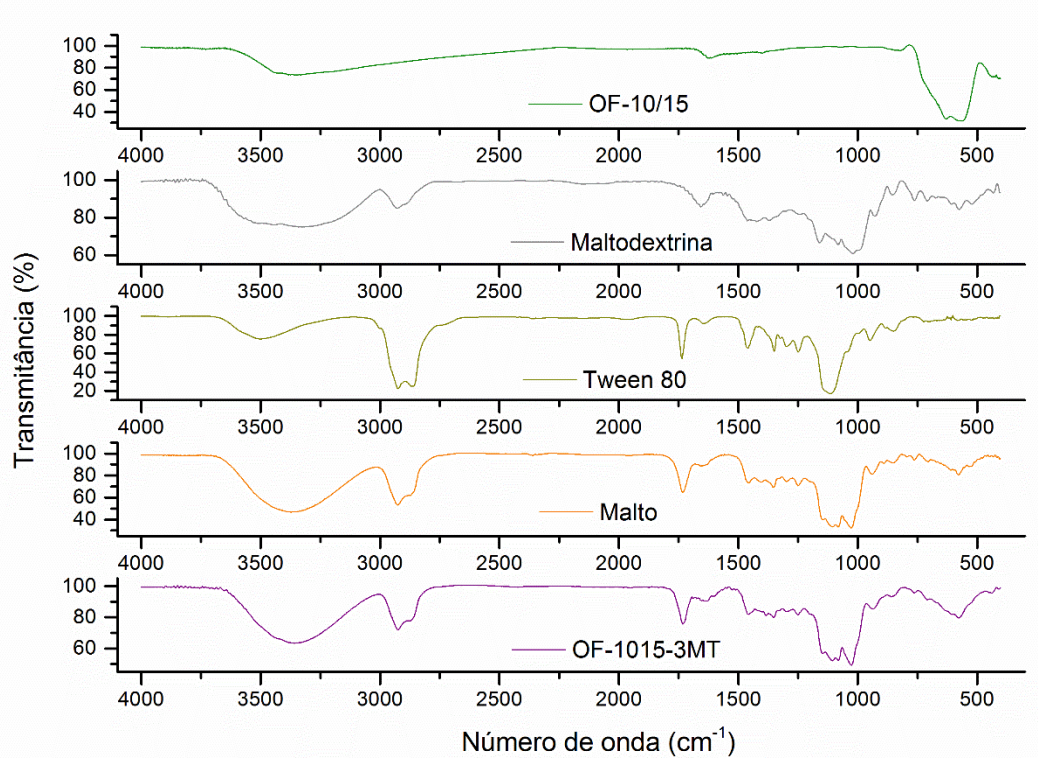
Figura 44 - Espectros de Infravermelho da amostra PCL 1.0, comparada aos seus constituintes PCL, Pluronic F68 e OF-30/45.



Na Figura 45 estão os espectros das amostras OF-10/15-3MT e Malto, além dos espectros de Maltodextrina, Tween 80 e OF-10/15. As bandas de magnetita estão presentes, mas as da matriz encapsulante estão mais evidentes nos espectros de ambas as amostras. A banda de cetona em 1730 cm^{-1} está presente novamente, neste caso do Tween 80. A banda larga entre 3000 e 3700 cm^{-1} é referente às ligações O-H da Maltodextrina; as bandas entre 1000 e 1200 cm^{-1} , presentes na Maltodextrina e no Tween 80, são atribuídas às ligações C-O

(SILVERSTEIN, WEBSTER e KIEMLE, 2005). As ligações em 2860 e 2920 cm^{-1} são referentes aos estiramentos simétrico e assimétrico de CH_2 , respectivamente (XIONG, XIONG, *et al.*, 2012).

Figura 45 – Espectros de Infravermelho das amostras Malto e OF-10/15-3MT, comparadas a OF-10/15, Maltodextrina e Tween 80.

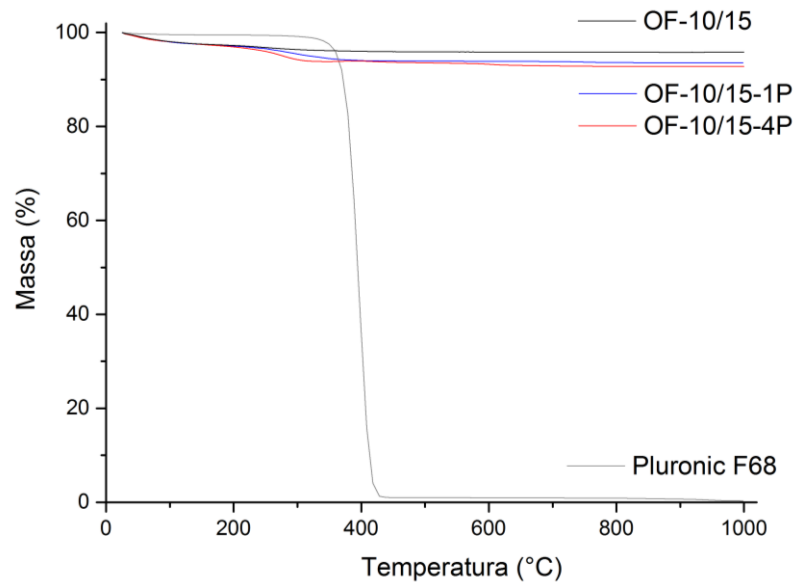


5.2.5 Análise Termogravimétrica

Através da análise termogravimétrica é possível estimar a quantidade de óxido de ferro e a de matrizes encapsulantes nas amostras. Os perfis de degradação das amostras OF-10/15-1P e OF-10/15-4P em comparação ao do polímero Pluronic F68 e OF-10/15 estão na Figura 46. Até 100 °C, as amostras perdem em torno de 2 % de massa, correspondente a água presente em sua estrutura. Depois, as amostras perdem massa de sub-produtos da reação e do polímero presente, aproximadamente 5,2 % e 4,4 %, restando resíduos de 92,8 e 93,6 % para OF-10/15-4P e OF-10/15-1P, respectivamente. Tais resíduos são essencialmente óxido de ferro, visto que este não é degradado até 1000 °C e o polímero tem resíduo de apenas 0,3 % até esta temperatura. Apesar da massa utilizada na síntese ser diferente, as porções de polímero são semelhantes nas duas amostras; a centrifugação realizada após a síntese extrai grande parte da massa de polímero nos dois casos. Uma hipótese é de que até determinada concentração de polímero empregada durante o processo de síntese fica adsorvida na

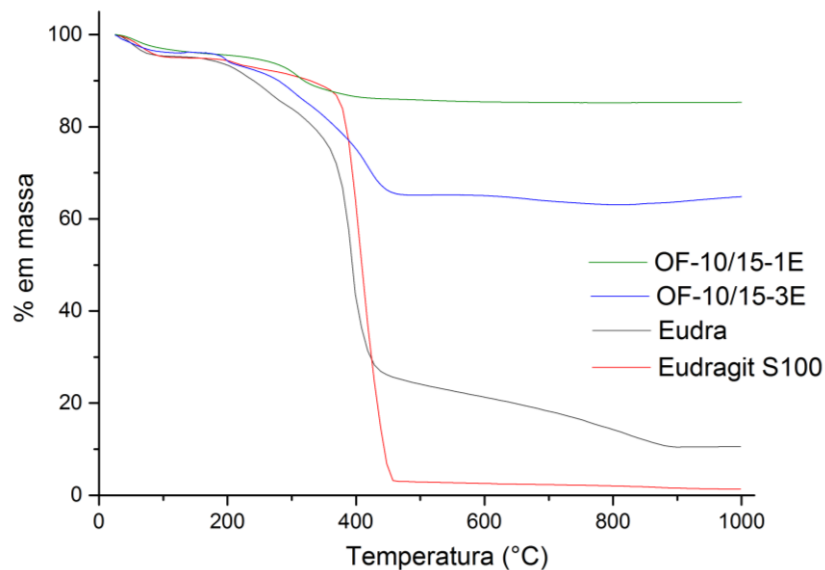
superfície das partículas fazendo papel de funcionalização, mas após esta concentração de saturação o polímero pode influenciar como estabilizante da suspensão de partículas, mas não ficará retido na superfície, sendo removido durante a centrifugação.

Figura 46 - TGA das amostras OF-10/15-1P e OF-10/15-4P ao polímero Pluronic F68 e OF-10/15 como referência de óxido de ferro.



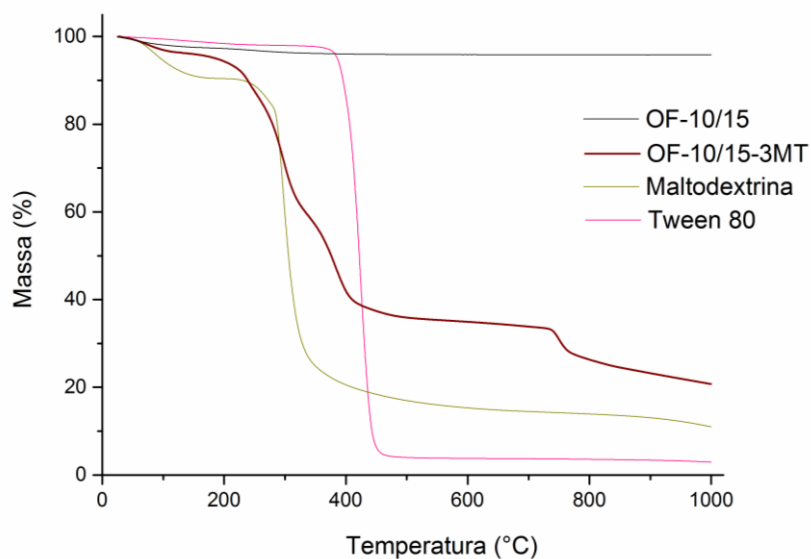
Na análise das amostras de óxido de ferro com Eudragit, OF-10/15-1E, OF-10/15-3E e Eudra (Figura 47), as amostras primeiro perderam água até 100 °C, em torno de 3,1, 3,8 % e 4,6 %, respectivamente. Depois, ocorreu a degradação da porção éster do polímero e, por fim, do esqueleto orgânico do polímero, com pico em torno de 398 °C. OF-10/15-3E (curva azul) teve resíduo final de 64,8 %, com aproximadamente 31 % de massa de polímero degradada, enquanto que OF-10/15-1E (curva verde) teve resíduo de 85,3 % e em torno de 11,5 % de massa de polímero degradada. Eudra apresentou resíduo de 10,5 %, tendo perdido 84,9 % de massa correspondente a polímero e a resíduos da síntese de seu constituinte OF-inicial. Os resíduos finais nestes casos também são essencialmente compostos por óxido de ferro, mas Eudragit S100 não é completamente degradado até 1000 °C – tem resíduo de 1,3 % - e também está presente.

Figura 47 - TGA das amostras OF-10/15-1E, OF-10/15-3E e Eudra em relação ao seu polímero constituinte Eudragit S100.



OF-10/15-3MT e Malto são formadas por óxido de ferro, Tween 80 e Maltodextrina. Os dois últimos, diferentemente de Pluronic e Eudragit, possuem resíduos significativos até 1000 °C, de 2,9 e 11 %, respectivamente. Portanto, o resíduo final daquelas amostras não pode ser atribuído somente ao óxido de ferro. Esta análise corrobora o processo de encapsulação confirmando a presença de ambos os materiais nas partículas.

Figura 48 - TGA da amostra OF-10/15-3MT comparado com OF-10/15, Maltodextrina e Tween 80.



As Tabela 9 e Tabela 10 registram os resíduos das amostras de polímeros com óxido de ferro e dos polímeros apenas, respectivamente.

Tabela 9 - Resíduos de análise termogravimétrica até 1000 °C das amostras com polímeros, em porcentagem da massa inicial.

Amostra	Resíduo
OF-10/15-4P	92,8 %
OF-10/15-1P	93,6 %
PCL 1.0	3,12 %
Eudra	10,5 %
OF-10/15-1E	85,3 %
OF-10/15-3E	64,8 %
Malto	12,4 %
OF-10/15-3MT	20,7 %

Tabela 10 - Resíduos de análise termogravimétrica até 1000 °C dos polímeros e surfactantes utilizados, em porcentagem da massa inicial.

Amostra	Resíduo
Pluronic F68	0,3 %
PCL 10K	0,12 %
Eudragit S100	1,3 %
Maltodextrina	11,0 %
Tween 80	2,9 %

5.2.6 Medidas magnéticas em função de campo H

As amostras de óxido de ferro com polímeros foram submetidas a medidas de magnetização em função do campo externo H aplicado. O gráfico resultante para a temperatura de 1,7 K está registrado na Figura 49 e o gráfico para 300 K está na Figura 50.

Assim como para as amostras de óxido de ferro puro, o comportamento a 300 K é superparamagnético ($M = 0$ quando $H = 0$). Não foi registrada remanência de magnetização quando o campo externo é nulo. A 1,7 K, no entanto, a energia térmica é mínima e ocorreu remanência (menor que 0,4 kOe) após a remoção do campo externo H.

Figura 49 - Magnetização (emu/g) das partículas de óxido de ferro com polímeros em função do campo magnético H , a 300 K.

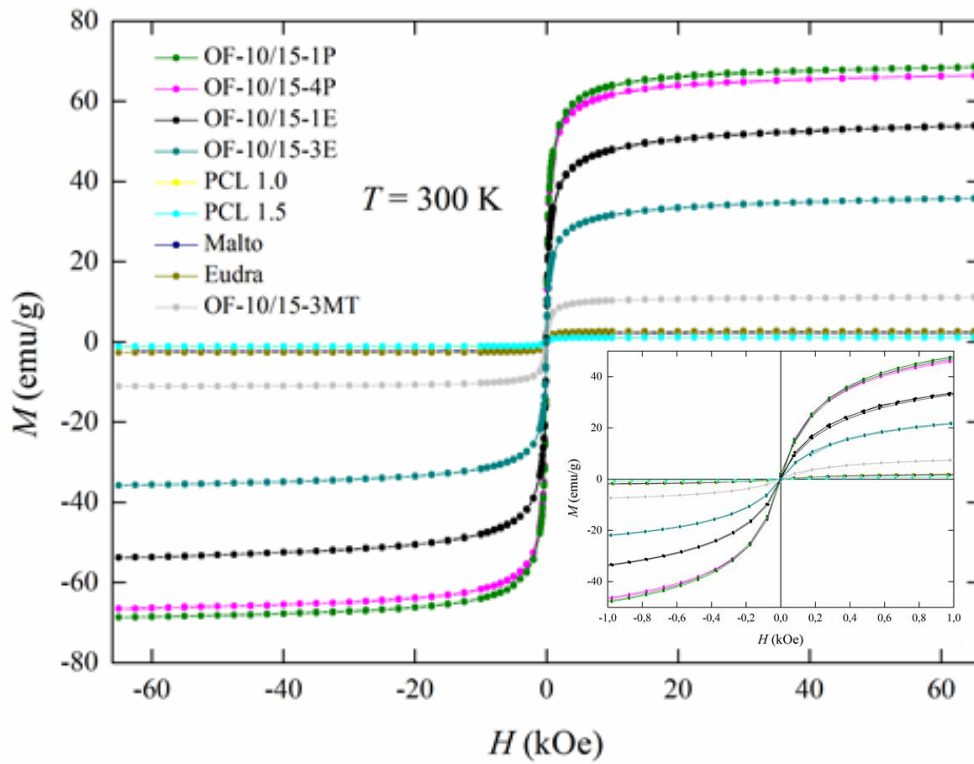
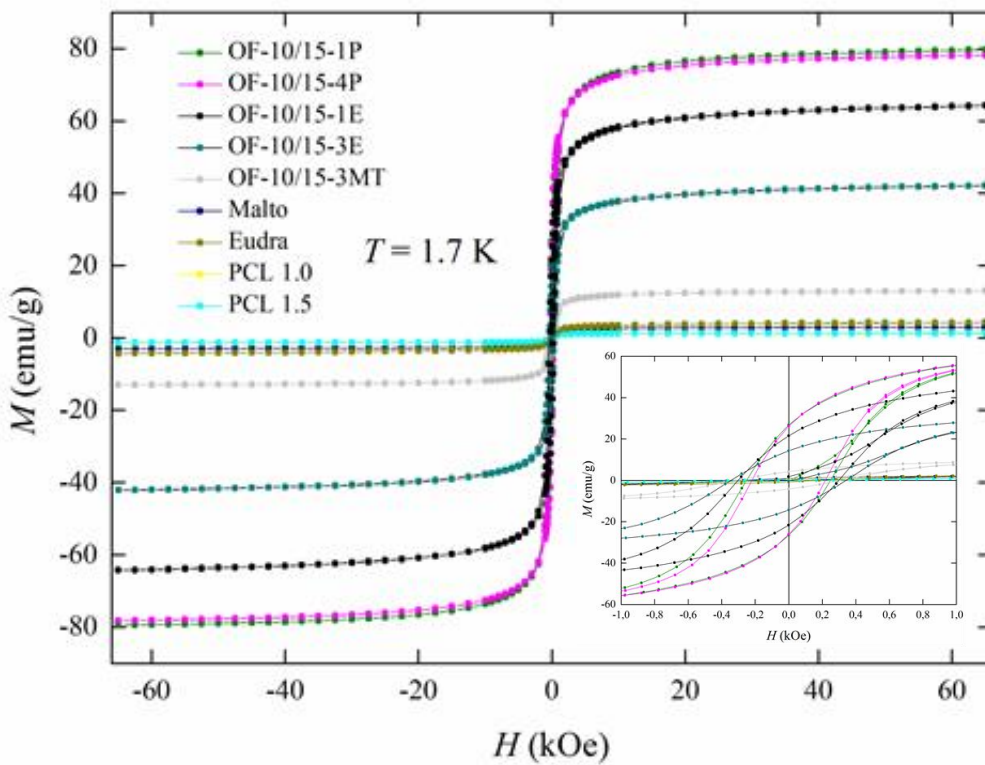


Figura 50 - Magnetização (emu/g) das partículas de óxido de ferro com polímeros em função do campo magnético H , a 1,7 K.



As magnetizações de saturação (até 65 kOe) das amostras analisadas, a 1,7 K e 300 K, estão na Tabela 11.

Tabela 11 - Magnetizações de saturação das amostras com polímeros.

Amostra	Magnetização de Saturação (M_s) (emu/g)	
	300 K	1,7 K
OF-10/15-4P	66,6	78,3
OF-10/15-1P	68,7	79,5
OF-10/15-1E	53,9	64,3
OF-10/15-3E	35,8	42,1
OF-10/15-3MT	11,1	12,9
Eudra	2,6	4,3
Malto	2,3	2,9
PCL 1.0	1,2	1,4
PCL 1.5	1,1	1,3

Como citado na análise das amostras de óxido de ferro puro, o valor de M_s é um parâmetro importante para hipertermia magnética e aumento de contraste para IRM, visto que a SLP e a taxa de relaxação transversa (R_2), melhoram conforme M_s aumenta (YOO, LEE, *et al.*, 2011). OF-10/15-4P, OF-10/15-1P e OF-10/15-1E ultrapassam o valor de M_s do agente de contraste para IRM Feridex® (64,4 emu/g). Tais resultados indicam que essas amostras têm potencial para serem aplicadas como agentes de contraste para imageamento por ressonância magnética.

5.2.7 Medidas magnéticas em função da temperatura

A magnetização das partículas também foi medida em função da temperatura, para obter os gráficos ZFC/FC. Os resultados estão retratados nas Figura 51 e Figura 52.

Figura 51 - Gráfico de magnetização (M) versus temperatura (T) das amostras OF-10/15-1E, OF-10/15-3E, OF-10/15-1P e OF-10/15-4P.

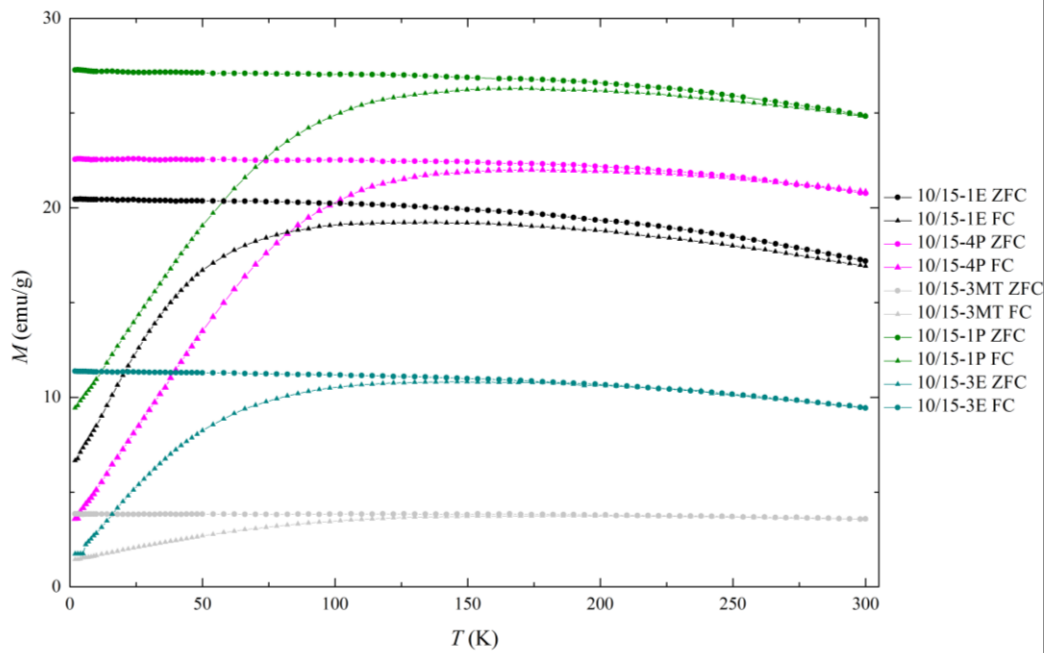
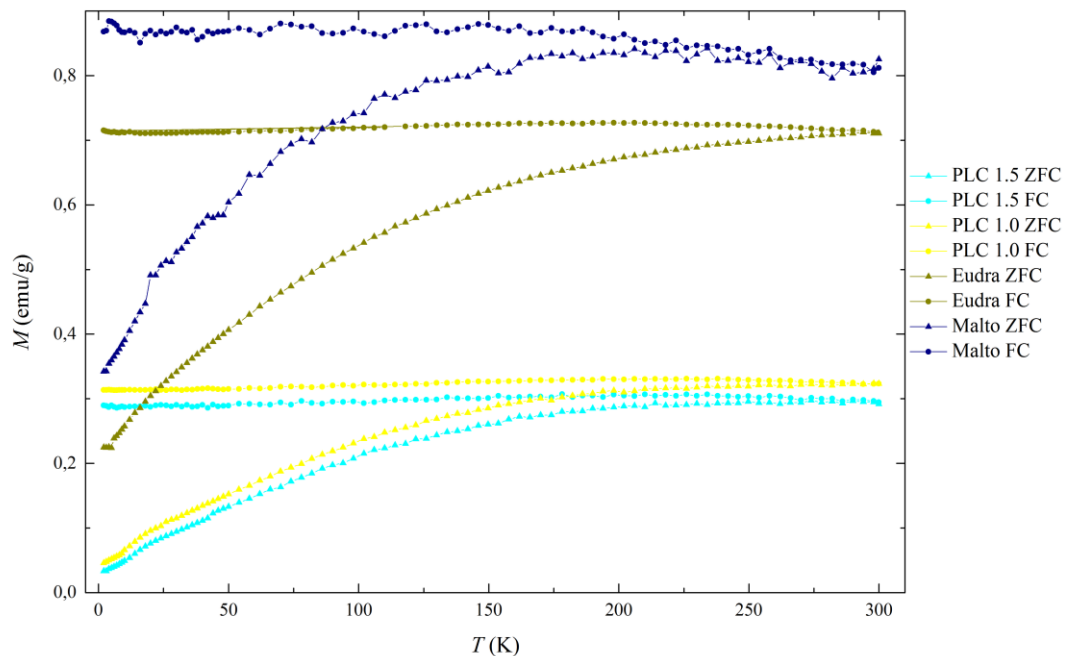


Figura 52 – Gráfico de magnetização (M) versus temperatura (T) das amostras PCL 1.0, PCL 1.5, Eudra e Malto.



A partir dos gráficos ZFC/FC é possível determinar as temperaturas de bloqueio das amostras, considerada como a temperatura de maior valor de magnetização. Elas estão listadas na Tabela 12.

Malto e Eudra têm valores de T_B diferentes, apesar de ambas serem compostas pelas nanopartículas OF-inicial. Eudra apresenta T_B de 254 emu/g, o mesmo valor de OF-inicial, como esperado. Malto apresenta um valor menor, de 207 emu/g.

PCL 1.5 e PCL 1.0 apresentaram T_B maior que 300 K, o que corrobora os valores obtidos para as partículas da amostra OF-30/45, que estão encapsuladas por PCL e Pluronic. Portanto, não são tecnicamente superparamagnéticas a temperatura ambiente, no entanto não apresentam histerese.

Tabela 12 - Temperaturas de Bloqueio das partículas encapsuladas.

Amostra	Temperatura de Bloqueio (T_B) (K)
OF-10/15-4P	172
Malto	207
Eudra	254
PCL 1.5	> 300
PCL 1.0	> 300
OF-10/15-1P	174
OF-10/15-3MT	182
OF-10/15-1E	138
OF-10/15-3E	149

As sínteses de OF-10/15-1P, OF-10/15-4P, OF-10/15-3MT e OF-10/15-1E (que também gerou OF-10/15-3E) diferiram em relação a de OF-10/15 apenas quanto à adição de surfactantes previamente ao gotejamento da base. Em todos os casos, as sínteses com surfactantes produziram partículas com T_B menores do que OF-10/15. Como a T_B aumenta com o aumento do tamanho das partículas, conclui-se que a adição dos surfactantes fez diminuir o tamanho de partícula, ao limitar seu crescimento.

5.2.8 Citotoxicidade

A viabilidade das células HepG2, Hela e 929 foram monitoradas ao serem expostas a diferentes concentrações das amostras OF-10/15-4P, OF-10/15-1P, PCL 1.0 e Malto. Os resultados estão expostos na Tabela 13.

Tabela 13 - Viabilidade das células HepG2, Hela e 929 quando em contato com diferentes concentrações das amostras OF-10/15-4P, OF-10/15-1P, PCL 1.0 e Malto.

	Amostra	Linhagem	Concentração de amostra (mg/mL)							
			Celular	5,04	2,52	1,26	0,63	0,32	0,16	0,08
Viabilidade (%)	OF-10/15-4P	HepG2	125,5	105,7	108,4	110,0	105,8	107,4	103,9	104,8
		Hela	179,4	152,7	131,0	115,6	110,8	109,0	107,4	103,3
		929	58,9	70,5	69,2	81,0	81,4	92,1	96,4	107,2
	OF-10/15-1P	HepG2	-	102,1	94,2	109,4	115,8	116,4	121,9	102,5
		Hela	-	100,9	99,4	106,1	96,6	105,1	93,3	104,2
		929	-	59,0	60,1	68,1	69,6	86,4	90,3	114,1
	PCL 1.0	HepG2	114,5	114,3	113,0	96,7	101,2	105,1	105,8	103,8
		Hela	113,7	123,6	117,6	113,8	110,1	92,3	104,0	104,7
		929	29,2	65,3	76,7	79,7	89,7	93,5	90,4	94,6
	Malto	HepG2	81,2	69,1	61,4	87,8	93,5	99,8	96,6	94,9
		Hela	50,8	60,8	57,1	76,9	90,2	97,8	97,4	100,0
		929	44,0	47,9	56,2	75,9	89,6	94,5	99,8	101,3

A viabilidade da linhagem de células sadias 929 foi reduzida em relação ao controle em todos os casos. No entanto, a IC 50 foi sempre acima de 1,26 mg/mL, o que sugere que as amostras são relativamente seguras (BRACHER, FALLER e SPENGLER, 1988) também em relação a essa linhagem celular.

Assim como para as amostras de apenas óxido de ferro, as linhagens celulares tumorais HepG2 e Hela praticamente não sofreram efeito citotóxico das amostras. Inclusive, as amostras OF-10/15-1P, OF-10/15-4P e PCL 1.0 apresentaram viabilidades acima de 100 %, ou seja, maiores do que a viabilidade das células do grupo controle (que não entraram em contato com nanopartículas). Essas três amostras possuem Pluronic F68 em sua constituição, polímero que reconhecidamente é capaz de aumentar a viabilidade celular, ao formar uma camada que protege as membranas celulares e evita a perda de nutrientes (SAMITH, MINO, *et al.*, 2013). Tais resultados podem sugerir que as partículas com Pluronic têm afinidade com as células tumorais, sendo preferencialmente absorvidas por elas, o que indica um efeito de direcionamento das partículas desenvolvidas. Estes dados podem ser corroborados com trabalhos da literatura que evidenciam o metabolismo aumentado das células tumorais em função da condição de replicação, o que implica em expressão aumentada de receptores na

superfície celular como receptores de colesterol e de demanda diferentes nutrientes para a multiplicação e crescimento celular.

5.2.9 Potencial de aquecimento

Dentre as partículas de óxido de ferro com polímeros, OF-10/15-4P, OF-10/15-1P e OF-10/15-3E foram submetidas ao campo magnético alternado para verificação do seu potencial de produção de calor. Os resultados obtidos estão apresentados nos gráficos das Figura 53 e Figura 54.

Figura 53 - Gráfico de temperatura (°C) versus tempo (s) para amostra OF-10/15-4P, submetida a um campo magnético de 112 kHz e amplitude de 25 mT pico-a-pico. O campo foi interrompido no momento indicado pela barra vertical que corta as curvas.

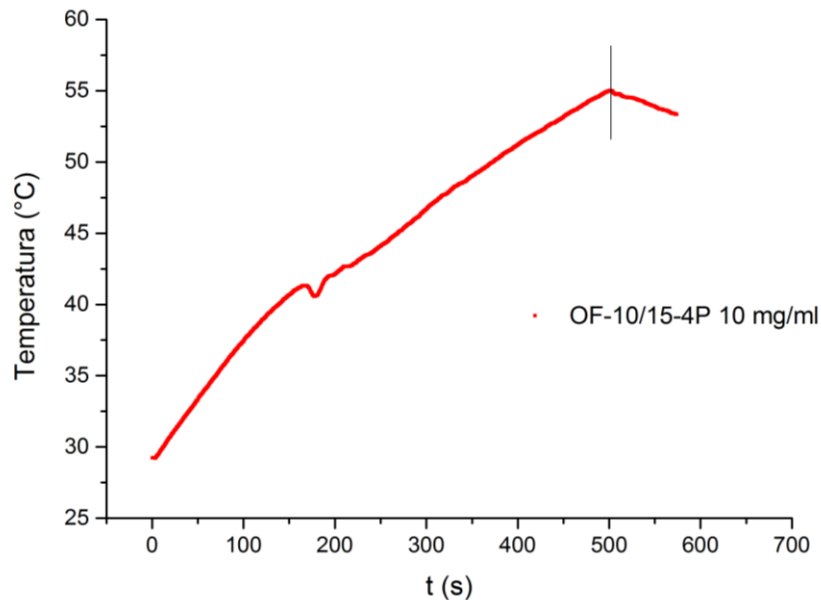
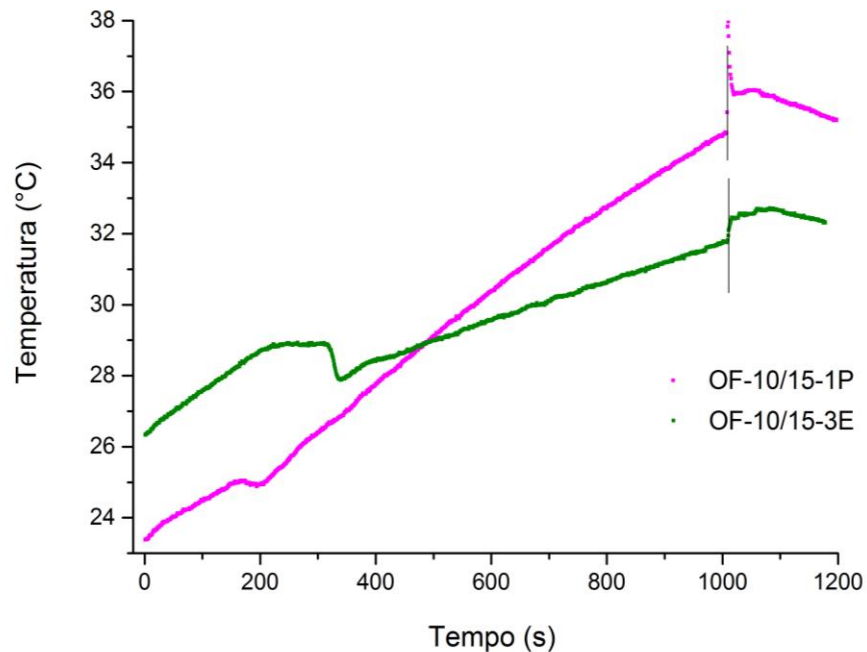


Figura 54 - Gráfico de temperatura (°C) versus tempo (s) para as amostras OF-10/15-1P e OF-10/15-3E, submetidas a um campo magnético de 112 kHz e amplitude de 25 mT pico-a-pico. O campo foi interrompido no momento indicado pela barra vertical que corta as curvas.



Os valores de SAR estão calculados abaixo:

- OF-10/15-4P, 10 mg/mL:

$$\text{SAR} = C \cdot \Delta T / \Delta t = 8,372 \cdot (54,34 - 29,22) / 6 = 35,0 \text{ J/min} = 583 \text{ mW};$$

- OF-10/15-1P, 10 mg/mL:

$$\text{SAR} = C \cdot \Delta T / \Delta t = 8,372 \cdot (34,40 - 23,38) / 16 = 5,8 \text{ J/min} = 97 \text{ mW};$$

- OF-10/15-3E, 10 mg/mL:

$$\text{SAR} = C \cdot \Delta T / \Delta t = 8,372 \cdot (31,49 - 26,34) / 16 = 2,7 \text{ J/min} = 45 \text{ mW}.$$

Nota-se que as partículas foram capazes de aquecer o meio em mais de 5 °C, variação de temperatura capaz de colocar o alvo tumoral em situação de hipertermia e de matar as células ali presentes. Portanto, esses resultados indicam que as amostras apresentam potencial de geração de calor adequado para serem aplicadas como plataforma para o tratamento de câncer por hipertermia.

No entanto, apesar de possuir magnetização de saturação semelhante que OF-10/15-4P, a amostra OF-10/15-1P apresenta SAR aproximadamente 6 vezes menor. Isso pode ser

atribuído em parte ao fato de que as nanopartículas de óxido de ferro presentes em OF-10/15-1P estão confinadas pela encapsulação, o que diminui a liberação de energia por efeito browniano, visto que a área de contato das partículas com o meio aquoso é reduzida. Portanto, o ideal seria que a encapsulação polimérica seja eficiente para aproveitar as vantagens do revestimento polimérico, como promoção de biodisponibilidade e penetração intracelular, porém com a liberação controlada e eficiente das nanopartículas magnéticas após atingirem o alvo tumoral. Seria válido um estudo para avaliar a liberação das nanopartículas pelas amostras em diferentes condições, como pH e temperatura, e suas consequências no potencial de aquecimento. O polímero Eudragit S100®, por exemplo, é indicado para *drug-delivery* ao intestino, pois se dissolve em pH básico; portanto, as amostras OF-10/15-1E, OF-10/15-3E e Eudra poderiam liberar as nanopartículas magnéticas ao atingirem um tumor no intestino após administração oral, favorecendo a geração de calor.

6. Conclusão

Finalmente, este trabalho possibilitou aperfeiçoar a síntese de óxido de ferro nanométrico, pela técnica de coprecipitação, empregando soluções de cloreto férrico e cloreto ferroso em meio aquoso. Foi mostrado que a diminuição da concentração dos reagentes de Fe e a presença de estabilizantes como surfactantes e polímeros na síntese diminuem o tamanho das partículas e, conseqüentemente, sua temperatura de bloqueio, o que possibilita a formação de nanopartículas superparamagnéticas a temperatura ambiente.

A técnica de *nano spray drying*, utilizada de forma inédita para nanopartículas magnéticas, foi capaz de realizar sua encapsulação com diferentes matrizes poliméricas de Pluronic F68, Eudragit® S100, PCL, Maltodextrina, além de Tween 80. As partículas formadas são nanoestruturadas, com tamanhos desde 500 nm a 1500 µm, em sua maioria de forma aproximadamente esférica, como verificado por MEV e DLS. A quantidade de óxido de ferro encapsulada variou desde 3 % a 93 %, de acordo com TGA.

Também foi possível verificar a segurança biológica das partículas, através dos testes de citotoxicidade empregando diferentes linhagens celulares. As partículas de óxido de ferro puras e encapsuladas não apresentaram efeitos citotóxicos, além de uma absorção preferencial pelas células tumorais no caso das que tinham presença de Pluronic F68, o que

pode indicar um possível direcionamento sítio específico, interessante para tratamento do câncer.

Os resultados de potencial de aquecimento após aplicação de campo magnético alternado sugerem que as amostras obtidas têm a capacidade de serem usadas no tratamento de câncer por hipertermia magnética. Os resultados de magnetização também sugerem que as partículas magnéticas encapsuladas têm potencial de serem aplicadas no imageamento por ressonância magnética, em função dos valores obtidos de magnetização de saturação, que chegam a 68,7 emu/g (a 300 K), e de temperatura de bloqueio. Desta forma, estas partículas têm potencial de combinação de um agente de terapia e diagnóstico em uma mesma nanoestrutura, e possibilidade de acompanhamento da evolução da terapia, podendo ser caracterizadas como um sistema “theranostic”.

Em trabalhos futuros, pode ser pensado em um estudo de liberação controlada das nanopartículas de óxido de ferro, dependente de condições biológicas, como pH, para atingir o completo potencial de aquecimento das nanopartículas, uma vez que este é limitado ao mantê-las encapsuladas. Adicionalmente ao óxido de ferro, a técnica de *nano spray drying* possibilita a encapsulação concomitante de outros ativos, como um fármaco. Desta forma, ao liberar o encapsulado, as partículas geradas poderiam combinar os efeitos da hipertermia e da quimioterapia. Também, é possível funcionalizar a matriz polimérica com sinalizadores celulares, como proteínas, que podem tornar as partículas mais seletivas às células tumorais.

Concluindo, foi possível sintetizar nanopartículas de óxido ferro superparamagnéticas por coprecipitação, assim como empregar a técnica de *nano spray drying* para a encapsulação polimérica destas nanopartículas e com potencial para aplicação no tratamento de câncer por hipertermia.

Referências Bibliográficas

(INCA), INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2014 - Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: [s.n.], 2014.

AHMADI, R. et al. Ultrasonic-assisted synthesis of magnetite based MRI contrast agent using cysteine as the biocapping coating. **MATERIALS CHEMISTRY AND PHYSICS**, Lausanne, v. 131, n. 1-2, p. 170-177, Dezembro 2011.

AKBARZADEH, A. et al. Preparation and in vitro evaluation of doxorubicin-loaded Fe₃O₄ magnetic nanoparticles modified with biocompatible copolymers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 511-526, 2012.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Treatment Types. **American Cancer Society**, 2015. Disponível em: <<http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/>>. Acesso em: 25 Novembro 2015.

ANDRADE, A. et al. Coating Nanomagnetic Particles for Biomedical Applications. In: FAZEL-REZAI, R. **Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges**. [S.l.]: InTech, 2011. Cap. 8.

ANSELMO, A.; MITRAGOTRI, S. A Review of Clinical Translation of Inorganic Nanoparticles. **AAPS JOURNAL**, v. 17, n. 5, p. 1041-1054, 2015.

BALIVADA, S. et al. A/C magnetic hyperthermia of melanoma mediated by iron(0)/iron oxide core/shell magnetic nanoparticles: a mouse study. **BMC Cancer**, v. 10, 2010.

BATRAKOVA, E. V.; KABANOV, A. V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. **Journal of Controlled Release**, April 2008.

BRACHER, M.; FALLER, C.; SPENGLER, J. Comparison of in vitro cell toxicity with in vivo eye irritation. **Mol Toxicol**, v. 4, p. 561-70, 1988.

BREZOVICH, I. A.; ATKINSON, W. J.; LILLY, M. B. Local Hyperthermia with Intestinal Techniques. **Cancer Research**, v. 44, n. 10, p. 4752-4756, 1984.

BUCHI. **Operation Manual Nano Spray Dryer B-90**. Version B. ed. Flawil: BUCHI, 2009.

CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos Polímeros: um teste básico para tecnólogos e engenheiros**. 2ª. ed. São Paulo - SP: Artliber Editora Ltda., 2006.

CARARETO, N. D. D. et al. Water Activity of Aqueous Solutions of Ethylene Oxide-Propylene Oxide Block Copolymers and Maltodextrins. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 173-181, 2010.

CAVALIERE, R. et al. Selective Heat Sensitivity of Cancer Cells - Biochemical and Clinical Studies. **CANCER**, Nova Iorque, v. 20, n. 9, p. 1351-1381, Setembro 1967.

CHERTOK, B. et al. Glioma Selectivity of Magnetically Targeted Nanoparticles: A Role of Abnormal Tumor Hydrodynamics. **JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE**, Amsterdã, v. 122, n. 3, p. 315-323, Outubro 2007.

CORCHERO, J. L.; VILLAVERDE, A. Biomedical applications of distally controlled magnetic nanoparticles. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 468-476, 2009.

CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. **The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses**. Second Edition. ed. [S.l.]: Wiley Online Library, 2004.

CULLITY, B. D.; GRAHAM, C. D. **Introduction to Magnetic Materials**. Second Edition. ed. Piscataway, NJ: IEEE Press, 2009.

EVONIK INDUSTRIES. Disponível em: <<http://eudragit.evonik.com/product/eudragit/en/products-services/eudragit-products/enteric-formulations/s-100/pages/default.aspx>>. Acesso em: 26 Janeiro 2015.

GORDON, R. T.; HINES, J. R.; GORDON, D. Intracellular hyperthermia a biophysical approach to cancer treatment via intracellular temperature and biophysical alterations. **Medical Hypotheses**, v. 5, n. 1, p. 83-102, 1979.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **BIOMATERIALS**, Oxford, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, Junho 2005.

HAGGAG, Y. A.; FAHEEM, A. M. Evaluation of nano spray drying as a method for drying and formulation of therapeutic peptides and proteins. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6:140, 2015.

HARSHA, S. N. et al. Nanoparticle formulation by Büchi B-90 Nano Spray Dryer for oral mucoadhesion. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 273–282, 2015.

JOHANNSEN, M. et al. Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer. **International Journal of Hyperthermia**, v. 26, n. 8, p. 790-795, 2010.

JORDAN, A. (. A. et al. The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 78, n. 1, p. 7-14, 2006.

KARAAGAC, O. et al. A Simple Way to Synthesize Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles in Air Atmosphere: Iron Ion Concentration Effect. **IEEE TRANSACTIONS ON MAGNETICS**, Piscataway, v. 46, n. 12, p. 3978-3983, Dezembro 2010.

KRAWCZYKA ET AL. Mild hyperthermia inhibits homologous recombination, induces BRCA2 degradation, and sensitizes cancer cells to poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibition. **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA**, Washington, v. 108, n. 24, p. 9851-9856, Junho 2011.

LEE, S. H. et al. Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1-2, p. 192-200, 2011.

LI, X. et al. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. **JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE**, Amsterdã, v. 147, n. 2, p. 304-310, Outubro 2010.

LU, A.-H.; SALABAS, E. L.; SCHUTH, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. **ANGEWANDTE CHEMIE-INTERNATIONAL EDITION**, Weinheim, v. 46, n. 8, p. 1222-1244, 2007.

MA, G.; SONG, C. PCL/Ploxamer 188 Blend Microsphere for Paclitaxel Delivery: Influence of Ploxamer 188 on Morphology and Drug Release. **JOURNAL OF APPLIED POLYMER SCIENCE**, Hoboken, v. 104, n. 3, p. 1895-1899, Maio 2007.

MA, Y. et al. Nanoparticle formulation of poly(3-caprolactone-co-lactide)-D-a-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate random copolymer for cervical cancer treatment. **POLYMER**, Oxon, v. 51, n. 25, p. 5952-5959, Novembro 2010.

MAIER-HAUFF, K. et al. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: Results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 81, n. 1, p. 53-60, 2007.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. **Zetasizer Nano Series – User Manual**. 1.1. ed. Worcestershire: [s.n.], 2013.

MEI, L. et al. A Novel Docetaxel-Loaded Poly (ε-Caprolactone)/Pluronic F68 Nanoparticle Overcoming Multidrug Resistance for Breast Cancer Treatment. **NANOSCALE RESEARCH LETTERS**, Nova Iorque, v. 4, n. 12, p. 1530-1539, Dezembro 2009.

MONDOVI, B. et al. Biochemical Mechanism of Selective Heat Sensitivity of Cancer Cells. 2. Studies on Nucleic Acids and Protein Synthesis. **EUROPEAN JOURNAL OF CANCER**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 137-146, 1969.

MORNET, S. et al. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. **JOURNAL OF MATERIALS CHEMISTRY**, Cambridge, v. 14, n. 14, p. 2161-2175, Junho 2004.

MOROS, M. et al. Monosaccharides versus PEG-Functionalized NPs: Influence in the Cellular Uptake. **ACS NANO**, Washington, v. 6, n. 2, p. 1565-1577, Fevereiro 2012.

NOHYUN LEE, H. K. S. H. C. M. P. D. K. H.-C. K. Y. C. S. L. B. H. K. H. S. J. H. K. K. S. P. W. K. M. A. T. H. Magnetosome-like ferrimagnetic iron oxide nanocubes for highly sensitive MRI of single cells and transplanted pancreatic islets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 7, p. 2662-2667, 2011.

OLIVEIRA, A. M. D. **Obtenção de nanopáticas sensíveis a temperatura e pH a partir de copolímeros em bloco constituídos de poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) e poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico) sintetizado via RAFT visando aplicação em encapsulação**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2008.

OLIVEIRA, A. M. et al. Nano Spray Drying as an Innovative Technology for Encapsulating Hydrophilic Active Pharmaceutical Ingredients (API). **Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 4:6, 2013.

PANKHURST, Q. et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **JOURNAL OF PHYSICS D-APPLIED PHYSICS**, Bristol, v. 36, n. 13, p. R167-R181, Julho 2003.

PARK, S. et al. Pluronic@Fe₃O₄ nanoparticles with robust incorporation of doxorubicin by thermo-responsiveness. **INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS**, Amsterdã, v. 424, n. 1-2, p. 107-114, Março 2012.

PETCHAROEN, K.; SIRIVAT, A. Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method. **Materials Science and Engineering B**, Bangkok, v. 177, n. 5, p. 421-427, Março 2012.

QING QU, L. L. W. B. C. Y. C.-N. C. Effects of NaCl and NH₄Cl on the initial atmospheric corrosion of zinc. **Corrosion Science**, Kunming, v. 47, n. 11, p. 2832-2840, Novembro 2015.

RÉ, M. I. Formulating Drug Delivery Systems by Spray Drying. **DRYING TECHNOLOGY**, Philadelphia, v. 24, n. 4, p. 433-446, 2006.

SALUNKHE, A. B.; KHOT, V. M.; PAWAR, S. H. Magnetic Hyperthermia with Magnetic Nanoparticles: A Status Review. **CURRENT TOPICS IN MEDICINAL CHEMISTRY**, Maharashtra, v. 14, 2014.

SAMITH, V. D. et al. Effects of pluronic F68 micellization on the viability of neuronal cells in culture. **JOURNAL OF APPLIED POLYMER SCIENCE**, Santiago, v. 130, n. 3, p. 2159-2164, Novembro 2013.

SHUBITIDZE, F. et al. Magnetic nanoparticles with high specific absorption rate of electromagnetic energy at low field strength for hyperthermia therapy.

SIGMA-ALDRICH. 440752 ALDRICH, 2015. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/440752?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 10 Fevereiro 2015.

SIGMA-ALDRICH. P1300 SIGMA, 2015. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p1300?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 10 Fevereiro 2015.

SIGMA-ALDRICH. W291706 ALDRICH, 2015. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w291706?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 10 Fevereiro 2015.

SILVA, A. C. et al. Application of hyperthermia induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in glioma treatment. **INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE**, Albany, v. 6, p. 591-603, 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7. ed. [S.l.]: Wiley, 2005.

SUN, W. et al. Specific role of polysorbate 80 coating on the targeting of nanoparticles to the brain. **BIOMATERIALS**, Oxon, v. 25, n. 15, p. 3065-3071, Julho 2014.

SUR, I. et al. Interaction of multi-functional silver nanoparticles with living cells. **NANOTECHNOLOGY**, Bristol, v. 21, n. 17, Abril 2010.

THIESEN, B.; JORDAN, A. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. **International Journal of Hyperthermia**, v. 24, n. 6, p. 467-474, 2008.

TONG, S. et al. Coating Optimization of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for High T-2 Relaxivity. **Nano Letters**, Atlanta, v. 10, n. 11, p. 4607-4613, 2010.

VALLEJO-FERNANDEZ, G. et al. Mechanisms of hyperthermia in magnetic nanoparticles. **JOURNAL OF PHYSICS D-APPLIED PHYSICS**, Bristol, v. 46, n. 31, Agosto 2013.

WANG, N. et al. Magnetic nanoparticles (MNPs) covalently coated by PEO–PPO–PEO block. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 395, p. 50-57, 2013.

WOHLFART, S.; GELPERINA, S.; KREUTER, J. Transport of drugs across the blood–brain barrier by nanoparticles. **JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE**, Amsterdã, v. 161, n. 2, p. 264-273, Julho 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 30 Janeiro 2015.

XIONG, J. et al. Ultrasonic dispersion of nano TiC powders aided by Tween 80 addition. **Ceramics International**, v. 38, n. 3, p. 1815-1821, 2012.

XIONG, X. Y.; TAM, K. C.; GAN, L. H. Synthesis and thermally responsive properties of novel pluronic F87/polycaprolactone (PCL) block copolymers with short PCL blocks. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 100, n. 5, p. 4163-4172, 2006.

YOO, D. et al. Theranostic Magnetic Nanoparticles. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, p. 863–874, 2011.