

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

CAIO JOSÉ PERECIN

Plataforma magnética multifuncional de magnetita
funcionalizada com diferentes ligantes para aplicações
biológicas

São Carlos

2021

CAIO JOSÉ PERECIN

Plataforma magnética multifuncional de magnetita
funcionalizada com diferentes ligantes para aplicações
biológicas

Tese de doutorado apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos para a obtenção do título
de doutor em Ciências.

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Laudemir Carlos Varanda

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura:



Data:

30/04/2021

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Percin, Caio José

Plataforma magnética multifuncional de magnetita funcionalizada com diferentes ligantes para aplicações biológicas / Caio José Percin. — São Carlos, 2021.

116 f.

Tese (Doutorado em Físico-Química) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Laudemir Carlos Varanda

1. Nanopartículas. 2. Materiais magnéticos. 3. Polimerização. 4. Tratamento de câncer. I. Título.

Sônia Alves - CRB: 4280/8



AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Gláucia e Sérgio. Pelo apoio em toda minha formação, por sempre transmitirem valores fundamentais de caráter e por incentivarem o espírito questionador em mim e em meu irmão Danilo, a quem também agradeço a companhia desde quase o início. Agradeço a toda a minha família.

Agradeço à minha companheira Lorena. Por topar nossa parceria em tudo, no amor, nos trabalhos, nos boletos, nas viagens, juntos em casa ou no vídeo do celular. Por toda a paciência e resiliência na nossa luta para sermos sempre melhores um para o outro e para o mundo.

Agradeço ao Professor Laudemir. Por ensinar e instigar a me tornar um cientista melhor, segurando o balão volumétrico, a xícara de café ou o copo americano. E agradeço muito aos amigos do grupo de Materiais Coloidais: Daniel, João, Mônica, Bruno, Herbert, Natálias 1 e 2, Derik, Beatriz, Maria e mais, pelo apoio fundamental, cada um à sua maneira.

Agradeço à minha coorientadora Natália. Por ensinar e acreditar em mim, desde o mestrado até os projetos no Instituto de Pesquisas Tecnológicas, espero poder retribuir ao máximo. Também agradeço aos líderes Beatriz, Adriano e Bruno, e aos amigos Sheila, Bianca, Cyro, Wellington, Kelly, Aline, Henrique, Gabriel, Hossein e mais, pelo apoio sempre que precisei.

Agradeço ao meu supervisor na Itália, Davide. Por me acolher de forma fantástica e me apresentar ao melhor que a Ciência faz no mundo sobre polímeros, junto com amigos Juri, Mattia, Renato, Ruggiero, Matteo, Mateus, Arianna e Nicolò. E agradeço muito aos amigos Guido e Gabriel pela amizade *nel bel paese*.

Agradeço à toda comunidade do Instituto de Química de São Carlos e da Universidade de São Paulo por toda a estrutura para a minha formação acadêmica. Agradeço aos Professores do Instituto de Física Nagamine, Cornejo, Sérgio e Valmir pelas colaborações para as questões magnéticas, e ao Professor Fillipe e sua aluna Gabriela da Universidade Federal de São Carlos pelos experimentos de citotoxicidade.

Agradeço também à CAPES e à Fundação IPT pelas bolsas concedidas.

RESUMO

PERECIN, C. J. **Plataforma magnética multifuncional de magnetita funcionalizada com diferentes ligantes para aplicações biológicas**. 2021. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Nanopartículas de magnetita oferecem grande potencial para aplicações em biomedicina, na forma de plataformas multifuncionais para terapia e diagnóstico de doenças. Uma em especial é o tratamento de câncer por hipertermia magnética, para a qual se busca partículas com propriedades otimizadas, sendo tanto as intrínsecas, como morfologia e magnetização, quanto as de superfície, através de ligantes que atribuam estabilidade coloidal e potencial de toxicidade seletivo para as células tumorais. Neste trabalho, foram trabalhadas as duas frentes: a síntese das nanopartículas de magnetita e a síntese de polímeros para sua encapsulação em associação a fármacos. Na primeira, dedicada ao desenvolvimento de rota de redução-precipitação, foram avaliados diferentes parâmetros de síntese como temperatura, pH e natureza de reagentes, visando controlar as características dos produtos, e seus resultados foram discutidos com bases nas teorias de nucleação e crescimento. As nanopartículas obtidas são, em geral, de fase principal magnetita, monodispersas, com tamanho em torno de 11 nm, superparamagnéticas e com alta taxa de absorção específica (SAR) para hipertermia. As aplicações de etapa de nucleação a 90 °C, excesso de hidroxila de 0,1-0,2 mol/L e envelhecimento da suspensão por 18 h se mostraram eficientes para aumentar o SAR, relacionado ao aumento do tamanho de partícula. Na segunda frente, foram produzidos polímeros baseados na molécula dopamina, devido à sua afinidade à superfície do óxido de ferro, por duas estratégias: sua própria polimerização a polidopamina e seu acoplamento a copolímeros de bloco de caprolactona (CL) e 2-metacriloiloxietil fosforilcolina (MPC), em diferentes proporções, obtidos por polimerização de Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação (RAFT). Através dos processos de encapsulação, foram formadas nanopartículas de magnetita envoltas pelos polímeros, de tamanhos finais em geral menores que 200 nm. A encapsulação de fármaco dexametasona foi realizada com eficiência de 75%, contando com a afinidade ao bloco hidrofóbico de CL. As partículas mantiveram suas propriedades de superparamagnetismo e de alto SAR após encapsulação, validando as estratégias para a obtenção de plataformas de compósitos magnéticos para a área biomédica.

Palavras-chave: Nanopartículas. Materiais magnéticos. Polimerização. Tratamento de câncer.

ABSTRACT

PERECIN, C. J. **Multifunctional magnetic platform of magnetite functionalized with different ligands for biological applications.** 2021. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Magnetite nanoparticles offer great potential for applications in biomedicine, in the form of a single multifunctional platform for therapy and diagnostic of diseases. A special application is the cancer treatment by magnetic hyperthermia, for which are required particles with optimized properties, being the intrinsic ones, such as its morphology and magnetization, and the surface ones, through the coupling of ligands that attribute colloidal stability and selective toxicity potential against the tumor cells. In this work, the two fronts were studied: the synthesis of magnetite nanoparticles and the synthesis of polymers for their encapsulation in association with drugs. In the first one, dedicated to the development of the reduction-precipitation route, several synthesis parameters were evaluated such as temperature, pH, and nature of reagents, in order to control the characteristics of the products, and their results were discussed according to the nucleation and growth theories. The obtained nanoparticles are, in general, composed of magnetite phase, monodisperse, with size around 11 nm, superparamagnetic, and with high specific absorption rate (SAR) for hyperthermia. The application of nucleation step at 90 °C, hydroxyl excess of 0.1-0.2 mol/L, and aging of suspension for 18 h were efficient to enhance SAR, which is related to the increase of particle size. In the second front, were produced polymers based on the dopamine molecule, due to its affinity to the iron oxide surface, by two strategies: its own polymerization to polydopamine and its coupling to block copolymers of caprolactone (CL) and 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC), with different proportions, which were obtained by Reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization (RAFT). The encapsulation processes allowed the formation of magnetite nanoparticles coated by the polymers, with final sizes usually smaller than 200 nm. The encapsulation of the dexamethasone drug was performed with efficiency of 75%, based on its affinity to the hydrophobic block of CL. The particles kept their properties of superparamagnetism and high SAR after the encapsulation, validating the strategies to obtain the platforms of magnetic composites for the biomedical field.

Keywords: Nanoparticles. Magnetic materials. Polymerization. Cancer therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquemas das respostas da magnetita ao campo magnético como material multidomínio ou superparamagnético (a) e das nanopartículas durante relaxações de Néel (b) e browniana (c).	17
Figura 2 – Esquemas das teorias de nucleação clássica e não-clássica.....	20
Figura 3 - Esquemas do sistema montado (a) e das etapas da rota (b) de síntese de nanopartículas de magnetita.	25
Figura 4 - Difratogramas de raios X das amostras de nanopartículas comparadas com referência de magnetita.	33
Figura 5 - FTIR de amostras de magnetita sintetizadas com cloreto férrico.....	34
Figura 6 – Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) da amostra M1 (a) e histograma de tamanho com ajuste pela distribuição lognormal (b).	36
Figura 7 – MET da amostra M4 (a) e histograma de tamanho de partículas de M4, com ajuste pela distribuição lognormal (b).	36
Figura 8 - FTIR de amostras com agitação durante envelhecimento.	38
Figura 9 – Imagens de microscopia da amostra M14 com diferentes tempos de envelhecimento.	39
Figura 10 – Imagens de MET das amostras M17 e M19.....	41
Figura 11 – Imagens de MET da amostra M21.....	41
Figura 12 - Evolução do pH do meio reacional durante o envelhecimento, para diferentes excessos de base.	42
Figura 13 – Resultados de DRX e FTIR das amostras sintetizadas com diferentes excessos de base. ..	43
Figura 14 – Resultados de espectroscopia Mössbauer das amostras C.01 e C.02.....	44
Figura 15 – Imagens de MET das nanopartículas de magnetita C.005, C.01, C.02, C.04 e C.06 e suas distribuições de tamanho.....	45
Figura 16 – Imagens de MET das amostras Cc.01 (esquerda), Cc.04 (centro) e Cc.06 (direita).....	45
Figura 17 - Amostras S31, S21, S11, S23 e S12, de pó das cores cor marrom claro, duas de tom marrom escuro e duas últimas pretas, respectivamente.....	48
Figura 18 – Difratogramas de raios X (a) e espectros de FTIR (b) das amostras sintetizadas com $Fe_2(SO_4)_3$	49
Figura 19 – Imagens de MET das amostras S23 (esquerda) e S12 (direita).	50
Figura 20 – Resultados de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das amostras M10 (esquerda) e C.06 (direita).....	52
Figura 21 - Curvas de magnetização em função de campo auxiliar H aplicado, para 7 amostras diferentes de magnetita.	54
Figura 22 – Curvas de magnetização em função de campo auxiliar H aplicado das amostras do grupo de estudo do pH.	55
Figura 23 – Correlação entre coercividade e tamanho de cristalito para as amostras de magnetita, com curva exponencial como guia.	56
Figura 24 – Resultados de hipertermia de M9 (a) e S12 (b) em concentrações de 3 mg/mL e 5 mg/mL.	57
Figura 25 - Resultados de hipertermia pela aplicação de campo magnético de 109 kHz e 25 mT.	57
Figura 26 - Correlações entre M_{250} (a) e tamanho de cristalito (b) e os resultados de SAR, com curvas exponenciais como guias.....	59
Figura 27 – Resultados de SAR das amostras sintetizadas em diferentes valores de pH, realizados em 3 condições de campo. SAR calculado por ajuste Box Lucas.....	61
Figura 28 – Resultados de viabilidade celular de acordo com a concentração de nanopartículas C.02, para as linhagens MDA (a), DU-145 (b), A549 (c) e MRC5 (d).....	62

Figura 29 – Mecanismo proposto para a polimerização de dopamina (a- oxidação, b- ciclização, c- rearranjo, d- dismutação).	68
Figura 30 - Esquema de nanopartícula polimérica formada por copolímeros de blocos hidrofílico e hidrofóbico, com fármaco encapsulado.	71
Figura 31 - Reações químicas realizadas para a obtenção do macromonômero CLnDopa.	77
Figura 32 – Representação da reação química da síntese de polímero MPC com n monômeros.....	78
Figura 33 - FTIR de amostras de magnetita com polidopamina, em comparação com a amostra de magnetita e com a amostra apenas de polidopamina.....	81
Figura 34 - Imagens de MET das amostras MD1, MD8 e MD9.	82
Figura 35 – Imagens de MET de MD11, MD12, MD13 e MD14.	83
Figura 36 – Diâmetro hidrodinâmico (D_H , da distribuição por número) e potencial zeta (PZ) da amostra MD1 em diferentes valores de pH.	84
Figura 37 - Resultados de DLS das amostras com polidopamina de diâmetro hidrodinâmico (D_H) por intensidade, potencial zeta (PZ) e índice de polidispersividade (PDI).....	84
Figura 38 – Fotos das amostras em tubos de diálise imersos em água com diferentes valores de pH. No começo (a) e depois de 140 h (b). Espectro de absorvância da liberação de rodamina de acordo com o tempo em pH 5,5 (c) e detalhe do pico em 552 nm (d).	85
Figura 39 – Resultados do aumento da Abs em 553 nm, referente à absorção da rodamina, através da sua liberação ao longo do tempo, em diferentes valores de pH.	86
Figura 40 - Magnetização de MD11 em comparação com M15 (a) e resultado de hipertermia de MD1 a 3 mg/mL (b).	87
Figura 41 - Estrutura química e resultado de análise de RMN 1H da amostra CL3 (n=3).....	88
Figura 42 – Resultados de GPC dos macromonômeros CLnSA.	89
Figura 43 - Resultado de RMN do polímero PMPC e detalhe das estruturas químicas com as identificações dos carbonos.	90
Figura 44 – Resultados de FTIR dos polímeros sintetizados. As setas vermelhas indicam as bandas referentes ao MPC e as azuis, as referentes ao CL3Dopa.	92
Figura 45 - FTIR das amostras de magnetita (Mag, C.01), polímero (P730) e partícula revestida (MP730). Setas vermelhas indicam bandas de MPC; azuis, de CL7Dopa; e pretas, de magnetita.	93
Figura 46 - Resultado de análise TG das amostras C.01, MP310, MP510, MP710 e P710.....	94
Figura 47 – Esquemas das estruturas das nanopartículas somente poliméricas (a) e de magnetita revestida com polímeros (b).	95
Figura 48 - Resultados de DLS de amostras de magnetita encapsuladas, MP310 sintetizada por dois métodos (a) e MP720 (b), comparados às nanopartículas de magnetita e de polímeros.....	97
Figura 49 – Imagens de MET de amostra M17 recoberta com P310, MP310.	98
Figura 50 – Imagens de MET da amostra C.01 encapsulada com P730, M730.	99
Figura 51 – Perfil de liberação de dexametasona de partículas MP730 de acordo com o tempo. ...	100
Figura 52 - Resultados de magnetização (a) e de hipertermia (b) das amostras de magnetita com polímeros.	100
Figura Anexa 1 – RMN de CL3SA.	113
Figura Anexa 2 – RMN de CL3NHS.	114
Figura Anexa 3 – RMN de CL3Dopa.....	114
Figura Anexa 4 – RMN de CL5.	115
Figura Anexa 5 - RMN de CL7.....	115
Figura Anexa 6 - RMN de CL5Dopa.	116
Figura Anexa 7 – RMN de CL7Dopa.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições das sínteses de nanopartículas de magnetita realizadas das variações do bloco FeCl_3 . Abreviações: V_F : volume final; #: concentração do excesso de base em mol/L; Gotej.: gotejamento; Inj.: injeção; Agit.: agitação; (i): inicial; (r): reação; Cond.: condensador; t: tempo.....	26
Tabela 2 – Parâmetros do bloco de sínteses com FeCl_3 em diferentes concentrações de base.....	27
Tabela 3 – Parâmetros de síntese do bloco de sínteses com $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	27
Tabela 4 - Cor do pó obtido (preta ou marrom escura), tamanho médio e desvio padrão obtidos por MET, tamanho de cristalito calculado por DRX e magnetização de saturação, para cada amostra de nanopartículas (medidas não realizadas marcadas com traço).	35
Tabela 5 – Resultados de tamanho por MET e tamanho de cristalito por DRX para amostras com diferentes tempos de envelhecimento.	40
Tabela 6 – Resultado das caracterizações de MET, DRX, magnetização e de hipertermia das nanopartículas. SAR calculado para amostras com 5 mg/mL.	44
Tabela 7 - Resultados das amostras sintetizadas com sulfato.	50
Tabela 8 – Resultados de DLS de amostras de magnetita, com tamanho por intensidade (Z-average), por número (number mean), índice de polidispersividade (Pdl) e potencial zeta.....	53
Tabela 9 – Condições para o recobrimento das partículas de magnetita com polidopamina. Abreviações: V_F : volume final; Etn.: Etanol; Magn.: magnética; Mec.: mecânica. Ultr.: ultrassom.....	74
Tabela 10 – Reagentes utilizados nas reações de ROP e nas reações seguintes com anidrido succínico.	75
Tabela 11 – Reagentes das reações de ligação dos macromônômeros com NHS.	76
Tabela 12 – Reagentes das reações de ligação do macromônômero com dopamina.	77
Tabela 13 – Condições das reações RAFT de CLnDopa e PMPC.	79
Tabela 14 - Magnetização de saturação (M_s) de amostras de magnetita encapsuladas com polidopamina, com a porcentagem das medidas do compósito em relação à da magnetita pura.....	86
Tabela 15 – Resultados de DLS das amostras de nanopartículas poliméricas.	95
Tabela 16 – Resultados de DLS das partículas de magnetita revestidas com polímeros.	96
Tabela 17 – Resultados de DLS das partículas de magnetita revestidas com polímeros em diferentes proporções.	97

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

CL	Caprolactona
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DRX	Difratometria de raios X
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GPC	Cromatografia de permeação em gel
H _c	Coercividade intrínseca
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MPC	2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine
M _s	Magnetização de saturação
M ₂₅₀	Magnetização sob campo magnético de 250 Oe
nm	Nanometro
Oe	Oersted
RAFT	Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação
r _c	Raio crítico de nucleação
ROP	Polimerização por abertura de anel
RMN	Espectroscopia por ressonância magnética nuclear
SAR	Taxa de absorção específica
TGA	Análise termogravimétrica
UV-vis	Espectroscopia no Ultravioleta visível
VSM	Magnetometria de amostra vibrante

SUMÁRIO

Introdução.....	12
Capítulo 1: Síntese de magnetita	16
1. Revisão bibliográfica.....	16
Propriedades magnéticas	16
Hipertermia magnética.....	17
Agentes teranósticos	18
Desafios da aplicação relacionados a este trabalho.....	19
Mecanismos de nucleação e crescimento de nanopartículas	19
Rotas de síntese de magnetita	22
2. Objetivos	23
3. Materiais e métodos.....	24
4. Resultados e discussão	31
Avaliação geral	31
4.1 Caracterização físico-química: determinação de fase e morfologia	32
Amostras iniciais cloreto (bloco FeCl ₃).....	32
Amostras sulfato	47
4.1 Estabilidade coloidal	50
4.2 Caracterização magnética e resposta hipertérmica	53
4.3 Viabilidade celular	61
5. Conclusão parcial	63
Capítulo 2: Polímeros e encapsulação de nanopartículas.....	64
1. Revisão bibliográfica.....	64
Estabilidade coloidal	64
Direcionamento tumoral	65
Fármacos e encapsulação	66
Polidopamina	68
Policaprolactona	69
Polímeros para estabilidade coloidal	70
Polimerização RAFT	70
2. Objetivos	71
3. Materiais e métodos.....	73
4. Resultados e discussão	81

4.3	Polidopamina e encapsulação de magnetita.....	81
4.4	Copolímeros e encapsulação de magnetita.....	87
5.	Conclusão parcial.....	101
	Conclusão.....	102
	Perspectivas.....	103
	Referências.....	104
	ANEXO – Espectros de RMN.....	113

Introdução

O câncer consiste de um conjunto de doenças que corresponde a uma das maiores causas de morte em todo o mundo, com estimativas de 18 milhões de casos e 9,6 milhões de óbitos anuais (dados de 2018) (INCA, 2019). Somente no Brasil, estima-se que atualmente ocorram cerca de 625 mil novos casos de câncer por ano (dados de 2021). A incidência e a mortalidade seguem crescendo no mundo, devido principalmente ao envelhecimento e ao crescimento populacional. Portanto, apesar dos avanços científicos recentes, segue sendo imprescindível desenvolver novos e eficientes métodos de diagnóstico e tratamento para aumentar as chances de cura dos pacientes.

A nanotecnologia pode pavimentar o caminho até esse objetivo. Nanopartículas podem ser compostas de diferentes materiais para atuarem como blocos de construção formando uma plataforma multifuncional que pode auxiliar no tratamento de câncer através de diversos mecanismos. Partes orgânicas e inorgânicas podem ser combinadas, para criar um material compósito inteligente capaz de matar células tumorais sem danificar tecidos saudáveis (SUN; ZHANG; PANG; HYUN *et al.*, 2014).

Nanopartículas magnéticas de óxido de ferro das fases magnetita e maghemita apresentam propriedades de interesse para diversas aplicações biomédicas (DULINSKA-LITEWKA; LAZARCZYK; HALUBIEC; SZAFRANSKI *et al.*, 2019). Desde que possuam diâmetro menor que aproximadamente 20 nm (RAVIKUMAR; BANDYOPADHYAYA, 2011), elas deverão apresentar superparamagnetismo, propriedade de materiais que apresentam magnetização resultante não nula somente sob aplicação de um campo magnético externo, o que permite que as nanopartículas magnéticas formem uma suspensão estável em meio líquido. Tal suspensão, quando submetida a um campo magnético alternado com a frequência e amplitude adequadas, é capaz de absorver energia e liberá-la na forma de calor. Como células tumorais são mais sensíveis ao calor do que células saudáveis, ficando suscetíveis a morte celular a partir de temperaturas de 42 °C (BLANCO-ANDUJAR; ORTEGA; SOUTHERN; NESBITT *et al.*, 2016). Assim, essas nanopartículas podem ser usadas para um tratamento seletivo de câncer, chamado hipertermia magnética. Além disso, o material também pode atuar no diagnóstico de doenças como agente de contraste para imageamento por ressonância magnética, com potencial para ser uma opção mais eficiente e menos tóxica que os contrastes utilizados atualmente. Essas aplicações tornam o óxido de ferro nanoparticulado um agente

teranóstico, nome pelo qual são chamadas substâncias capazes de atuar simultaneamente em terapia e diagnóstico de doenças, como por exemplo, o câncer (YOO; LEE; SHIN; CHEON, 2011).

Em linhas gerais, o desenvolvimento de plataformas teranósticas eficientes baseadas em nanopartículas magnéticas para tratamento de câncer via hipertermia ainda vem esbarrando em três pontos fundamentais, os quais motivam a comunidade científica nas pesquisas mais recentes no tema em questão. Esses desafios podem ser resumidamente expostos como: (i) obter características físico-químicas para máxima eficiência de transferência de energia na forma de calor em materiais com o mínimo risco de toxicidade a tecidos saudáveis, (ii) desenvolver sistemas de revestimento de superfície também biocompatíveis, com estabilidade coloidal em meio biológico, que possibilitem rotas de administração pouco invasivas e com funcionalidades que potencializem o efeito terapêutico e, finalmente, (iii) estabelecer rotas de fabricação que possam resultar em produção em larga escala com custos acessíveis para a maioria da população.

Entre os diversos tipos de nanopartículas capazes de produzir hipertermia magnética, a magnetita tem a seu favor uma alta biocompatibilidade, demonstrada em inúmeros testes *in vitro* e *in vivo* reportados na literatura (ANSELMO; MITRAGOTRI, 2015; POLLER; ZALOGA; SCHREIBER; UNTERWEGER *et al.*, 2017). Os mecanismos de transferência de calor e as maneiras de maximizá-la, no entanto, seguem sendo alvo de intenso debate na literatura científica. Sabe-se que o potencial de aquecimento do sistema, medido pelo parâmetro chamado SAR (do inglês *Specific Absorption Rate*), depende das características do campo magnético aplicado (frequência e amplitude), da concentração do material e de suas propriedades físico-químicas intrínsecas, como tamanho e magnetização (CONDE-LEBORAN; BALDOMIR; MARTINEZ-BOUBETA; CHUBYKALO-FESENKO *et al.*, 2015). Os estudos sobre a otimização de síntese das nanopartículas e das suas propriedades podem aumentar a capacidade terapêutica e minimizar a concentração necessária de material a ser administrado (e seus possíveis efeitos colaterais). Esses desafios, resumidos nos itens *i* e *iii* citados acima, serão tratados no Capítulo 1 desta tese.

Para o tratamento de câncer, afora o núcleo magnético, ainda é conveniente fazer uso de fármacos quimioterápicos, que poderiam aliar-se a nanopartícula para aumentar a toxicidade específica contra células tumorais e criar um poderoso sistema antitumoral com

propriedades de hipertermia e quimioterapia localizada. Em tal estrutura, as nanopartículas de magnetita poderiam estar encapsuladas juntamente com as moléculas de fármaco no interior de uma partícula polimérica maior, formando um compósito, ainda em escala nanométrica. A taxa de liberação do fármaco pode ser controlada por uma mudança de conformação do polímero, que pode ser desencadeada por um estímulo, como uma mudança de temperatura ou pH, que podem ser induzidos por hipertermia magnética e pelo habitual pH ácido das regiões tumorais, respectivamente. A polidopamina é um exemplo de polímero sensível ao pH e ainda apresenta o grupo catecol, característico da dopamina, que tem alta afinidade pela superfície da magnetita, facilitando sua aderência para o revestimento (LIU; YU; YE; ZHOU, 2011). Outra estratégia de interesse para a encapsulação é a utilização de polímeros biodegradáveis, como a policaprolactona, que podem liberar o fármaco de acordo com seu perfil de degradação e ainda evitam sua acumulação no organismo (GATTI; AGOSTINI; FERRARI; MOSCATELLI, 2017).

No entanto, a fim de atingirem seu alvo no organismo após a administração, ainda é requerido que as partículas apresentem longa meia vida na corrente sanguínea, ao evitarem serem eliminadas rapidamente. Assim, uma vez que o material chega à região desejada através da corrente sanguínea, seu tamanho nanométrico pode permitir sua acumulação em tumores através do Efeito de Permeação e Retenção Aumentada (EPR), baseado nas características lacunas das paredes dos vasos sanguíneos e falho sistema linfático das regiões tumorais (MAEDA; NAKAMURA; FANG, 2013). Para tanto, é indicado que o polímero da superfície tenha característica hidrofílica para conferir maior estabilidade coloidal às nanopartículas em fluidos biológicos (LAZZARI; MOSCATELLI; CODARI; SALMONA *et al.*, 2012). Polímeros zwitteriônicos, como o poli(2-methacrilóiloxietil fosforilcolina) (MPC), são altamente hidrofílicos e são indicados para a função (LUONGO; CAMPAGNOLO; PEREZ; KOSEL *et al.*, 2017). E, finalmente, para unir as propriedades de interesse de diferentes polímeros, podem ser sintetizados copolímeros que combinem as propriedades de dois ou mais monômeros, por estratégias como a polimerização RAFT (Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação). A modificação das características de superfície das nanopartículas e a incorporação de fármacos, conferidas através do revestimento dos núcleos de magnetita com polímeros sintetizados especificamente para este fim, correspondem aos desafios dos itens *ii* e *iii* citados anteriormente, serão tratadas no Capítulo 2 desta tese.

Os estudos descritos aqui representam uma porção ínfima das possibilidades que podem ser exploradas para desenvolver nanoplataformas multifuncionais. Ao associar diferentes blocos de construção, orgânicos e inorgânicos, arrançados em diferentes arquiteturas, elas podem utilizadas para aplicações biomédicas e para outros propósitos, nas áreas de biotecnologia, ambiental, energia e catálise. Espera-se que os resultados apresentem novas perspectivas e avanços para os campos da ciência envolvidos e, conseqüentemente, para a sociedade.

Capítulo 1: Síntese de magnetita

1. Revisão bibliográfica

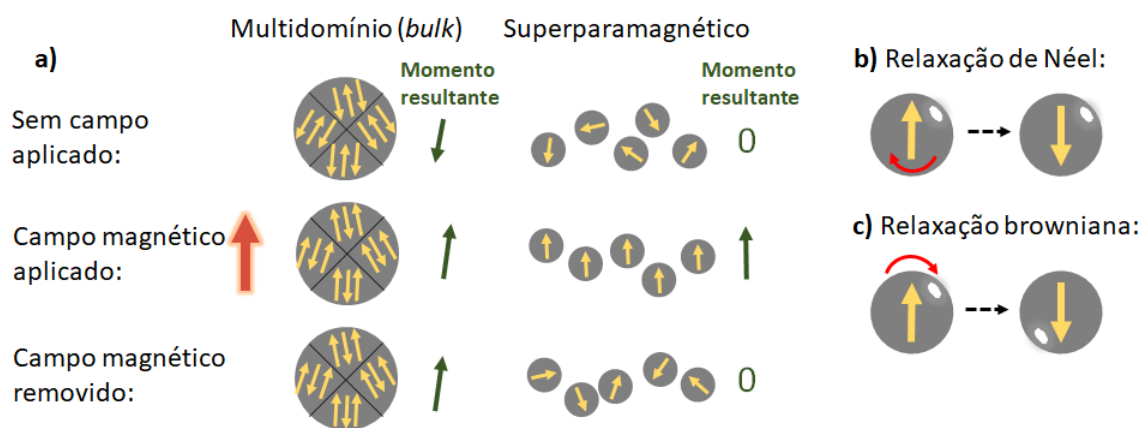
A aplicação de materiais em nanoescala já é uma realidade, com base no conhecimento gerado pela ciência nas últimas décadas. Entre tantas classes de estruturas estudadas, as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro de magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) estiveram sempre em destaque, com aplicações em diversas áreas tecnológicas, como energia (LIU; CHEN; LIU; XU *et al.*, 2020), catálise (NEAMTU; NADEJDE; HODOROABA; SCHNEIDER *et al.*, 2018), tratamento de água (ADELEYE; CONWAY; GARNER; HUANG *et al.*, 2016), entre outras. O destaque principal, no entanto, é sua aplicação em biomedicina, como em sistemas de entrega controlada de fármacos (AL-JAMAL; BAI; WANG; PROTTI *et al.*, 2016), agentes de contraste para ressonância magnética (SHEN; WU; CHEN, 2017), terapia gênica (KIEVIT; VEISEH; FANG; BHATTARAI *et al.*, 2010) e no tratamento de câncer por hipertermia magnética (GUPTA; SHARMA, 2019). Tanto interesse se justifica por aliarem propriedades magnéticas especiais com uma baixa toxicidade a tecidos biológicos (DULINSKA-LITEWKA; LAZARCZYK; HALUBIEC; SZAFRANSKI *et al.*, 2019), em uma estrutura química composta pelo óxido de um dos elementos mais abundantes do planeta.

Propriedades magnéticas

Em sua forma *bulk* (macroscópica), um material ferromagnético ou ferrimagnético, como a magnetita, se comporta como um ímã permanente devido à orientação fixa de magnetização de pequenas regiões do material, chamadas domínios magnéticos (material multidomínio) (CULLITY; GRAHAM, 2009). Se o material possuir diâmetro suficientemente pequeno, há a presença de apenas um domínio magnético (monodomínio). Em partículas ainda menores, os domínios de orientação fixa deixam de existir e o material não apresenta mais magnetização espontânea, sem aplicação de campo magnético, entrando em um regime chamado superparamagnético. Neste caso, os acoplamentos magnéticos possuem energia mais baixa do que a componente de energia térmica e, assim, o momento magnético da nanopartícula varia espontaneamente, de forma que magnetização total medida é nula. Na presença de campo, o momento magnético total da nanopartícula se alinha rapidamente à direção do campo aplicado, como mostra a Figura 1a. Para a magnetita, o diâmetro crítico

para o superparamagnetismo a temperatura ambiente é de cerca de 20 nm (RAVIKUMAR; BANDYOPADHYAYA, 2011), de modo que nanopartículas menores apresentam tal propriedade. Esta propriedade especial evita a presença de uma força de atração magnética permanente entre as partículas, o que permite que elas componham suspensões estáveis em um meio dispersante (sem agregação magnética).

Figura 1 – Esquemas das respostas da magnetita ao campo magnético como material multidomínio ou superparamagnético (a) e das nanopartículas durante relaxações de Néel (b) e browniana (c).



Fonte: Figura a de autoria própria. Figuras b e c adaptadas de Abenojar *et al.* (ABENOJAR; WICKRAMASINGHE; BAS-CONCEPCION; SAMIA, 2016).

Hipertermia magnética

Quando submetidas a um campo magnético alternado, as nanopartículas superparamagnéticas se alinham a ele e absorvem energia, que é liberada na forma de calor durante a reversão do campo. Este fenômeno ocorre em um meio líquido por dois processos: primeiro a rotação dos momentos magnéticos internos, denotado por relaxação de Néel, seguido do alinhamento das partículas no meio dispersante, devido ao torque exercido pela aplicação e remoção do campo magnético alternado, denotado por relaxação browniana (OTA; TAKEMURA, 2019; SALUNKHE; KHOT; PAWAR, 2014).

Este calor produzido localmente pode ser utilizado para induzir a morte seletiva de células tumorais a partir de 42 °C, visto que estas são mais sensíveis ao aumento de temperatura que as saudáveis (HANINI; LARTIGUE; GAVARD; SCHMITT *et al.*, 2016). As células tumorais podem passar por apoptose e necrose, dependendo das temperaturas atingidas (BLANCO-ANDUJAR; ORTEGA; SOUTHERN; NESBITT *et al.*, 2016; CAVALIER.R; CIOCATTO; GIOVANEL.BC; HEIDELBE.C *et al.*, 1967), ao causar danos tanto ao proteoma quanto ao genoma das células (KRAWCZYK; EPPINK; ESSERS; STAP *et al.*, 2011; ZHANG; CALDERWOOD,

2011). Este tipo de tratamento, denominado hipertermia magnética ou magnetohipertermia, tem passado por testes clínicos desde 2003, com pacientes com glioblastoma multiforme, e tem apresentado bons resultados (JOHANNSEN; THIESEN; WUST; JORDAN, 2010; MAIER-HAUFF; ROTHE; SCHOLZ; GNEVECKOW *et al.*, 2007). Com o avanço dos estudos, a hipertermia magnética foi aprovada na Alemanha, onde já é aplicada para tratamento de pacientes de glioblastomas recorrentes (MAGFORCE, 2018), como terapia única ou em combinação com radioterapia ou quimioterapia, em que as nanopartículas são injetadas localmente através de um procedimento cirúrgico. No entanto, ainda há desafios por vencer na síntese do material e na aplicação clínica, estudados intensamente pela comunidade científica, para o estabelecimento da terapia de forma mais eficiente (GUPTA; SHARMA, 2019).

Agentes teranósticos

As nanopartículas magnéticas também podem atuar no diagnóstico de doenças, como agentes de contraste para imagem por ressonância magnética, ao interferir nos tempos de relaxação dos prótons após estes serem excitados por um campo externo (SHEN; WU; CHEN, 2017). Inclusive, diversos produtos de agente de contraste negativo (tipo T_2 , escuro) chegaram ao mercado, como Ferumoxide e Ferucarbotan, se apoiando no fato que os óxidos de ferro apresentam maior biocompatibilidade que produtos concorrentes a base de gadolínio (Gd), de contraste positivo (tipo T_1 , claro). No entanto, a produção da maioria foi descontinuada, sendo que os motivos principais apontados são os tamanhos hidrodinâmicos relativamente grandes (60-180 nm), que tornavam lenta a sua eliminação pelo corpo, e uma facilidade maior apontada pela prática clínica para o diagnóstico de doenças com contraste claro. Em contrapartida, nanopartículas de óxido de ferro extremamente pequenas, menores que 5 nm, apresentam contraste positivo, podendo compor uma nova geração de agentes de contraste, assim como nanopartículas baseadas em manganês (Mn) e de outras composições como wustita, FeO (NEVES; BINI; BARBOSA; SALMON *et al.*, 2016).

O magnetismo das nanopartículas de óxido de ferro ainda pode ser explorado para guiá-las através da corrente sanguínea até o tecido alvo, com o uso de um gradiente de campo magnético (AL-JAMAL; BAI; WANG; PROTTI *et al.*, 2016). Esta prática pode potencializar o efeito terapêutico e reduzir possíveis efeitos colaterais para as demais regiões do organismo.

Desafios da aplicação relacionados a este trabalho

Pelos motivos apontados, tais plataformas têm alto potencial para atuar em terapia e diagnóstico de doenças simultaneamente, sendo denominadas agentes teranósticos (YOO; LEE; SHIN; CHEON, 2011). No entanto, os desafios mencionados na introdução deste trabalho seguem incitando a comunidade científica no desenvolvimento e melhoramento de procedimentos e ensaios para vencê-los ou minimizá-los. É notório que as propriedades dos materiais são fortemente influenciadas pelo tamanho e, fundamentalmente, pela distribuição de tamanhos na escala nanométrica. Largas distribuições de tamanho ampliam faixas de resposta, tornando o sistema menos eficiente diante de um estímulo específico e constante, portanto, para uma aplicação eficiente é essencial que os sistemas nanoparticulados sejam monodispersos; rigorosamente, para tal classificação, o grau de polidispersão (σ) deve ser menor do que 10% (HUNTER, 2001), apesar da literatura recente considerar definições mais abrangentes de sistemas *quasi*-monodispersos com graus de dispersão de até cerca de 20%. Adicionalmente, os estudos envolvendo nanopartículas magnéticas para hipertermia relatados atualmente na literatura mostram que alta dependência da eficiência de transferência de energia com o tamanho de partícula. Para sistemas de nanopartículas de óxido de ferro, a medida de produção de calor via aplicação de campo magnético, SAR, cresce exponencialmente com o tamanho da partícula até um máximo próximo de 25 nm, e depois diminui (SHAH; DAVIS; GOVER; NIKLES *et al.*, 2015; VREELAND; WATT; SCHOBBER; HANCE *et al.*, 2015). Outra característica desejada para as partículas é preservar o comportamento superparamagnético, importante para evitar sua aglomeração por atração magnética, que, como mencionado, para a magnetita está ao redor de 20 nm (RAVIKUMAR; BANDYOPADHYAYA, 2011).

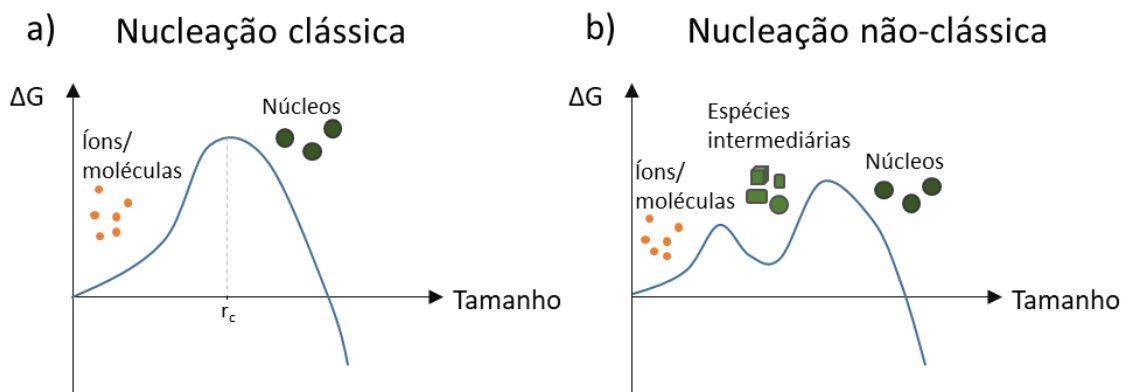
Mecanismos de nucleação e crescimento de nanopartículas

Para o desenvolvimento de uma síntese de um produto com as características desejadas, é necessário o entendimento dos processos físico-químicos envolvidos. A síntese de nanopartículas pode ser realizada por métodos *top-down* ou *bottom-up*, para os casos de redução de tamanho do material de partida ou de crescimento a partir de unidades menores, respectivamente. No segundo caso, mais comum, os mecanismos de formação de nanopartículas são descritos na literatura principalmente com base em dois processos: nucleação e crescimento. Esse entendimento vem desde 1950, a partir do modelo de Lamer (LAMER; DINEGAR, 1950; WHITEHEAD; OZKAR; FINKE, 2019). Inicialmente, é formada a

solução de monômeros, que, podem ser diferentes espécies, dependendo do sistema, como átomos, clusters ou moléculas. Quando sua concentração atinge uma concentração que excede o nível de supersaturação crítico do sistema, ocorre a nucleação instantânea (ou do inglês, *burst nucleation*), ou seja, a formação de núcleos de partículas sólidas. Com o consumo dos monômeros, sua concentração diminui rapidamente e é iniciada a etapa de crescimento das partículas pela ligação dos monômeros restantes aos núcleos formados inicialmente. Atualmente, as descrições de tais processos já foram mais detalhadas e aperfeiçoadas de acordo com as nuances de cada tipo de material.

Mais especificamente, a etapa de nucleação geralmente é descrita pela teoria clássica de nucleação, que consiste na formação de núcleos a partir de uma solução homogênea pela indução de supersaturação dos monômeros. Como mostra a Figura 2a, uma barreira energética deve ser ultrapassada para que ocorra a formação de núcleos de raio maior que um raio crítico r_c , a partir do qual a partícula se torna estável e evita sua redissolução, para somente então, iniciar-se a etapa de crescimento pela deposição dos monômeros restantes em solução sobre a superfície dos núcleos formados.

Figura 2 – Esquemas das teorias de nucleação clássica e não-clássica.



Fonte: adaptado de Lee *et al.* (LEE; YANG; KWON; HYEON, 2016).

Cálculos termodinâmicos permitem determinar r_c e os fatores que o influenciam (KWON; HYEON, 2011; VARANDA; SOUZA; PERECIN; MORAES *et al.*, 2019). A energia livre total de uma nanopartícula de raio r (equação 1) é dada pela soma da energia de superfície, que depende da energia de superfície por área (γ), e da energia *bulk*, que depende da energia por volume de um cristal (ΔG_V), a qual por sua vez é dada pela equação 2:

$$\Delta G = 4\pi r^2 \gamma + \frac{4}{3} \pi r^3 \Delta G_V \quad (\text{equação 1})$$

$$\Delta G_V = \frac{-k_B T \ln(S)}{V_m} \quad (\text{equação 2})$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, S é o nível de supersaturação da solução e V_m é o volume molar do cristal *bulk*. Realizando a derivação $d\Delta G/dr = 0$, se obtém o raio crítico r_c , dado pela equação 3. A taxa de nucleação de N núcleos sendo formados em um tempo t pode ser descrita usando uma equação do tipo Arrhenius com base na energia de Gibbs crítica para nucleação ΔG_c (respectiva a r_c), sendo dada pela equação 4, em que A é um fator pré-exponencial e N_A , o número de Avogadro.

$$r_c = \frac{2\gamma V_m}{k_B T \ln(S)} \quad (\text{equação 3})$$

$$\frac{dN}{dt} = A \exp\left(\frac{-\Delta G_c}{k_B T}\right) = A \exp\left(\frac{-16\pi\gamma^3 V_m^2}{3k_B^3 T^3 N_A^2 (\ln(S))^2}\right) \quad (\text{equação 4})$$

Mais recentemente, no entanto, tem sido proposta uma teoria “não-clássica”, que envolve a formação de estruturas intermediárias que estabelecem um mínimo local no diagrama que permitem uma redução da barreira energética de nucleação, como mostra a Figura 2b (LEE; YANG; KWON; HYEON, 2016). Trabalhos recentes mostraram evidências de que a síntese de magnetita apresentaria um mecanismo não-clássico, com a formação de nanopartículas cristalinas maiores a partir da agregação de pequenas partículas primárias, por sua vez geradas pelos íons de ferro em meio alcalino (BAUMGARTNER; DEY; BOMANS; LE COADOU *et al.*, 2013; WIDDRAT; SCHNECK; REICHEL; BAUMGARTNER *et al.*, 2017). O detalhamento dos mecanismos e das espécies envolvidas no processo são motivos de intenso debate na literatura científica atual (MIRABELLO; IANIRO; BOMANS; YODA *et al.*, 2020).

A etapa de crescimento das nanopartículas é principalmente descrita como a adição dos monômeros restantes em solução à superfície dos núcleos, que pode ser um processo controlado por reação ou por difusão das espécies. Mais monômeros podem ser disponibilizados pela redissolução de partículas menores, que ocorre devido à sua maior energia de superfície, para o crescimento das maiores, em mecanismo chamado de envelhecimento de Ostwald (OSTWALD, 1900). Tal processo pode ser importante para a obtenção de um conjunto de nanopartículas de maior tamanho médio e monodisperso, através da focalização do tamanho, se a distribuição de tamanho inicial for relativamente

larga. As partículas ainda podem crescer por processos de agregação ou coalescência (THANH; MACLEAN; MAHIDDINE, 2014).

Rotas de síntese de magnetita

Quanto à metodologia de produção, rotas de sínteses de sistemas monodispersos de nanopartículas de magnetita são bem estabelecidas por rotas em solventes orgânicos, em especial via decomposição térmica de compostos organometálicos em altas temperaturas (100-330 °C). Contudo, a aplicação dessa metodologia em larga escala esbarra em seu alto custo e na necessidade de surfactantes que levam à obtenção de sistemas de nanopartículas com características hidrofóbicas. Embora seja possível a conversão do caráter hidrofóbico em hidrofílico através da troca de ligantes (NEVES; BINI; BARBOSA; SALMON *et al.*, 2016), o processo é dispendioso em tempo e reagentes, além de poder afetar a qualidade das nanopartículas. Sínteses em meio aquoso geram partículas hidrofílicas, são mais baratas e relacionadas a química verde, vantagens importantes para escalonamento de produção. Porém, neste caso o controle de tamanho e forma das partículas é dificultado, levando frequentemente à formação de sistemas polidispersos. Há ainda outras estratégias possíveis, como método poliol, microemulsão, síntese hidrotérmica ou até biossíntese por bactérias magnetotáticas (VARANDA; SOUZA; PERECIN; MORAES *et al.*, 2019; WU; WU; YU; JIANG *et al.*, 2015), mas nenhum desses com grande potencial para escalonamento.

A síntese por coprecipitação, desenvolvida na década de 1980 (MASSART, 1981), é o método mais comum e simples de produzir nanopartículas de magnetita, na qual sais de Fe(II) e Fe(III) são precipitados em soluções aquosas alcalinas. Em outros trabalhos, com a iniciativa de aumentar o controle sobre o tamanho e a forma na síntese de nanopartículas magnéticas em sistemas aquosos, foram realizadas sínteses a partir de reações de hidrólise (meio aquoso) de soluções de Fe(II) na presença de KNO₃ para promover oxidação controlada em meio alcalino. Tal sistemática foi originalmente descrita por Sugimoto e colaboradores em 1979 (SUGIMOTO; MATIJEVIC, 1980), obtendo partículas micrométricas de magnetita. Em trabalhos recentes, a rota de síntese foi adaptada para obtenção de sistemas nanométricos, porém é necessária a remoção de excesso de oxigênio dissolvido na água e a manutenção de atmosfera inerte durante a síntese, para evitar a oxidação descontrolada dos íons Fe(II) a Fe(III). Assim, dispendiosos e demorados processos de desaeração das soluções e borbulhamento de nitrogênio são necessários no preparo das soluções e durante toda a síntese, que envolvem

tempos de até 24 horas (ALTAN; LENDERS; BOMANS; DE WITH *et al.*, 2015; MARCIELLO; CONNORD; VEINTEMILLAS-VERDAGUER; VERGES *et al.*, 2013).

Em trabalho de 1999, Qu e colaboradores realizaram um estudo sistemático na utilização de sulfito de sódio para atuar como agente redutor moderado em reações envolvendo precursores de Fe(III), levando a formação de íons Fe(II) *in situ* para a síntese de magnetita em meio alcalino (QU; YANG; REN; KAN *et al.*, 1999). Os autores obtiveram sucesso na obtenção de nanopartículas de magnetita, oferecendo um protocolo bastante promissor, sem uso de gás inerte, com o porém de apresentar um material com larga distribuição de tamanho.

Os protocolos de Sugimoto e Qu foram escolhidos como pontos de partida para o desenvolvimento de uma nova rota de síntese de nanopartículas de magnetita, com o intuito de evitar etapas de desaeração e de controlar as reações redox e as velocidades de hidrólise, condensação e nucleação e crescimento. Estudando e identificando os parâmetros envolvidos em tais processos, espera-se que possam ser traçadas estratégias para a obtenção de sistemas com morfologia e propriedades magnéticas orientadas para potencializar as capacidades hipertérmicas.

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento de uma rota de síntese de nanopartículas de magnetita em meio aquoso com potencial para aplicações biomédicas, em especial o tratamento de câncer por hipertermia magnética. Entre os objetivos específicos, destacam-se:

- Obter sistemas monodispersos de nanopartículas de magnetita pela técnica de redução-precipitação;
- Caracterizar as nanopartículas obtidas quanto às características estruturais, de superfície, magnéticas e de aquecimento por hipertermia magnética, estabelecendo relações de causa e efeito;
- Maximizar o potencial de aquecimento por hipertermia magnética (SAR) dos sistemas de nanopartículas, mantendo o caráter superparamagnético.

3. Materiais e métodos

3.1 Materiais

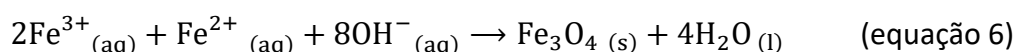
Para a síntese de nanopartículas de magnetita, foram utilizados cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sulfato férrico hidratado ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) e sulfito de sódio (Na_2SO_3) da Sigma-Aldrich; ácido hidrocloreto (HCl) 37% Panreac; hidróxido de sódio (NaOH) da Mallinckrodt Chemicals; e hidróxido de amônio da Baker.

3.2 Sínteses de nanopartículas de magnetita

A rota de síntese de nanopartículas desenvolvida neste trabalho é comumente referida na literatura como “redução-precipitação”, tendo sido proposta inicialmente por Qu e colaboradores (QU; YANG; REN; KAN *et al.*, 1999). Enquanto que na metodologia mais difundida de síntese aquosa, a coprecipitação desenvolvida por Massart (MASSART, 1981), são utilizados reagentes de Fe^{2+} e Fe^{3+} , neste caso somente o reagente de Fe^{3+} é utilizado. A formação dos íons Fe^{2+} é promovida *in situ* pela redução parcial controlada por sulfito de sódio, de acordo com a reação simplificada:



Então, através da mistura da solução de ferro com uma solução alcalina, ocorre a formação da magnetita de acordo com a equação:

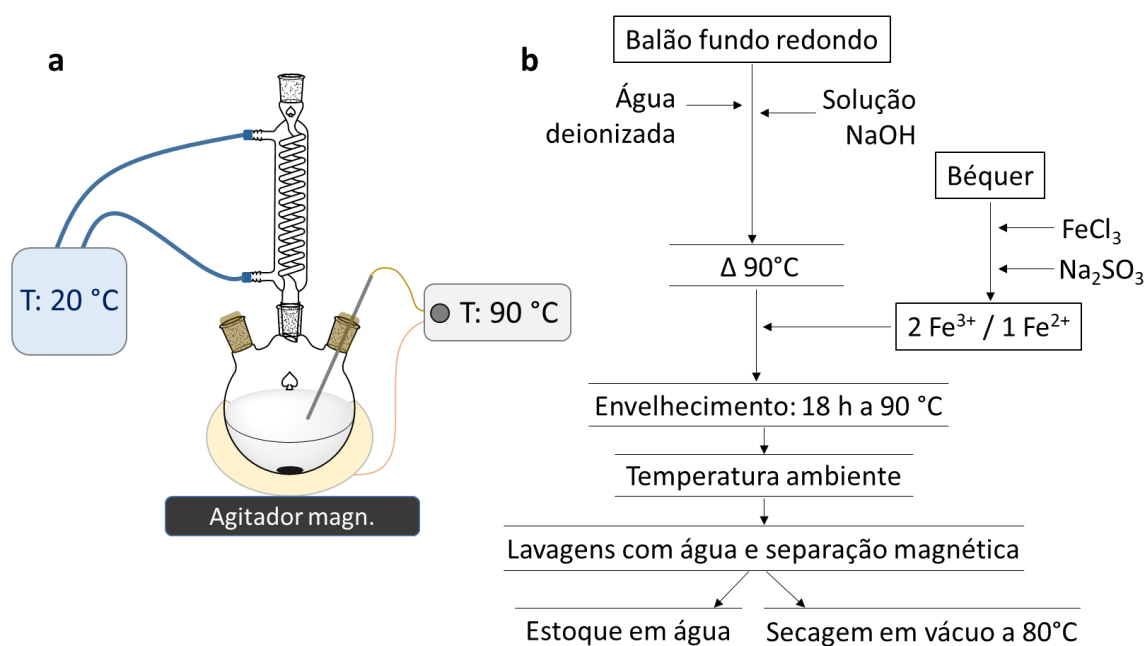


Para a realização da síntese, as soluções de ácido, base e sulfito de sódio foram preparadas previamente em balões volumétricos, com água deionizada; a solução de ferro foi solubilizada em balão volumétrico com a solução de ácido clorídrico. O sistema de síntese é montado com um balão de três bocas, com condensador de Graham ligado a banho térmico a 20 °C, e envolvido por uma manta térmica ligada a um controlador de temperatura com monitoramento por termopar imerso no sistema de reação, conforme esquema da Figura 3a. Em um protocolo típico, com o uso do reagente $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, a síntese foi iniciada com a redução parcial de Fe^{3+} em Fe^{2+} , pela mistura sob agitação magnética da solução de cloreto férrico com a solução de Na_2SO_3 , seguindo a razão molar $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{SO}_3^{2-}] = 3$. Então, sob vigorosa agitação magnética, a solução resultante foi adicionada a um volume conhecido de solução de NaOH a 90 °C, de maneira a promover a precipitação da magnetita de acordo com uma concentração de excesso de base controlado ($[\text{OH}^{-}]_{\text{exc}}$) definido como:

$$[\text{OH}^-]_{\text{exc}} = [\text{NaOH}]_{\text{F}} - \left(\frac{8}{3}\right)[\text{Fe}]_{\text{F}} + [\text{HCl}]_{\text{F}} \quad (\text{equação 7})$$

Em que $[\text{NaOH}]_{\text{F}}$, $[\text{Fe}]_{\text{F}}$ e $[\text{HCl}]_{\text{F}}$ são as concentrações dos respectivos reagentes na solução final do meio reacional. Em seguida, foi realizado o processo de envelhecimento a 90 °C por 18 horas. Em alguns casos, a adição da solução de Fe ocorreu a temperatura ambiente, de forma que logo em seguida foi realizada uma rampa de aquecimento de 10 min até 90 °C, para o envelhecimento também de 18 horas. A etapa de envelhecimento é realizada visando controlar os processos de crescimento e envelhecimento de Ostwald (SUGIMOTO; MATIJEVIC, 1980) e, conseqüentemente, o tamanho das nanopartículas e sua cristalinidade, para resultar em materiais com propriedades magnéticas hipertérmicas melhoradas. Ao fim das 18 h, as partículas são coletadas e lavadas com água por separação magnética pelo menos 8 vezes. Parte da suspensão é seca em estufa a 80 °C e o restante é mantido em suspensão em água para diferentes caracterizações. O esquema desta síntese típica está retratado na Figura 3b.

Figura 3 - Esquemas do sistema montado (a) e das etapas da rota (b) de síntese de nanopartículas de magnetita.



Fonte: autoria própria.

Diversos parâmetros da síntese foram modificados ao longo dos estudos, dividindo as amostras em três grupos: amostras iniciais cloreto, estudo de pH e temperatura e amostras sulfato. No primeiro grupo, através de um estudo exploratório sobre os aspectos que controlam o tamanho e grau de polidispersividade, foram testados: sistema aberto (M1) ou fechado com atmosfera de N₂ (M2); concentrações de HCl de 0,03 mol/L (M1), 0,015 mol/L (M3), 0,0075 mol/L (M4) e sem HCl (M5); envelhecimento em repouso (M3) ou sob agitação

(M6); uso de NH_4OH como base (M7); testes de injeção rápida de diferentes volumes de precursor em agitação mecânica (M8, M9); maior concentração de Fe (M10); atmosfera de N_2 a $90\text{ }^\circ\text{C}$ (M11 e M12), com e sem agitação durante o envelhecimento (M13 e M14); agitação mecânica (M15) ou magnética (M16) durante injeção de precursor; temperatura de nucleação com envelhecimento mais curto (M17 e M18) e mais longo (M19 e M20), com excesso de base maior; processo hidrotérmico de sistema fechado a $100\text{ }^\circ\text{C}$ (M21). A Tabela 1 resume as condições testadas deste grupo.

Tabela 1 – Condições das sínteses de nanopartículas de magnetita realizadas das variações do bloco FeCl_3 . Abreviações: V_F : volume final; #: concentração do excesso de base em mol/L; Gotej.: gotejamento; Inj.: injeção; Agit.: agitação; (i): inicial; (r): reação; Cond.: condensador; t: tempo.

Nome	Sal de Fe	[Fe] [#]	[HCl] [#]	[SO_3^{2-}] [#]	Base [#]	Adição	T	Agit. (i)	Meio externo	t env.	Agit. (r)
M1	FeCl_3	0,03	0,03	0,01	NaOH 0,02	Gotej.	$21\text{ }^\circ\text{C}$	Magn.	Cond.	18 h	Não
M2	FeCl_3	0,03	0,03	0,01	NaOH 0,02	Gotej.	$21\text{ }^\circ\text{C}$	Magn.	N_2 -Fech.	18 h	Não
M3	FeCl_3	0,03	0,015	0,01	NaOH 0,02	Gotej.	$21\text{ }^\circ\text{C}$	Magn.	Cond.	18 h	Não
M4	FeCl_3	0,03	0,0075	0,01	NaOH 0,02	Gotej.	$21\text{ }^\circ\text{C}$	Magn.	Cond.	18 h	Não
M5	FeCl_3	0,03	-	0,01	NaOH 0,02	Gotej.	$21\text{ }^\circ\text{C}$	Magn.	Cond.	18 h	Não
M6	FeCl_3	0,03	0,015	0,01	NaOH 0,02	Gotej.	$21\text{ }^\circ\text{C}$	Magn.	Cond.	18 h	Sim
M7	FeCl_3	0,03	0,015	0,01	NH_4OH 0,02	Gotej.	$21\text{ }^\circ\text{C}$	Magn.	Cond.	18 h	Sim
M8	FeCl_3	0,03	0,015	0,01	NaOH 0,02	Inj. 16 mL	$90\text{ }^\circ\text{C}$	Mec.	Cond.	18 h	Sim
M9	FeCl_3	0,03	0,015	0,01	NaOH 0,02	Inj. 3 mL	$90\text{ }^\circ\text{C}$	Mec.	Cond.	5 h	Não
M10	FeCl_3	0,06	0,03	0,02	NaOH 0,02	Inj. 3,3 mL	$90\text{ }^\circ\text{C}$	Magn.	Cond.	18 h	Não
M11	FeCl_3	0,03	0,015	0,01	NaOH 0,02	Inj. 3,6 mL	$90\text{ }^\circ\text{C}$	Magn.	N_2 -cond.	18 h	Não
M12	FeCl_3	0,03	0,005	0,01	NaOH 0,02	Inj. 3,6 mL	$90\text{ }^\circ\text{C}$	Magn.	Cond.	18 h	Não
M13	FeCl_3	0,03	0,005	0,01	NaOH 0,02	Inj. 3,6 mL	$90\text{ }^\circ\text{C}$	Magn.	N_2 -cond.	18 h	Sim
M14	FeCl_3	0,03	0,005	0,01	NaOH 0,02	Inj. 4,5 mL	$90\text{ }^\circ\text{C}$	Magn.	Cond.	18 h	Não
M15	FeCl_3	0,03	0,005	0,01	NaOH 0,02	Inj. 1,8 mL	$90\text{ }^\circ\text{C}$	Mec.	Cond.	18 h	Não
M16	FeCl_3	0,03	0,005	0,01	NaOH 0,02	Inj. 1,8 mL	$90\text{ }^\circ\text{C}$	Magn.	Cond.	18 h	Não
M17	FeCl_3	0,03	0,015	0,01	NaOH 0,04	Got.16 mL	$21\text{ }^\circ\text{C}$	Mec.	Cond.	6 h	Não
M18	FeCl_3	0,03	0,015	0,01	NaOH 0,04	Got.16 mL	$90\text{ }^\circ\text{C}$	Mec.	Cond.	6 h	Não
M19	FeCl_3	0,03	0,015	0,01	NaOH 0,04	Got.16 mL	$21\text{ }^\circ\text{C}$	Mec.	Cond.	18 h	Não
M20	FeCl_3	0,03	0,015	0,01	NaOH 0,04	Inj. 16 mL	$90\text{ }^\circ\text{C}$	Mec.	Cond.	18 h	Não
M21	FeCl_3	0,03	0,015	0,01	NaOH 0,04	Inj. 16 mL	$21\text{ }^\circ\text{C}$	Magn.	Fechado $100\text{ }^\circ\text{C}$	24 h	Não
M22	FeCl_3	0,03	0,015	0,01	NaOH 0,04	Inj. 16 mL	$21\text{ }^\circ\text{C}$	Magn.	Cond.	18 h	Não

De acordo com os resultados obtidos nas primeiras sínteses, foi realizado estudo para determinar o impacto da concentração de base, com adição de solução de ferro a 90 °C e 21 °C, resumidos na Tabela 2. Por fim, também foi testado o uso de outro reagente de Fe³⁺, sulfato férrico, conforme as condições descritas na Tabela 3.

Tabela 2 – Parâmetros do bloco de sínteses com FeCl₃ em diferentes concentrações de base.

Nome	[OH ⁻] (mol L ⁻¹)	Temperatura adição de Fe	Reagente Fe	Razão [Fe ³⁺]/[SO ₃ ²⁻]
C.005	0,005	90° C	FeCl ₃	3/1
C.01	0,01	90° C	FeCl ₃	3/1
C.02	0,02	90° C	FeCl ₃	3/1
C.04	0,04	90° C	FeCl ₃	3/1
C.06	0,06	90° C	FeCl ₃	3/1
Cc.005	0,005	21° C	FeCl ₃	3/1
Cc.01	0,01	21° C	FeCl ₃	3/1
Cc.02	0,02	21° C	FeCl ₃	3/1
Cc.04	0,04	21° C	FeCl ₃	3/1
Cc.06	0,06	21° C	FeCl ₃	3/1

Tabela 3 – Parâmetros de síntese do bloco de sínteses com Fe₂(SO₄)₃.

Nome	[OH ⁻] (mol L ⁻¹)	Temperatura adição de Fe	Reagente Fe	Razão [Fe ³⁺]/[SO ₃ ²⁻]
S31	0,02	90° C	Fe ₂ (SO ₄) ₃	3/1
S21	0,02	90° C	Fe ₂ (SO ₄) ₃	2/1
S11	0,02	90° C	Fe ₂ (SO ₄) ₃	1/1
S23	0,02	90° C	Fe ₂ (SO ₄) ₃	2/3
S12	0,02	90° C	Fe ₂ (SO ₄) ₃	1/2

3.3 Caracterizações

As estruturas cristalográficas das amostras foram avaliadas por Difratomia de raios X (DRX), em equipamento D8 Advance (Bruker), com fonte de Cu K α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). O pó das partículas foi macerado e compactado em uma placa de vidro para a análise, com 2θ de 20 a 90°. O tamanho de cristalito foi determinado através da fórmula de Scherrer (LANGFORD; WILSON, 1978), com a integral sobre cada pico calculada pelo software Eva (Bruker) e valor

de $K = 0,94$, através da média das medidas dos picos em 2θ (e planos) de 30° (220), 35° (311) e 63° (440).

Análise por Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi realizada para a identificação das ligações químicas presentes nos materiais. Os espectros foram obtidos com um equipamento IRPrestige-21 (Shimadzu), 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.

Através da espectroscopia Mössbauer do ^{57}Fe , foram obtidas informações sobre os estados químicos, físicos e magnéticos das formas de átomos de ferro presentes nas amostras, assim como suas proporções relativas. As medidas foram realizadas no Instituto de Física (IF) da USP, em parceria com o Prof. Dr. Luiz Nagamine. Os espectros Mössbauer foram obtidos usando fonte de ^{57}Co em matriz de Rh, com aceleração constante, a temperatura de 80 K . Os pós das amostras foram empacotados em suportes cilíndricos de nylon com área de seção transversal de 2 cm^2 . Todos os desvios de isômeros foram dados relativos ao $\alpha\text{-Fe}$ a temperatura ambiente.

A morfologia das partículas foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão (MET), utilizando o microscópio JEM2100 (JEOL) operando a 200 kV . As amostras foram dispersas em água ou isopropanol e uma gota da suspensão foi adicionada às grades de cobre, previamente revestidas com o polímero Formvar® e recobertas com um filme de carbono. O diâmetro médio das nanopartículas e a distribuição de tamanhos foram obtidos através da contagem de, no mínimo, 150 nanopartículas utilizando o software livre ImageJ. Para os cálculos de grau de polidispersão (σ), foi utilizada a seguinte equação:

$$\sigma (\%) = \frac{\text{desvio padrão}}{\text{tamanho médio}} \times 100 \quad (\text{equação 8})$$

Para estudar o comportamento das partículas em meio aquoso, foram realizadas medidas de tamanho hidrodinâmico por técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS, do inglês, *Dynamic Light Scattering*). As medidas foram realizadas em equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), com as nanopartículas dispersas em solução de NaCl $0,01\text{ mol/L}$ em água deionizada, em diferentes valores de pH. As medidas foram realizadas em triplicata e as médias dos tamanhos hidrodinâmicos foram extraídas com auxílio do software do equipamento.

Foi realizada análise termogravimétrica (TGA) em termobalança TGA/DSC 1, Mettler Toledo. As condições experimentais empregadas foram: razão de aquecimento de 10 °C/min, de 25 °C até 1000 °C; atmosfera de nitrogênio com vazão de 50 mL/min; em cadinho de alumina aberto, com 5 a 10 mg de amostra.

Para avaliar o comportamento magnético das amostras, utilizou-se a técnica de Magnetometria de amostra vibrante (VSM, do inglês *Vibrating Sample Magnetometry*), com um equipamento VSM 4500 (EG&G). As amostras foram preparadas com a inserção do pó do analito no interior de uma cápsula de medicamento vazia, e esta cápsula foi presa por uma das extremidades no interior de um fino tubo de plástico fixado verticalmente entre duas bobinas captadoras do fluxo magnético. O campo magnético aplicado foi variado entre 20 e -20 kOe e as medidas foram todas realizadas à temperatura ambiente.

Os ensaios de hipertermia magnética foram realizados no equipamento comercial Magtherm 1,5AC (NanoTherics, UK). As nanopartículas foram dispersas em água deionizada, em diferentes concentrações. A temperatura da suspensão foi monitorizada pela imersão à suspensão de nanopartículas da sonda de fibra óptica com sensor de GaAs (OTG-M360) acoplada ao transdutor de sinal PicoM, o qual faz a comunicação com o software, todos da empresa Opsens (Canadá). As amostras foram submetidas à um campo magnético de amplitude de 25 mT e frequência de 109,8 kHz, no experimento padrão, e a campos de 328 kHz/17 mT e 463 kHz/11 mT em testes específicos. Para a realização da medida, a amostra foi deixada inicialmente em repouso, para estabilização do registro de temperatura. Na marca de 30 segundos, o campo magnético foi ligado e o aumento de temperatura foi registrado de acordo com o tempo até o desligamento do campo na marca de 500 s, com o seguimento da medida até os 530 s. O sensor foi posicionado sempre no centro da amostra e a uma altura fixa para todas as medidas. Para os cálculos de potencial de aquecimento através da taxa de absorção específica (SAR, *Specific Loss Rate*), foi realizado um ajuste da curva de temperatura (ΔT) versus tempo (t), pela equação 9, do tipo Box Lucas, através do programa OriginLab. Os parâmetros a e b obtidos são aplicados à equação 10, em que C é a capacidade calorífica específica do meio ($\text{J g}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$) e m, a concentração da amostra (g mL^{-1}), para a obtenção dos valores de SAR (W g^{-1} de amostra) (LANIER; KOROTYCH; MONSALVE; WABLE *et al.*, 2019).

$$\Delta T = a (1 - e^{(-b(t-t_0))}) \quad (\text{equação 9})$$

$$SAR (W g^{-1}) = \frac{c}{m} a b \quad (\text{equação 10})$$

Para avaliação do efeito citotóxico das nanopartículas, foi realizado estudo na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), em parceria com o Prof. Dr. Fillipe Vieira Rocha. Foram avaliadas as linhagens celulares: humana de tumor de mama triplo-negativo MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26), humana de adenocarcinoma de pulmão A549 (ATCC® CCL-185), humana de carcinoma de próstata DU-145 (ATCC® HTB-81) e humana de pulmão não tumoral MRC-5 (ATCC® CCL-171). As células MDA-MB-231, A549 e MRC-5 foram encubadas em meio DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*) suplementado com soro fetal bovino (FBS) 10% e penicilina (100 unidades ml⁻¹), gentamicina (50 mg L⁻¹) e anfotericina (25 µg mL⁻¹). As células DU-145 foram mantidas em RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 10% FBS e penicilina (100 unidades ml⁻¹), gentamicina (50 mg L⁻¹), e anfotericina (25 µg mL⁻¹). As culturas foram armazenadas em garrafas de plástico (Corning) em um incubador a 310 K com atmosfera de 5% de CO₂. As medidas da viabilidade celular foram realizadas através de ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio), que se baseia no fato que as células viáveis podem reduzir o anel de tetrazólio em um cristal de formazan roxo insolúvel, que pode ser solubilizado em solvente orgânico para ser quantificado pela medida da absorbância da solução em 540 nm; a absorbância medida é diretamente proporcional ao número de células vivas. Para o experimento, 1,5 x 10⁴ células foram adicionadas por poço de placas de 96 poços e encubadas por 24 horas a 310 K em atmosfera de 5% de CO₂. Então, alíquotas da suspensão de nanopartículas C.02 foram adicionadas em diferentes concentrações (220 µg mL⁻¹; 110 µg mL⁻¹; 55,0 µg mL⁻¹; 13,7 µg mL⁻¹; 6,87 µg mL⁻¹; 3,43 µg mL⁻¹; 1,72 µg mL⁻¹) por poço (contendo 150 µL do meio), então encubadas por 48 h. Após este período, 50 µL de MTT (1 mg mL⁻¹) foi adicionado a cada poço, e as células foram encubadas por mais 3 h. Então, o MTT foi removido e os cristais de formazan foram solubilizados com 150 µL de álcool isopropílico. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro leitor de placas (BioTek™, Epoch™) em 540 nm. A viabilidade celular relativa (%) = ACT (absorbância das células tratadas) / AC (absorbância do controle) x 100, em que ACT é absorbância da solução de células tratadas com nanopartículas e AC, das células sem nanopartículas, respectivamente. O experimento foi realizado em triplicata. Os dados obtidos foram tratados usando o programa GraphPadPrism 5.01.

4. Resultados e discussão

Avaliação geral

A síntese de nanopartículas de óxido de ferro foi realizada pelo mecanismo conhecido como redução-precipitação, o qual se dá inicialmente pela redução parcial do precursor de Fe^{3+} em Fe^{2+} , seguida pela precipitação de Fe_3O_4 ($\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$) em solução alcalina. A rota aplicada neste trabalho foi desenvolvida a partir do trabalho de Qu e colaboradores (QU; YANG; REN; KAN *et al.*, 1999), que apresenta diversas vantagens em relação a outras metodologias de obtenção de magnetita, pelo fato de não necessitar da aplicação de atmosfera de nitrogênio e de precursores organometálicos tóxicos e caros. Além disso, o método apresenta bom rendimento, o que gera interesse visando seu escalonamento para produção a nível industrial, no entanto ainda requer ajustes para a obtenção de partículas com tamanhos e morfologias uniformes. Portanto, foram realizadas modificações que visaram a obtenção de um sistema de nanopartículas mais monodisperso e adequado para a aplicação em hipertermia magnética, ainda mantendo a simplicidade e os aspectos de química verde da rota original. Tais variações implicaram em produtos de diferentes características físico-químicas, de estabilidade coloidal, de magnetização e de propriedades hipertérmica a partir da aplicação de campos magnéticos alternados.

O processo é iniciado pela mistura do precursor Fe^{3+} com o agente redutor SO_3^{2-} , para a obtenção da razão $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+} = 2$, característica da fase magnetita. Como 1 mol de SO_3^{2-} é capaz de reduzir 2 mol de Fe^{3+} para Fe^{2+} , seria de se esperar que a razão molar $[\text{FeCl}_3]/[\text{Na}_2\text{SO}_3]$ adequada dos reagentes fosse de 6; no entanto, através dos estudos de Qu e colaboradores e também do Grupo de Materiais Coloidais, verificou-se que a razão ideal para a obtenção de magnetita é de 3 (QU; YANG; REN; KAN *et al.*, 1999). Na verdade, o equilíbrio também é afetado pelas concentrações dos reagentes, incluindo HCl, e pelas características do complexo intermediário de Fe-SO_3 . Tal complexo é formado imediatamente após a adição da solução de sulfito à de Fe^{3+} , verificado através da mudança de cor da solução de amarelo para vermelho. Sua fórmula molecular não é conhecida exatamente, tendo sido proposto $[\text{Fe}(\text{SO}_3)_n]^{3-2n}$ ou $[\text{Fe}_2(\text{SO}_3)]^{4+}$. Alguns segundos após a mistura, a solução retorna para um tom amarelo pálido, indicando que a reação de redução foi completada.

Então a solução resultante segue para a mistura com a solução de base hidróxido de sódio, que induz a formação do óxido de ferro. A formação de nanopartículas de magnetita é

controlada essencialmente pela taxa de hidrólise dos complexos de ferro formados em solução levemente ácida, $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ e $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ (BABU; MADHUSOODANAN; SRIDHAR; TEMBE, 1997). As sucessivas reações de hidrólise levam à formação de espécies de monômeros, que irão iniciar as etapas de nucleação e crescimento das nanopartículas. A formação de magnetita se dá em meio alcalino, em que a taxa de hidrólise é controlada pela concentração de íons hidroxila no meio de reação.

De forma geral, mecanismo de formação de nanopartículas a partir de soluções é comumente descrito através da teoria clássica de nucleação, na qual são formados núcleos em condições de supersaturação, que têm seu crescimento pela deposição de íons na superfície. No entanto, evidências têm apontado que a formação das nanopartículas de magnetita se dá pela agregação de pequenas partículas primárias (BAUMGARTNER; DEY; BOMANS; LE COADOU *et al.*, 2013; MIRABELLO; IANIRO; BOMANS; YODA *et al.*, 2020), o que tem sido alvo de intenso debate científico. A discussão dos resultados aqui será realizada sob a ótica do contexto da literatura científica atual, para basear a explicação dos fenômenos observados.

Inicialmente, serão discutidos os resultados das caracterizações físico-químicas em relação a determinação da fase do material obtido, sua estrutura cristalina e sua morfologia, divididos em três grupos de sínteses: amostras iniciais de cloreto férrico, estudo do pH e temperatura e amostras de sulfato férrico. Depois, será discutida a estabilidade coloidal das amostras em meio aquoso, sua caracterização magnética e sua capacidade hipertérmica, para todas as amostras. Por fim, serão apresentados os resultados de citotoxicidade.

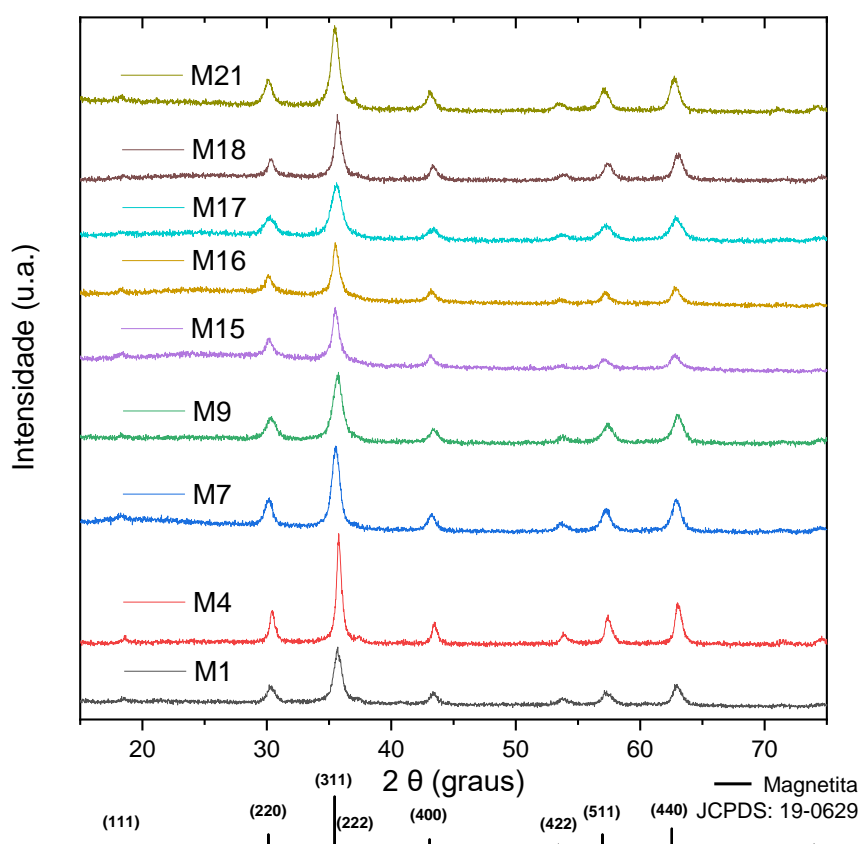
4.1 Caracterização físico-química: determinação de fase e morfologia

Amostras iniciais cloreto (bloco FeCl_3)

Entre as amostras sintetizadas com FeCl_3 , foram testadas diversas variações, como a temperatura de nucleação, pH da solução, agitação mecânica ou magnética, uso da base NH_4OH ou NaOH e aplicação de atmosfera de N_2 . Neste grupo de sínteses, buscou-se explorar esses diversos aspectos, para entender como cada um deles interfere nas características do produto obtido, visando desenvolver uma rota de síntese que atendesse os objetivos das aplicações biomédicas.

Apesar das alterações testadas, todos os difratogramas desse conjunto de sínteses apresentaram correspondência com os picos característicos da estrutura espinélio inverso da magnetita (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003), como retrata a Figura 4. Os picos se diferenciam pela largura, devido à variação de tamanho de cristalito, que foram estimados através da fórmula de Scherrer (LANGFORD; WILSON, 1978) e estão descritos na Tabela 4. A maioria dos resultados ficou na faixa entre 10 e 15 nm.

Figura 4 - Difratogramas de raios X das amostras de nanopartículas comparadas com referência de magnetita.



Em geral, os espectros de FTIR dessas amostras apresentam a banda característica da magnetita em torno de 580 cm^{-1} , como mostra a Figura 5. Em alguns espectros há uma discreta banda em 620 cm^{-1} , característica de maghemita, o que indica oxidação de parte da fase magnetita, provavelmente na superfície das nanopartículas. As bandas entre 860 cm^{-1} e 1060 cm^{-1} são referentes a compostos sulfurados: as localizadas em $880\text{--}860\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas ao estiramento S-O de sulfonatos; estiramento S=O é verificado pelas bandas em $1030\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ e, em alguns espectros, também por bandas entre 1200 e 1450 cm^{-1} (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ; VYVYAN, 2010). A presença desses grupos está associada aos íons sulfato gerados pela

oxidação de sulfito, que permanecem adsorvidos às superfícies das nanopartículas mesmo após sucessivas lavagens. Em experimentos paralelos aos trabalhos descritos nesta tese, também foram avaliados processos de troca de ligante de superfície, nos quais houve uma troca apenas parcial, com a resistência dos grupos sulfurados, indicando que há forte ligação entre os compostos e a superfície da magnetita. As bandas em torno de 1630 cm^{-1} e 2400 cm^{-1} são referentes a espectro de fundo, causadas por água e CO_2 , respectivamente. Em 3400 cm^{-1} , a banda é referente a hidroxilas na superfície das nanopartículas. Os resultados sugerem, portanto, que as superfícies das nanopartículas são formadas por grupos hidroxila e sulfato.

Figura 5 - FTIR de amostras de magnetita sintetizadas com cloreto férrico.

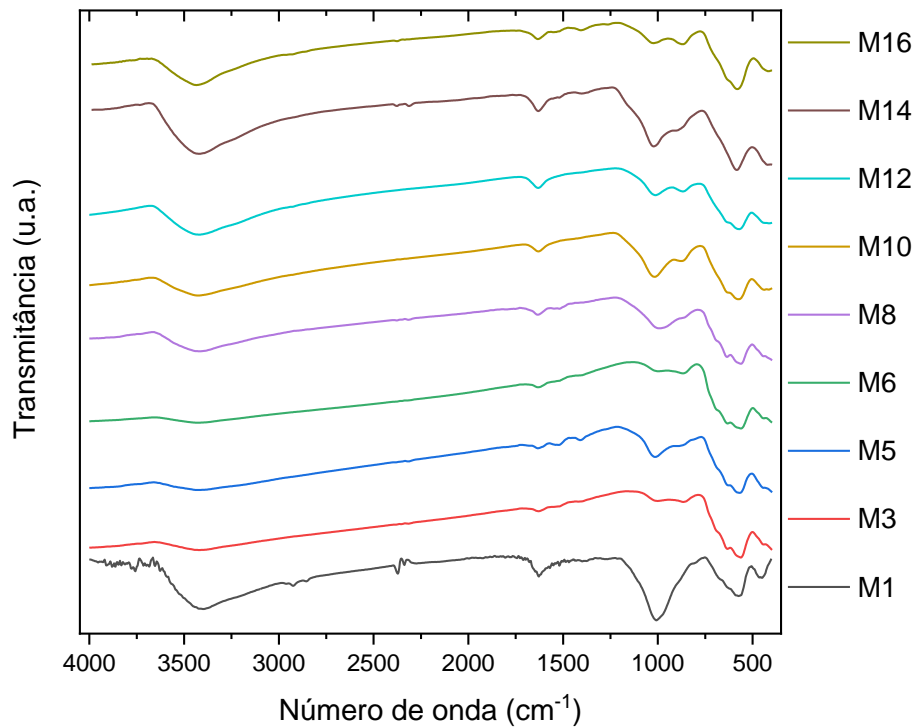


Tabela 4 - Cor do pó obtido (preta ou marrom escura), tamanho médio e desvio padrão obtidos por MET, tamanho de cristalito calculado por DRX e magnetização de saturação, para cada amostra de nanopartículas (medidas não realizadas marcadas com traço).

Amostra	Cor do pó	Tamanho (MET, nm)	Cristalito (DRX, nm)	M _s (emu/g)	M ₂₅₀ (emu/g)	H _c (Oe)	SAR (W g ⁻¹)
M1	Preto	10,6 ± 2,7	11,6	45,6	15,1	23,0	-
M2	Preto	8,2 ± 1,8	11,7	-	-	-	-
M3	Preto	-	13,5	55,3	17,8	54,5	-
M4	Preto	14,3 ± 3,2	14,5	59,4	17,3	68,1	-
M5	Preto	12,6 ± 2,6	14,5	-	-	-	-
M6	Preto	12,1 ± 4,5	16,6	-	-	-	-
M7	Marrom e.	-	10,7	-	-	-	-
M8	Marrom e.	-	10,9	48,6	17,7	9,0	-
M9	Preto	8,8 ± 1,8	9,2	63,4	20,9	8,6	9,7
M10	Preto	9,4 ± 4,8	11,7	50,6	19,8	18,3	-
M11	Preto	-	18,7	16,9	5,9	80,1	7,5
M12	Marrom e.	-	11,9	49,1	18,1	19,7	13,3
M13	Preto	13,1 ± 3,0	11,8	-	-	-	12,2
M14	Preto	11,2 ± 3,1	12,7	46,8	20,2	31,2	-
M15	Preto	11,4 ± 2,6	10,2	53,5	16,5	20,0	12,8
M16	Preto	11,7 ± 4,2	11,2	59,4	19,4	18,0	-
M17	Preto	9,5 ± 1,9	8,4	54,0	15,1	9,9	1,4
M18	Preto	10,6 ± 3,6	10,9	-	-	-	16,0
M19	Preto	10,7 ± 2,1	9,8	50,2	17,8	11,6	9,7
M20	Preto	11,3 ± 5,1	10,6	-	-	-	-
M21	Preto	10,9 ± 2,4	10,4	-	-	-	16,8
M22	Preto	11,8 ± 2,4	10,4	51,8	18,3	19,0	-

Para verificar a influência dos parâmetros testados na morfologia, foi realizada análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Em geral, as nanopartículas apresentam morfologia facetada, variando desde cubos, passando por espécimes com aparente maior número de faces, até aproximadamente esferas, que são grande maioria, como mostra a Figura 6a, da amostra **M1**. Os tamanhos também apresentam variação, comumente desde 7 nm até 20 nm, sendo que a maioria tem aproximadamente 11 nm, como mostra a distribuição de tamanho da Figura 6b. Os diâmetros médios das partículas verificados pelas imagens de MET, estão registrados na Tabela 4. Nota-se também que as partículas ficam aglomeradas na análise, o que se deve ao fato que sua superfície é hidrofílica, enquanto o filme de carbono no qual estão depositadas é hidrofóbico, e a remoção do solvente leva à aproximação das partículas, intensificada pelo seu caráter magnético. As imagens da Figura 7 referentes a amostra M4, por exemplo, indicam homogeneidade de tamanho e a formação de nanopartículas facetadas, esféricas e alguns cubos. Ainda assim, a polidispersividade de

tamanho é relativamente baixa em comparação com outras rotas de síntese em meio aquoso, incluindo o produto obtido por Qu *et al.* (QU; YANG; REN; KAN *et al.*, 1999).

Figura 6 – Imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET) da amostra M1 (a) e histograma de tamanho com ajuste pela distribuição lognormal (b).

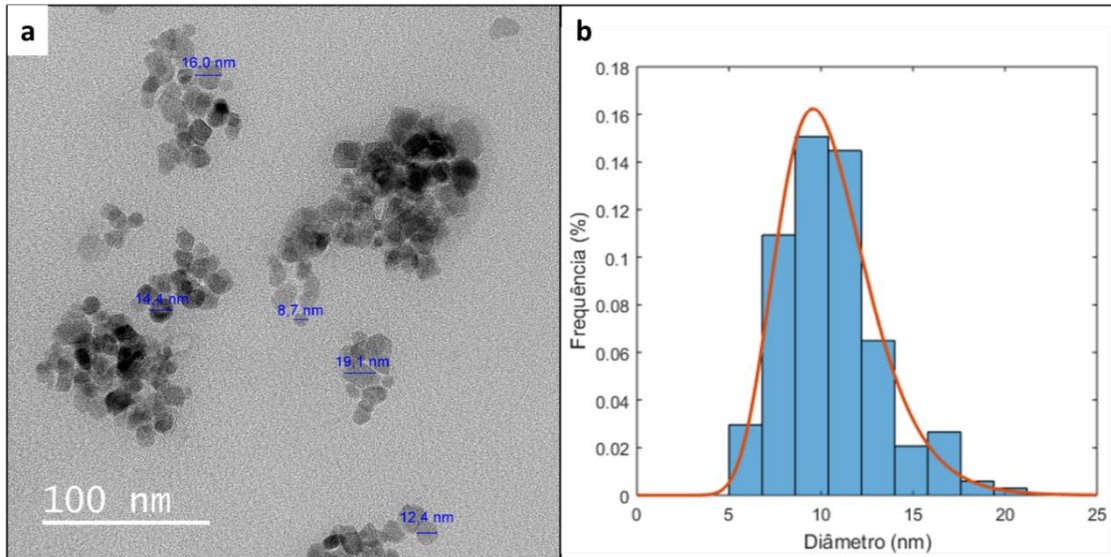
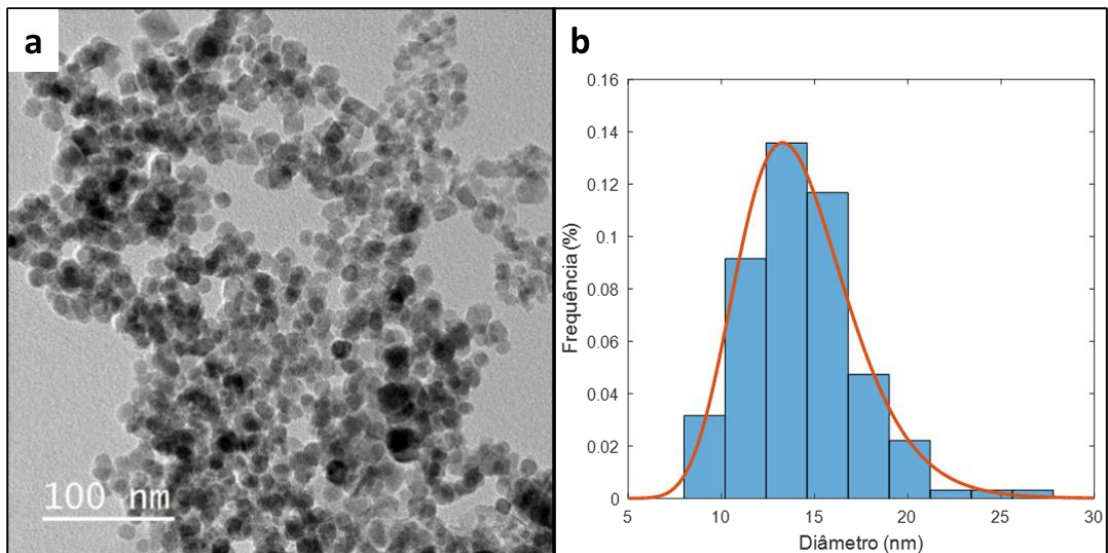


Figura 7 – MET da amostra M4 (a) e histograma de tamanho de partículas de M4, com ajuste pela distribuição lognormal (b).



De forma específica, a partir destes resultados puderam ser extraídas as seguintes conclusões, que determinaram o curso dos experimentos:

- Concentração de HCl: Em **M1, M3, M4 e M5**, as concentrações finais de HCl foram de 0,03 mol/L, 0,015 mol/L, 0,0075 mol/L e sem HCl, respectivamente, com ajuste da quantidade de NaOH para manutenção do excesso de base em 0,02 mol/L. Apesar da sua utilização ter

sido planejada para evitar hidrólise das espécies de Fe antes da adição à solução de base, análises por DRX mostraram que as mudanças não interferiram na obtenção da fase magnetita; no entanto, os tamanhos de partícula aumentaram conforme a concentração de HCl foi diminuída, especialmente quanto aos tamanhos de cristalito: 11,6 nm, 13,5 nm, 14,5 nm e 14,5 nm.

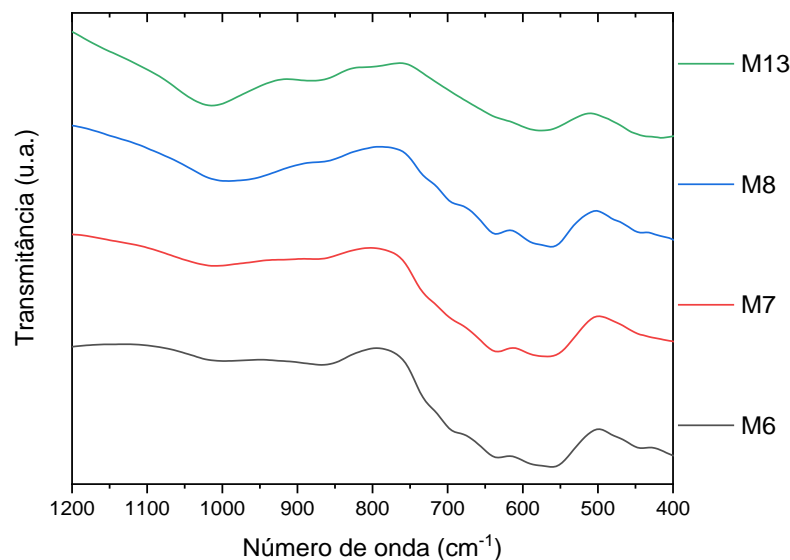
- **Concentração de precursor:** em um teste com o dobro de concentração de precursor de Fe visando possível escalonamento, **M10** apresentou tamanho de 9,4 nm \pm 4,8 nm. O aumento de polidispersão pode indicar que seria mais indicado aumentar o volume, e não a concentração, para escalonar a produção.

- **Tipo de agitação:** Quanto ao tipo de agitação do sistema, o uso de agitação magnética em **M16** produziu partículas um pouco maiores (11,7 nm \pm 4,2 nm), mas com polidispersividade maior em relação a **M15** (11,4 nm \pm 2,7 nm), realizada com agitação mecânica. Os resultados provavelmente estão relacionados a uma maior velocidade de agitação (na faixa de 700-900 rpm) e capacidade de homogeneização da solução de M15 neste caso, e não à natureza da agitação em si, apesar de possível preocupação com o efeito do campo magnético do agitador e da barra magnética. A literatura segue esta hipótese com argumentos de que, com maior velocidade de agitação, há uma maior dissipação e energia do sistema (SCHWAMINGER; SYHR; BERENSMEIER, 2020), relacionada a uma maior taxa de nucleação, menores tamanhos de partícula, e menor polidispersividade, seguindo o modelo de Lamer. Outro exemplo de amostra sintetizada com agitação mecânica é **M9**, com 8,8 nm \pm 1,8 nm, menor e mais uniforme, mas neste caso o período de envelhecimento foi de somente 5 h.

- **Atmosfera inerte (N₂) e agitação durante o envelhecimento:** As variações testadas para o período de envelhecimento se refletem nas composições das partículas. Nas amostras **M6, M7, M8 e M13**, foi testada a agitação do meio durante as 18 horas, para avaliação da uniformidade de tamanho final. Em M6, com sistema aberto com condensador em atmosfera normal, o produto apresentou cor marrom, o que indica a presença da fase maghemita (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003). A perturbação do meio pode aumentar trocas gasosas e choques, expondo as partículas a maior oxidação. M7, a única sintetizada com hidróxido de amônio, também apresentou tom marrom; a base NH₄OH é mais fraca que NaOH, com valores de pK_B de 4,7 e 0,2, respectivamente, tornando o meio menos básico. Em M8, houve

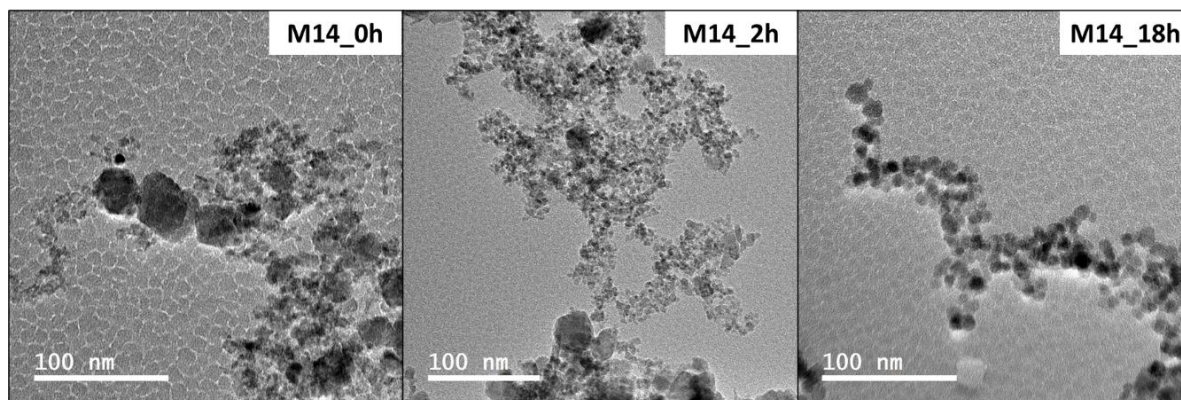
mudanças de nucleação a 90 °C e agitação mecânica, mas também foi obtido material marrom escuro após realizar a agitação durante o envelhecimento. Somente em M21, com o sistema fechado no topo do condensador e atmosfera de N₂, o produto obtido foi preto. Essa diferença é corroborada pela presença da banda em 620 cm⁻¹ em **M6**, **M7** e **M8**, mas não em **M21**, como mostra a Figura 8. Para a amostra **M18** também foi utilizada atmosfera de N₂ em sistema de condensador, mas sem agitação, também sendo obtido material preto e fase magnetita. Já em M2, em sistema fechado com balão de borracha com N₂, sem condensador e sem agitação durante o envelhecimento, foi produzido material marrom escuro. O uso de atmosfera de N₂ não teve sequência devido à pesquisa ter como objetivo um processo mais simples e barato para escalonamento.

Figura 8 - FTIR de amostras com agitação durante envelhecimento.



- **Tempo de envelhecimento:** Um aspecto importante da síntese proposta é o tempo do período de envelhecimento a 90 °C, que em geral foi fixado como 18 horas. Alíquotas da amostra **M14** com tempos de envelhecimento de 0 h (5 segundos após adição do precursor de Fe), 2 h e 18, mostraram que houve um aumento do tamanho médio analisado por MET e diminuição do desvio padrão: 9,8 nm ± 5,7 nm, 10,7 nm ± 5,4 nm e 11,2 nm ± 3,1 nm, respectivamente, como indicam as micrografias da Figura 9. Também ocorreu aumento do tamanho de cristalito, aumentando de 10,1 nm no início até 12,2 nm ao final do processo.

Figura 9 – Imagens de microscopia da amostra M14 com diferentes tempos de envelhecimento.



Além de **M14**, as amostras M17, M19, M20 e M22 também tiveram alíquotas retiradas durante o envelhecimento, com resultados de tamanho por MET e de cristalito por DRX apresentados na Tabela 5. Em geral, a tendência é de aumento de tamanho e diminuição da dispersão de tamanhos. É importante ressaltar que, diferentemente de outras estratégias de síntese com tempos maiores de envelhecimento em que a fase magnetita é formada ao longo do processo, com cinética mais lenta (ALTAN; LENDERS; BOMANS; DE WITH *et al.*, 2015; SUGIMOTO; MATIJEVIC, 1980), aqui a nucleação de nanopartículas de magnetita ocorre rapidamente com a adição do precursor de ferro, verificada pela formação de precipitado de cor preta e pela caracterização por DRX de alíquotas retiradas 5 segundos após a mistura e rapidamente lavadas. Esta etapa é realizada visando seu crescimento controlado. O efeito principal é devido ao envelhecimento de Ostwald, que ocorre durante as 18 h, pela redissolução de partículas menores promovida pela temperatura de 90 °C, na qual há maior solubilidade dos íons de Fe em relação à temperatura ambiente.

Tabela 5 – Resultados de tamanho por MET e tamanho de cristalito por DRX para amostras com diferentes tempos de envelhecimento.

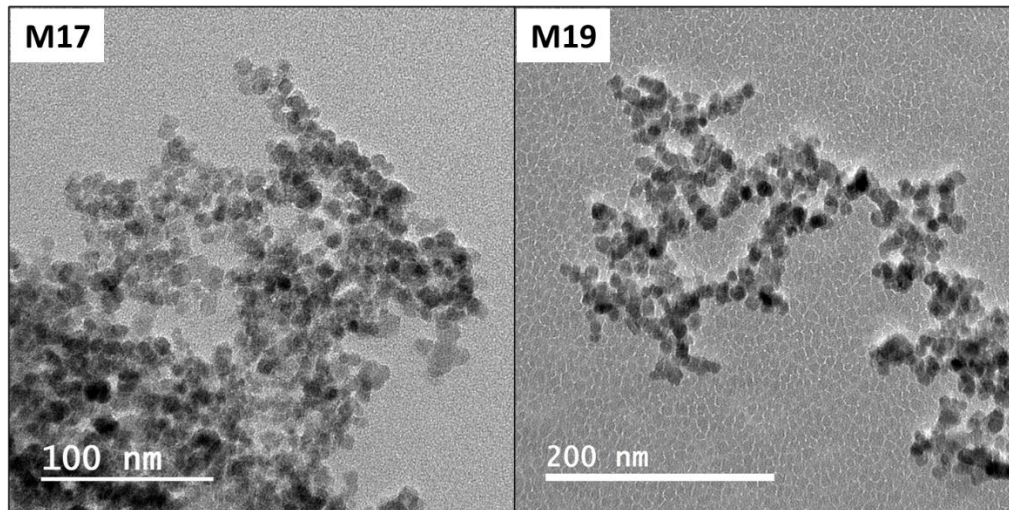
Amostra	Tempo env.	Tamanho MET (nm)	Dispersão de tamanho, σ	Cristalito (nm)
M14	0 h	9,8 ± 5,7	58%	10,1
	2 h	10,7 ± 5,4	50%	12,2
	18 h	11,2 ± 3,1	28%	12,2
M17	0 h	8,6 ± 2,4	28%	7,9
	6 h	9,5 ± 1,9	20%	8,4
M19	0 h	8,7 ± 2,8	32%	8,2
	18 h	10,7 ± 2,1	19%	9,8
M20	0 h	9,5 ± 3,9	41%	9,2
	18 h	11,3 ± 5,1	45%	10,6
M22	0 h	9,3 ± 2,4	26%	-
	16 h	11,8 ± 2,4	20%	10,4

- **Injeção de pouco volume a 90 °C:** Esta estratégia foi baseada no método de injeção a quente (do inglês *hot-injection*), bem estabelecido para a síntese de nanocristais metálicos, no qual um pequeno volume de precursor é adicionado rapidamente à uma solução quente (cerca de 300 °C) de volume maior para atingir alto nível de supersaturação que leva à precipitação (KWON; HYEON, 2011). Baseado no modelo de Lamer, busca-se uma nucleação instantânea que permita a obtenção de um conjunto de partículas com alta uniformidade de tamanho. Como foram muitos parâmetros variados, seu efeito foi comparado de forma mais controlada no conjunto de amostras subsequente, juntamente com o estudo do pH da reação.

- **Temperatura de nucleação:** Em M17 e M18, foi testada agitação mecânica, com excesso de base de 0,04 mol/L e apenas 6 horas de envelhecimento, mas tendo a comparação da temperatura de nucleação, de 21 °C e 90 °C, respectivamente. Em **M17**, o produto foi monodisperso, com tamanho por MET de 9,5 nm ± 1,9 nm, enquanto em **M18** o tamanho foi maior, mas de maior dispersão, com 10,6 nm ± 3,6 nm. Esta foi a primeira evidência mais clara de que a temperatura alta inicial fazia aumentar o tamanho médio de partícula, mas também sua polidispersão. **M19** e **M20**, com o mesmo protocolo e temperaturas iniciais de 21 °C e 90 °C, respectivamente, mas com 18 h de envelhecimento, apresentaram a mesma tendência, com tamanhos médios maiores, de 10,7 nm ± 2,1 nm e 11,3 nm ± 5,1 nm, respectivamente,

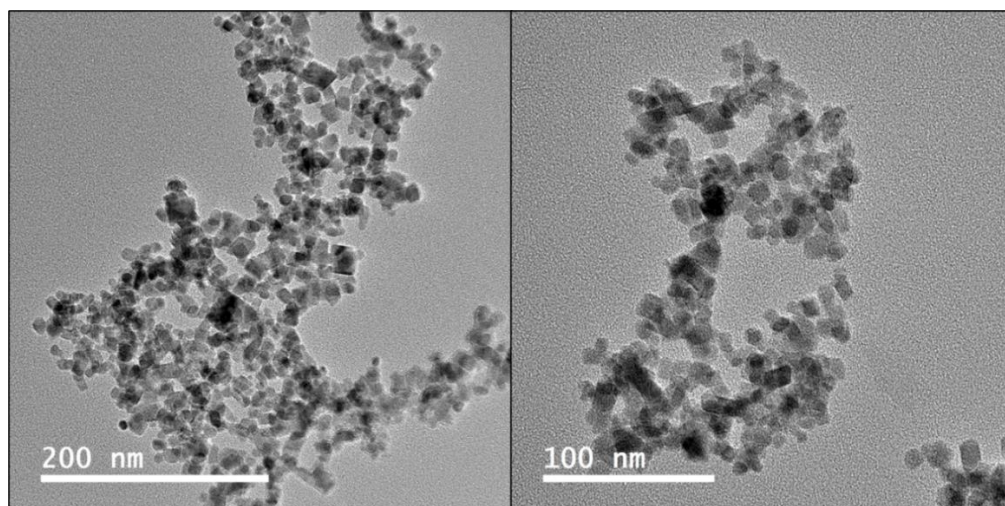
provavelmente devido ao maior tempo disponível para o envelhecimento de Ostwald. As amostras M17 e M19, relativamente monodispersas, têm imagens de MET na Figura 10.

Figura 10 – Imagens de MET das amostras M17 e M19.



- **Processo hidrotérmico:** Em **M21**, após a injeção da solução de ferro a temperatura ambiente, foi testada a aplicação de processo de envelhecimento por 24 h a 100 °C em sistema fechado. Processos hidrotérmicos geralmente são realizados em maiores temperaturas de até 250 °C (DAOU; POURROY; BEGIN-COLIN; GRENECHE *et al.*, 2006), que possibilitam aumento de tamanho, cristalinidade e magnetização. Mais recentemente, até mesmo condições supercríticas têm sido estudadas para esses objetivos, com o auxílio de microrreatores (DARR; ZHANG; MAKWANA; WENG, 2017). Mesmo em condições não tão extremas, foi notável que M21 gerou maior quantidade de partículas cúbicas e facetadas em relação às outras amostras (Figura 11).

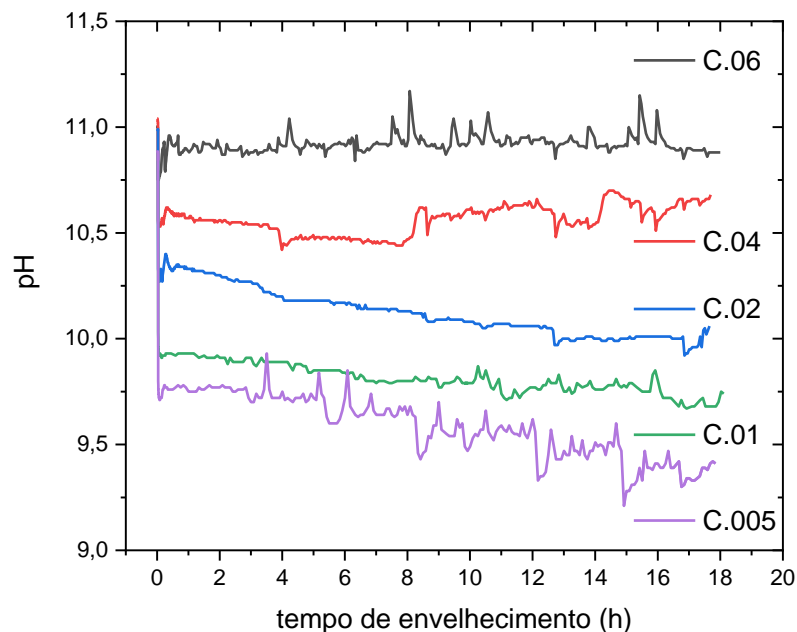
Figura 11 – Imagens de MET da amostra M21.



Estudo do pH do envelhecimento

Para este grupo de amostras, o foco foi avaliar de forma mais criteriosa a influência do excesso de base na síntese ($[\text{OH}^-]_{\text{exc}}$). O pH do meio de reação foi acompanhado durante as sínteses das amostras C.005, C.01, C.02, C.04 e C.06 (nomes referentes ao excesso de base, descritos na Tabela 2 da metodologia), como mostra a Figura 12. No momento da adição do precursor de ferro à solução, o pH diminuiu instantaneamente devido ao consumo de hidroxilas pela rápida nucleação do óxido de ferro.

Figura 12 - Evolução do pH do meio reacional durante o envelhecimento, para diferentes excessos de base.



Para concentrações de excesso de base de 0,005 a 0,02 mol/L, o pH diminuiu durante as 18 horas de envelhecimento, indicando que a reação de formação de partículas continua ocorrendo após o evento de nucleação súbita. Nesses casos, o processo de crescimento ainda pode consumir íons de ferro que não reagiram. Já para excessos de 0,04 e 0,06 mol/L, o pH é mantido constante ao redor de 10,6 e 10,9, respectivamente, indicando que a etapa de nucleação pode ter consumido praticamente todo o precursor, devido ao alto nível de supersaturação dos precursores de Fe em pH alto. Dessa forma, o processo de crescimento ocorre apenas através do envelhecimento de Ostwald, ou seja, pela redissolução das partículas menores, em estado estacionário.

As caracterizações por DRX e FTIR mostram que as mudanças de $[\text{OH}^-]_{\text{exc}}$ não tiveram impacto significativo para alterar a fase obtida, como mostra a Figura 13. No entanto, tais

técnicas não são capazes de diferenciar de forma eficiente as fases magnetita e maghemita. Para tanto, para as amostras C.01 e C.02 foi realizada análise por espectroscopia Mössbauer, que pode dar maiores detalhes sobre a composição química das amostras. Os resultados na Figura 14, foram realizadas cerca de 3 meses após a síntese, sendo que as amostras estiveram estocadas em suspensão em água. Ambos os espectros apresentam três sextetos e um dubleto. As áreas computadas indicam que a amostra C.02 é composta por 70,48% de magnetita e 25,79% de maghemita, ambas ferrimagnéticas (na forma *bulk*), além de 3,73% de hematita paramagnética. De forma muito similar, a amostra C.01 tem 70,14%, 26,74% e 3,11% dos mesmos respectivos materiais. A maior suspeita é que presença dessas duas fases adicionais tenha ocorrido devido a oxidação durante o período de estocagem ou ainda no período de envelhecimento, mas um estudo dedicado desde a etapa de nucleação deve ser realizado para entender sua origem.

Figura 13 – Resultados de DRX e FTIR das amostras sintetizadas com diferentes excessos de base.

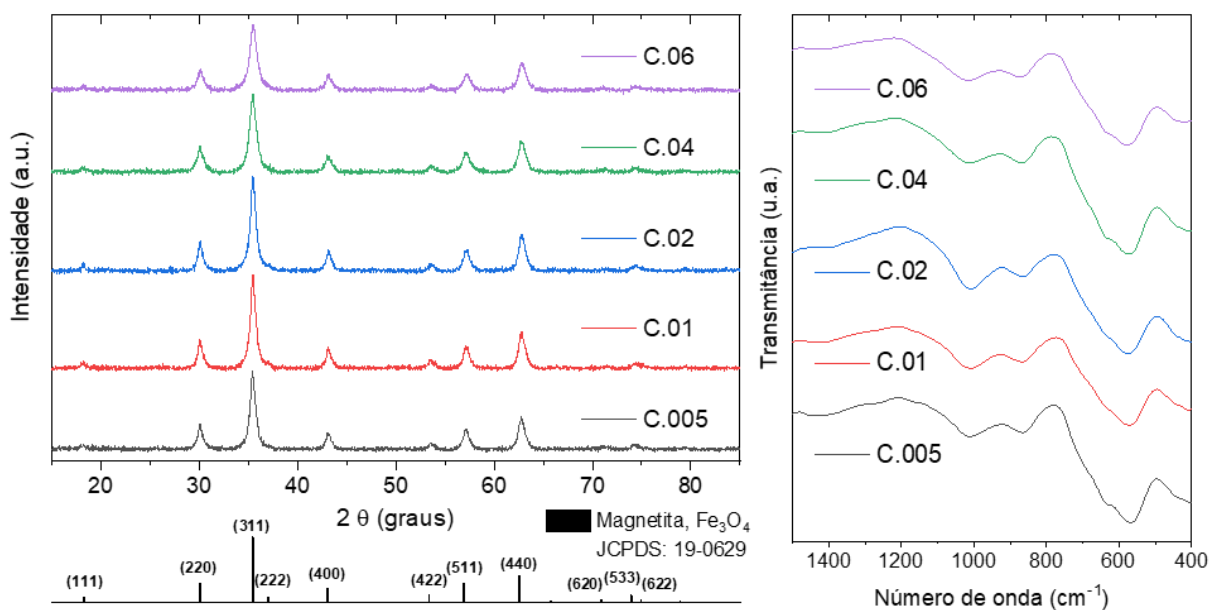
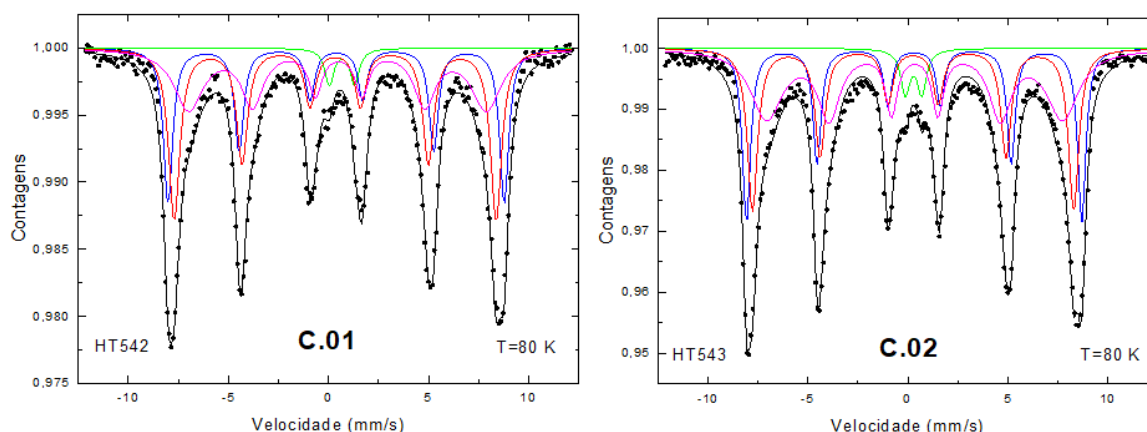


Figura 14 – Resultados de espectroscopia Mössbauer das amostras C.01 e C.02.



A resposta de pH da solução se reflete nas características morfológicas finais das partículas, como se nota nas imagens da Figura 15. Conforme o pH do meio se torna mais básico, os tamanhos médios de partículas verificados por MET diminuem, de 11,8 nm para C.005 até 9,2 nm para C.06. Os tamanhos de cristalito calculados por DRX têm a mesma tendência, exceto por C.005; a queda do pH até 9,5 pode levar à formação de grupos oxo, gerando defeitos pela oxidação da superfície das nanopartículas e diminuindo o cristalito. Os resultados quantitativos das caracterizações físico-químicas deste grupo de amostras estão na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultado das caracterizações de MET, DRX, magnetização e de hipertermia das nanopartículas. SAR calculado para amostras com 5 mg/mL.

Amostra	Tamanho (MET, nm)	Cristalito (DRX, nm)	M_s (emu/g)	M_{250} (emu/g)	H_c (Oe)	SAR ($W g^{-1}$)
C.005	11,8 ± 3,5	10,1	53,1	18,6	24,5	11,0
C.01	11,4 ± 3,5	10,6	51,7	19,0	25,1	13,3
C.02	11,1 ± 3,7	10,2	51,1	18,8	23,6	13,7
C.04	9,8 ± 2,7	9,2	53,8	17,2	17,1	7,1
C.06	9,2 ± 3,2	8,5	49,4	15,3	14,7	7,0
Cc.005	-	6,2	36,7	7,0	9,9	1,0
Cc.01	9,8 ± 2,5	8,3	56,5	17,2	10,7	8,0
Cc.04	9,0 ± 1,7	6,4	48,7	12,7	11,7	4,8
Cc.06	8,0 ± 2,1	6,4	43,4	8,5	10,2	2,1

A redução do tamanho com o aumento de pH também foi verificada em outros trabalhos da literatura para sínteses por coprecipitação (MASCOLO; PEI; RING, 2013; SCHWAMINGER; SYHR; BERENSMEIER, 2020). Sob a ótica da teoria clássica de nucleação e crescimento, se durante a nucleação são formados muitos núcleos rapidamente, não há

disponibilidade de íons de ferro para o crescimento posterior das nanopartículas, e o tamanho médio será reduzido em relação a sistemas nos quais os núcleos ainda podem crescer pelo consumo de íons em solução. Esse conceito se prova na equação 4, em que um alto nível de supersaturação S faz aumentar a taxa de nucleação.

Figura 15 – Imagens de MET das nanopartículas de magnetita C.005, C.01, C.02, C.04 e C.06 e suas distribuições de tamanho.

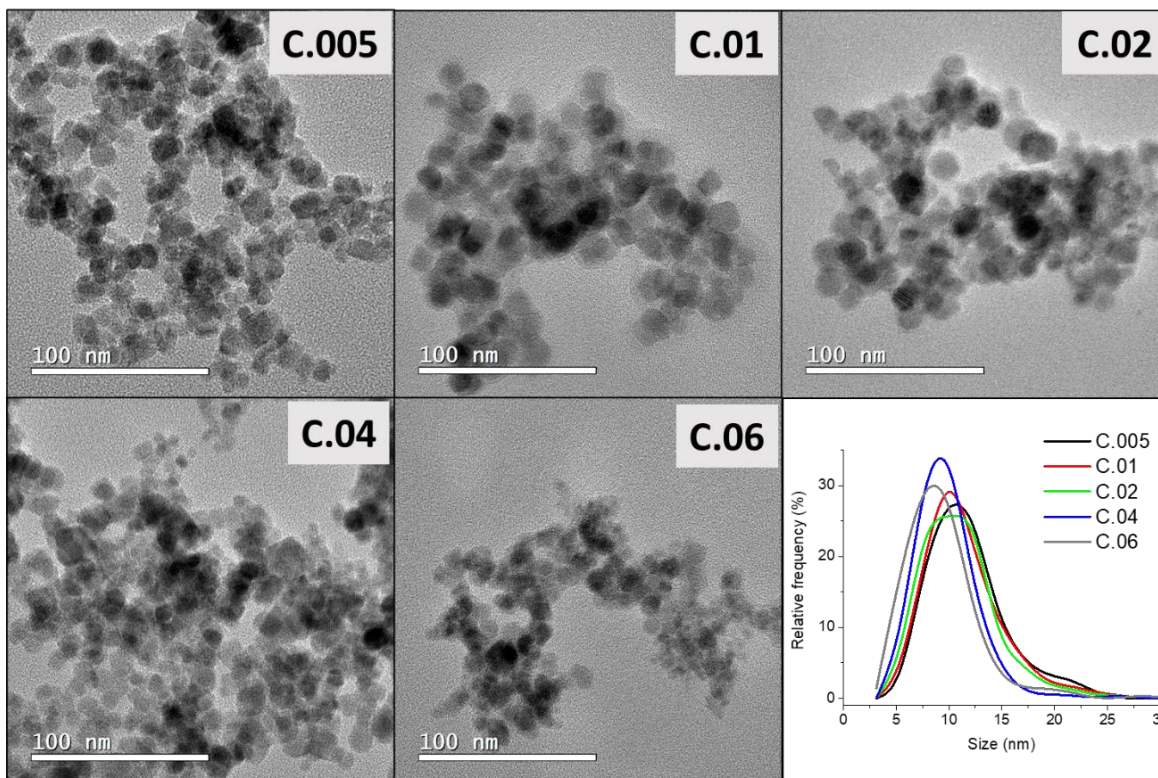
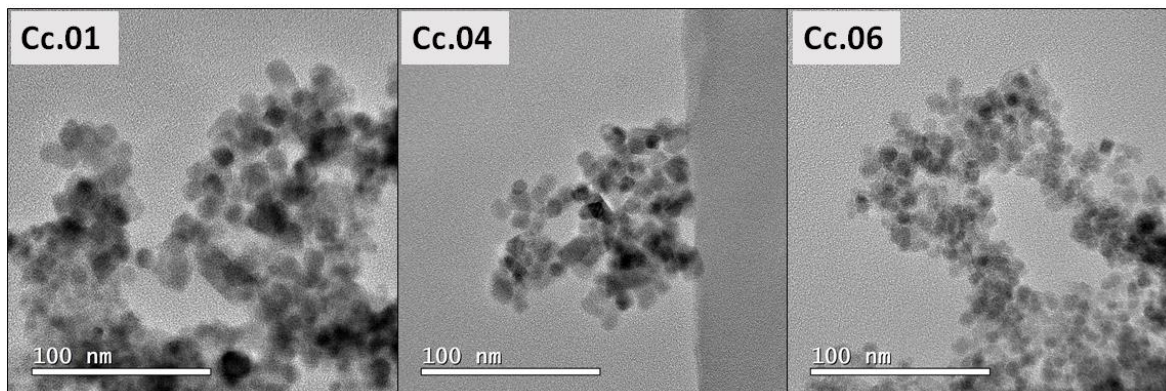


Figura 16 – Imagens de MET das amostras Cc.01 (esquerda), Cc.04 (centro) e Cc.06 (direita).



Outro fator que se mostrou novamente determinante para as características das nanopartículas é a temperatura de nucleação, ou de adição da solução de ferro. Para as sínteses a temperatura ambiente (21 °C), os tamanhos verificados por MET são menores e os conjuntos são mais monodispersos (Figura 16), em que o grau de polidispersão apresentou

mínimo de 18,9% para Cc.04; principalmente, os tamanhos de cristalito obtidos por DRX são menores. Tais resultados estão de acordo com o verificado por outros estudos, em que o tamanho de partícula aumentou de acordo com a temperatura de início da síntese (ROTH; SCHWAMINGER; SCHINDLER; WAGNER *et al.*, 2015; SCHWAMINGER; SYHR; BERENSMEIER, 2020). As justificativas apresentadas atualmente na literatura são baseadas na teoria clássica de nucleação e em processos de envelhecimento:

(i) que em temperaturas mais baixas, há menor solubilidade das espécies de Fe, aumentando o nível de supersaturação (S) da solução quando da adição à solução de base (ROTH; SCHWAMINGER; SCHINDLER; WAGNER *et al.*, 2015). De acordo com a equação 4, um aumento de S influencia em uma maior taxa de nucleação, consumindo mais precursor e reduzindo a disposição para o crescimento das nanopartículas. No entanto, a mesma equação 4 apresenta aumento da taxa de nucleação com aumento da temperatura, indo na direção contrária (SCHWAMINGER; SYHR; BERENSMEIER, 2020);

(ii) atribui-se à etapa de crescimento em temperaturas mais altas, o que potencializaria o envelhecimento de Ostwald, que é favorecido com maiores temperaturas (FORGE; ROCH; LAURENT; TELLEZ *et al.*, 2008). No entanto, neste caso o período de envelhecimento de 18 h a 90 °C também foi realizado nas amostras com adição de Fe a 21 °C (amostras Cc), após rampa de aquecimento de 10 min, sendo improvável que este aspecto tenha sido decisivo para tal discrepância;

(iii) a equação 3 expressa que r_c diminui com o aumento da temperatura, o que levaria à formação de núcleos menores a 90 °C. Tal fato também foi levantado como possível incentivo ao envelhecimento de Ostwald (ROTH; SCHWAMINGER; SCHINDLER; WAGNER *et al.*, 2015), mas parece pouco provável que o tamanho final fosse maior partindo de núcleos menores, somente pela adição de precursores individuais gerados por redissolução.

Dessa forma, a teoria clássica de nucleação parece dar pouco subsídio para explicar os resultados neste caso. Mais recentemente, no entanto, pesquisadores que acompanharam a formação das nanopartículas de magnetita por crio-microscopia eletrônica propuseram que seu mecanismo é não-clássico: ocorre inicialmente a formação de partículas primárias, possivelmente oxihidróxidos de ferro, que se agregam para formar estruturas maiores de magnetita (BAUMGARTNER; DEY; BOMANS; LE COADOU *et al.*, 2013; MIRABELLO; IANIRO;

BOMANS; YODA *et al.*, 2020). Diferentemente do processo clássico controlado por difusão, este crescimento seria controlado por reação, o que depende de temperatura (WIDDRAT; SCHNECK; REICHEL; BAUMGARTNER *et al.*, 2017). A 90 °C, pode ser fornecida energia suficiente para a agregação de mais partículas primárias entre si, acarretando nanopartículas de magnetita de tamanho final maior.

Apesar dessas novas proposições poderem parecer contradizer a teoria clássica, tal mecanismo pode ser enquadrado como um caso especial dentro do mesmo escopo. No caso, ao invés dos precursores que formarão os núcleos serem átomos ou moléculas, aqui eles são partículas primárias (de tamanho de grandes moléculas, na faixa de 1-2 nm) que se agregarão de forma similar para formar partículas cristalinas de magnetita (BAUMGARTNER; DEY; BOMANS; LE COADOU *et al.*, 2013; LEE; YANG; KWON; HYEON, 2016). Tanto é que o detalhamento da descrição da teoria clássica foi suficiente para explicar a maioria dos resultados discutidos neste trabalho, como o impacto do excesso de base. Em pH mais alcalino, o crescimento por coalescência pode ser reduzido devido a uma maior estabilidade coloidal das partículas; portanto, os conceitos da teoria DLVO (Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek), que descreve as forças de atração e repulsão, também devem ser considerados neste sistema complexo, como mostraram recentemente Mirabello *et al.* (MIRABELLO; IANIRO; BOMANS; YODA *et al.*, 2020).

Também é importante ressaltar que esses mecanismos não-clássicos foram propostos para a síntese tradicional por coprecipitação, diferentemente da redução-precipitação estudada neste caso. No entanto, até pela similaridade de tendências com outros resultados de sínteses por coprecipitação da literatura aqui apresentados, propõe-se que o mecanismo também seja válido para esta rota. Além disso, muitos dos aspectos dos processos se repetem, como o uso das soluções aquosas de meio básico, e as soluções de precursores devem ser análogas quanto às razões $[Fe^{3+}]/[Fe^{2+}]$ após a adição do agente redutor/sulfito.

Amostras sulfato

O uso de diferentes precursores de ferro e concentrações de agente redutor mostrou-se determinante para a obtenção da fase do material. A partir dos resultados obtidos por Qu *et al.* (QU; YANG; REN; KAN *et al.*, 1999), que realiza a síntese de magnetita utilizando cloreto férrico e sulfito de sódio em proporção $[Fe^{3+}]/[SO_3^-] = 3:1$, foi testada uma variação com o uso de sulfato férrico, visando evitar o caráter higroscópico do reagente cloreto. No entanto, o

produto S31 obtido apresentou coloração marrom clara, como mostra a Figura 17, diferentemente da cor preta característica da magnetita (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003). De fato, o resultado de difração de raios X, técnica de caracterização utilizada para verificar a fase formada, exibiu picos em posições de planos cristalinos reportados para a fase goetita (FeO(OH)), como mostra a Figura 18, corroborando com a cor verificada. Teoricamente, seria necessário 1 mol de SO_3^{2-} para reduzir 2 mols de Fe^{3+} a Fe^{2+} , no entanto a formação dos íons complexos é afetada por diversos fatores, como a concentração de ácido e a presença de íons comuns. Dessa forma, foi observado que o sal de ferro utilizado interferia no equilíbrio $\text{Fe}^{3+}/\text{SO}_3^-$, devido ao excesso de íons sulfato presentes no meio. Este é produto da oxidação do íon sulfito e desloca o equilíbrio da reação para os reagentes, inibindo a redução a Fe(II), na reação:

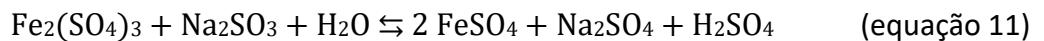
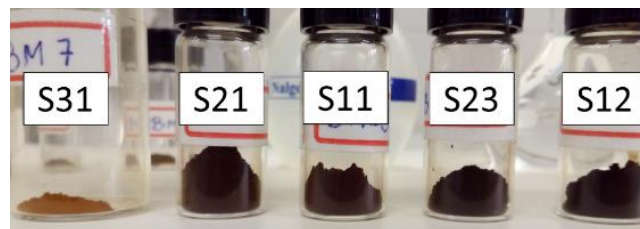
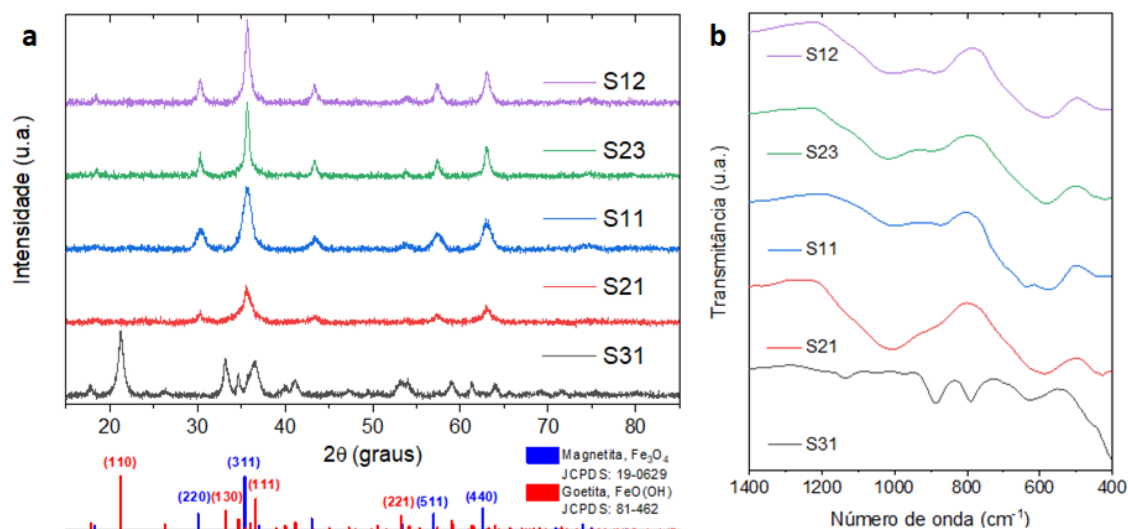


Figura 17 - Amostras S31, S21, S11, S23 e S12, de pó das cores cor marrom claro, duas de tom marrom escuro e duas últimas pretas, respectivamente.



Foi concluído que, se mantendo os reagentes utilizados, era necessário readequar a razão $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{SO}_3^-]$ para a obtenção do produto magnetita. A concentração de Na_2SO_3 foi aumentada em outras 4 sínteses, com razões de $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{SO}_3^-]$ de 2:1, 1:1, 2:3 e 1:2, das amostras M21, M11, M23 e M12, respectivamente, com a intenção de deslocar o equilíbrio para a formação dos produtos da reação. Os picos passaram a ser os característicos da magnetita em todos esses casos, como mostra a Figura 18. As duas primeiras apresentam um tom um marrom, possivelmente relacionado à fase maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), que possui padrão de difração praticamente idêntico ao da magnetita, sendo difícil fazer a distinção por DRX. As duas últimas são realmente pretas, indicando que a proporção $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{SO}_3^-]$ para a obtenção de magnetita deve ser de pelo menos 2:3.

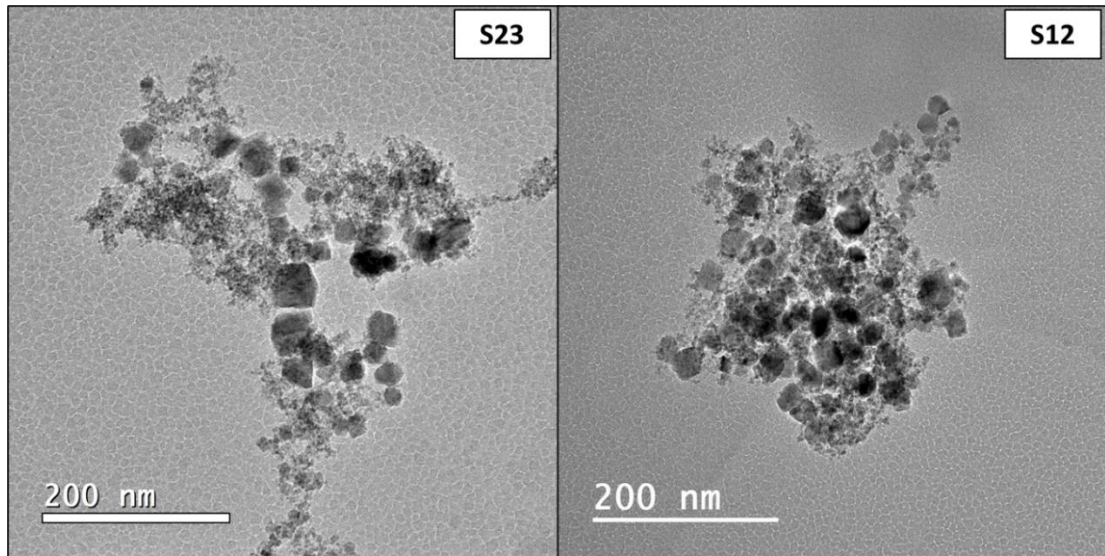
Figura 18 – Difratomogramas de raios X (a) e espectros de FTIR (b) das amostras sintetizadas com $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$.



Os espectros de infravermelho (FTIR) das amostras corroboram com as afirmações. Há contraste nas composições, de acordo com a concentração de Na_2SO_3 utilizada, conforme apresentado na Figura 18. S31 apresenta bandas referentes a goetita, com bandas características em 795 e 892 cm^{-1} , enquanto S23 e S12 apresentam banda característica da magnetita mais destacada em torno de 580 cm^{-1} (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003).

Quanto ao tamanho de partícula, S23 e S12 apresentaram tamanhos de cristalito de 11,7 nm e 10,7 nm, respectivamente. Na análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET), S23 e S12 apresentaram alta polidispersão, com tamanhos de 10,5 nm \pm 7,6 e 11,6 nm \pm 6,0, respectivamente, como mostra a Figura 19. Podem ser notadas duas famílias de partículas, uma de tamanho menor, ao redor de 8 nm, e outra maior, na faixa de 20 nm. Essa maior dispersão de tamanhos em relação às demais amostras pode estar relacionada às características dos contra-íons Cl^- e SO_4^{2-} (LUENGO; MORALES; GUTIERREZ; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, 2016), que atuam na superfície das nanopartículas pela estruturação do solvente ao redor delas, e pela sua concentração no meio de reação, maior no caso do sulfato.

Figura 19 – Imagens de MET das amostras S23 (esquerda) e S12 (direita).

Tabela 7 – Resultados de cor, tamanho, tamanho de cristalito, magnetização (saturação, M_s , e a 250 Oe, M_{250}), coercividade (H_c) e SAR das amostras sintetizadas com sulfato.

Amostra	Cor	Tamanho (MET, nm)	Cristalito (DRX, nm)	M_s (emu/g)	M_{250} (emu/g)	H_c (Oe)	SAR ($W g^{-1}$)
S31	Marrom claro	-	12,1	-	-	-	-
S21	Marrom escuro	-	10,8	-	-	-	-
S11	Marrom escuro	-	7,7	-	-	-	-
S23	Preto	$10,5 \pm 7,6$	11,7	35,5	14,9	26,8	21,6
S12	Preto	$11,6 \pm 6,0$	10,7	44,5	16,9	15,6	28,2

O parâmetro de Hofmeister é uma medida da cosmotropicidade do íon. Quanto maior é o parâmetro, maior é a capacidade do ânion de estruturar o solvente ao seu redor. O parâmetro é maior para o SO_4^{2-} que para o Cl^- , o que lhe causa um maior efeito de *salting out* e aumenta as taxas de nucleação e de crescimento (LUENGO; MORALES; GUTIERREZ; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, 2016). No entanto, o controle de tais processos foi ruim. Seriam necessários maiores estudos dos parâmetros de síntese para atingir um maior controle morfológico, no entanto, nesta tese o uso do sulfato foi abandonado em prol de maiores testes com cloreto para aprimoramento da síntese.

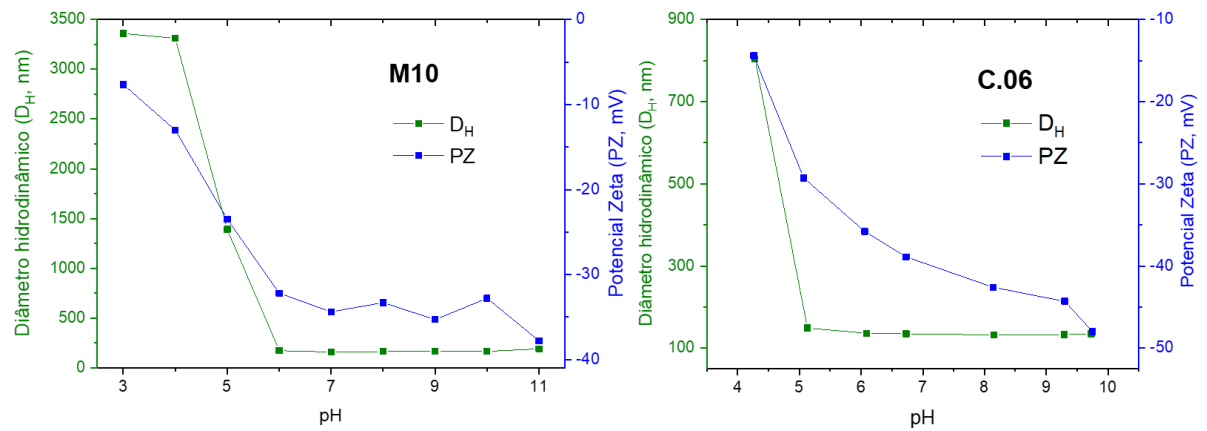
4.1 Estabilidade coloidal

As suspensões de nanopartículas em meio aquoso apresentam boa estabilidade coloidal, sem que seja verificada decantação mesmo após meses de estocagem, na maioria dos casos. Para estudar tal comportamento mais a fundo, foram realizadas medidas de

espalhamento de luz dinâmico (DLS) e mobilidade eletroforética, que fornecem os resultados de diâmetro hidrodinâmico e carga de superfície (potencial zeta) das nanopartículas, em soluções aquosas de diferentes valores de pH. O potencial zeta é uma medida do potencial elétrico entre a superfície das partículas (com os íons proximalmente ligados a elas) e o meio em que elas se encontram. Valores entre os limiares de -30 mV e +30 mV são considerados indicadores de baixa repulsão eletrostática, e valores inferiores ou superiores a eles indicam alta repulsão, o que aumenta a estabilidade coloidal da suspensão (MALVERN, 2013). Além da carga de superfície, outras características também podem influenciar a estabilidade, como o comportamento magnético – alta remanência (magnetização espontânea) aumenta a atração magnética entre partículas. Uma baixa estabilidade leva à agregação e floculação das partículas, verificadas pelo aumento do diâmetro hidrodinâmico medido por DLS, sendo que partículas nessas condições não são indicadas para aplicações biomédicas.

Os gráficos da Figura 20 mostram os comportamentos das suspensões de partículas das amostras M10 e C.06 em solução aquosa para diferentes valores de pH. Nota-se da amostra M10 que, em pH ácido abaixo de 6, as nanopartículas apresentam potencial zeta entre 0 e -24 mV, associado a um alto grau de agregação, com diâmetro hidrodinâmico maior que 1,5 μm , referente à medida de intensidade do equipamento (*Z-average*). Em valores de pH acima de 6, as superfícies das nanopartículas passam a ter alta carga negativa, com potencial zeta menor que -30 mV. Nessa situação, a repulsão eletrostática passa a ser decisiva para que os agregados diminuam de tamanho, ficando em torno 170 nm na medida por intensidade de espalhamento (*Z-average*). A tendência é bastante semelhante para C.06, mas neste caso com potenciais zeta mais negativos e tamanhos hidrodinâmicos menores, a partir de pH 5. Isso pode estar relacionado ao seu tamanho seco menor (por MET e de cristalito por DRX), levando a uma maior área de superfície e menor remanência magnética.

Figura 20 – Resultados de diâmetro hidrodinâmico e potencial zeta das amostras M10 (esquerda) e C.06 (direita).



A carga negativa das nanopartículas está relacionada à presença de grupos hidroxilas e sulfato na superfície, provenientes da síntese, como sugerido pelas análises de FTIR. Apesar das seguidas lavagens por separação magnética, essas moléculas não são eliminadas, como confirmam os espectros no infravermelho. Em pH ácido entre 3 e 6, apesar de não ocorrer protonação desses grupos, a maior concentração de íons H^+ ao seu redor favorece a redução da dupla camada elétrica, levando a agregação.

A Tabela 8 mostra resultados obtidos para algumas outras amostras, em pH igual a 4, 7 e 10. Nota-se que as medidas de *Z-average* ficam na faixa de 100 a 300 nm em pH 7, indicando algum nível de agregação, o que é comumente visto para nanopartículas de magnetita. O índice de polidispersividade (PDI) é alto para pH 4 e diminui bastante para pH 7 e 10, mas valores na faixa de 0,2 indicam que deve haver uma variação de tamanho entre partículas livres e pequenos agregados. Esta medida por intensidade é o resultado mais direto da medida de DLS, mas dá maior peso para partículas maiores ou agregados, visto que estes espalham mais luz do que partículas pequenas dispersas. O espalhamento de uma partícula é proporcional à sexta potência de seu diâmetro, de acordo com a aproximação de Rayleigh (MALVERN, 2013).

Tabela 8 – Resultados de DLS de amostras de magnetita, com tamanho por intensidade (*Z-average*), por número (*number mean*), índice de polidispersividade (Pdl) e potencial zeta.

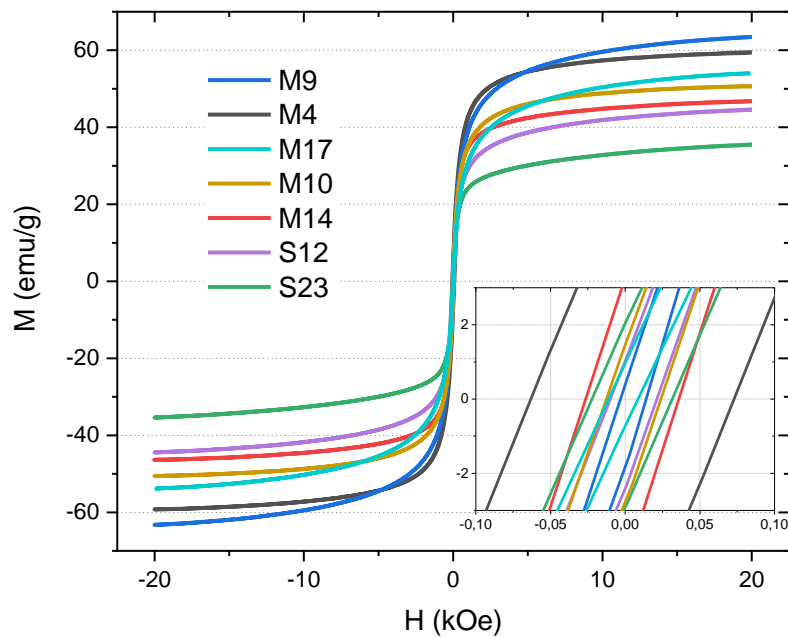
Amostra	pH	Z-average (nm)	Tamanho por número (nm)	Pdl	Pot. Zeta (mV)
M10	4	3311	584,9	0,921	-13,0
	7	160,5	73,6	0,282	-34,4
	10	167,2	76,0	0,288	-32,8
M15	4	2817,0	586,7	0,952	-15,5
	7	418,3	145,9	0,418	-28,3
	10	373,9	84,3	0,350	-39,5
M16	4	3898,0	1515,0	0,477	-10,2
	7	378,7	128,2	0,390	-28,9
	10	226,1	70,7	0,470	-32,8
C.06	4	803,9	113,5	0,492	-14,4
	7	134,8	71,0	0,205	-38,9
	10	134,8	66,3	0,202	-48,0
M9	7	215,0	71,0	0,295	-29,6
M17	7	141,3	74,2	0,171	-
M22	7	191,8	80,0	0,252	-
S12	7	308,3	112,1	0,344	-32,9

A medida de tamanho médio por número (*number mean*, do equipamento) é obtida por um cálculo que visa ponderar a magnitude de espalhamento, através de uma distribuição de tamanho das unidades espalhadoras de luz, evitando possíveis distorções causadas por poucos, porém relativamente grandes, aglomerados. Realmente, as medidas de tamanho por número mostram valores menores, sendo que a maioria das amostras têm resultados abaixo de 100 nm em pH 7, indicando a presença de partículas mais livres ou pequenos agregados. Cabe ressaltar que as análises foram realizadas com as nanopartículas após a lavagem, ou seja, nenhum estabilizante ou agente de superfície foi adicionado ao sistema.

4.2 Caracterização magnética e resposta hipertérmica

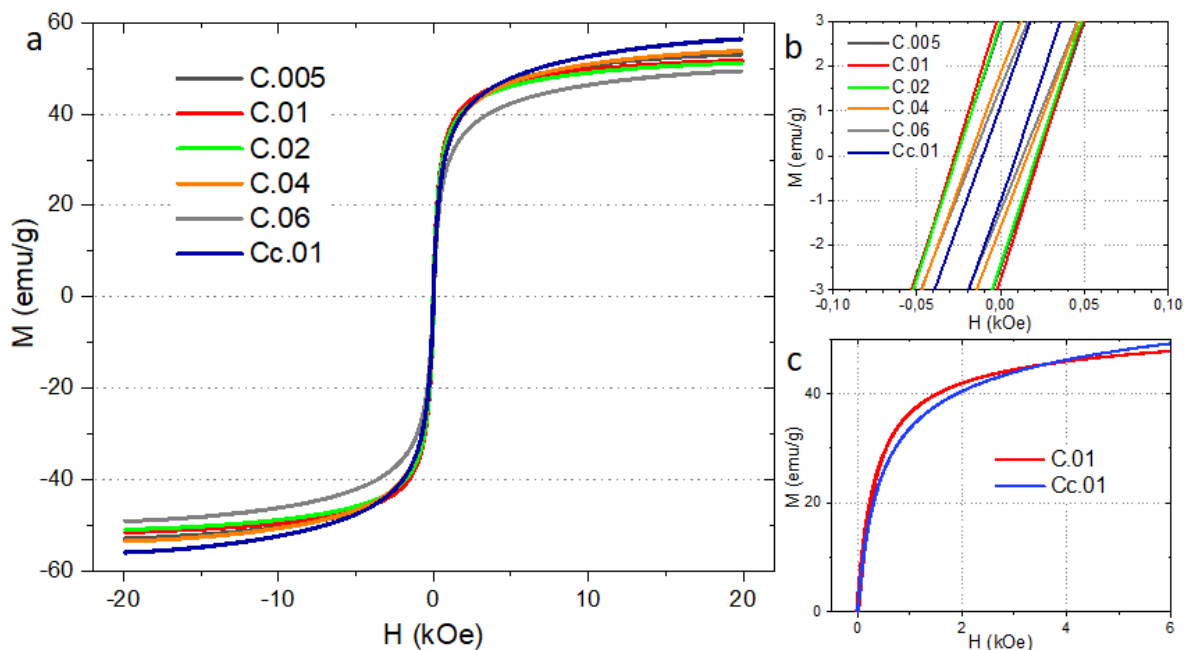
A caracterização magnética das amostras de magnetita foi realizada através da técnica de magnetometria de amostra vibrante (VSM), com medidas realizadas a temperatura ambiente. Em geral, os resultados obtidos mostram um comportamento considerado superparamagnético ou similar (*superparamagnetic-like*), devido a uma pequena histerese e um rápido crescimento da magnetização de acordo com o campo H aplicado. Alguns dos resultados estão retratados na Figura 21 e descritos nas Tabelas 4, 6 e 7.

Figura 21 - Curvas de magnetização em função de campo auxiliar H aplicado, para 7 amostras diferentes de magnetita.



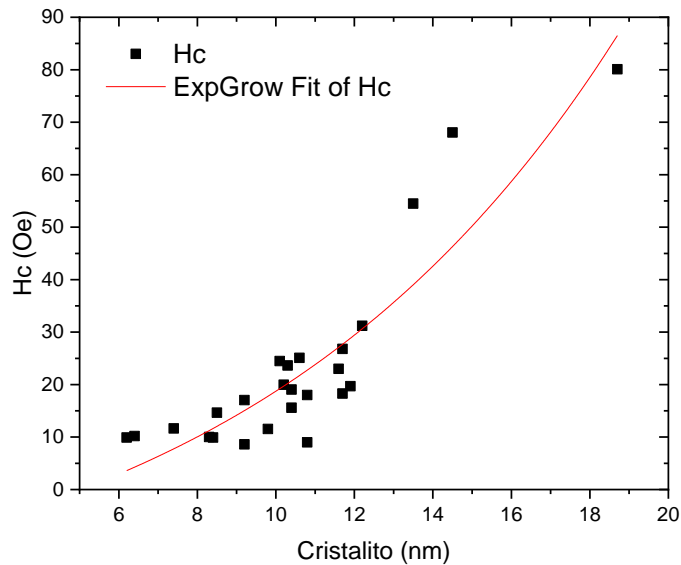
As magnetizações de saturação (M_s) chegam a até 63,4 emu/g (amostra M9) para um campo máximo de 20 kOe. Extrapolando as medidas para um campo infinito aplicado, elas podem chegar até a 67,8 emu/g, um pouco mais próximo do valor de saturação da magnetita e da maghemita *bulk*, de aproximadamente 92 emu/g e 76,0 emu/g, respectivamente (CULLITY; GRAHAM, 2009). Tal diferença é comum para nanopartículas, visto que a M_s depende de seu tamanho e cristalinidade (LI; KARTIKOWATI; HORIE; OGI *et al.*, 2017), sendo que a presença de uma chamada “camada morta” (*dead layer*) na superfície com menor ordenamento dos átomos, diminui a magnetização final em relação a um material de tamanho maior. Além disso, a M_s pode ser impactada pela proporção dos óxidos de ferro e pelos resíduos das sínteses (moléculas de hidroxila e sulfato na superfície). Apesar de não ter sido identificada uma tendência marcante entre as amostras, é notável como as partículas sintetizadas com FeCl_3 têm M_s maior que as provenientes de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. Outro parâmetro destacado das medidas de VSM foi a magnetização a $H = 250$ Oe, que é a amplitude do campo magnético alternado utilizado nas medidas de hipertermia. Neste ponto, C.01 tem o maior valor (19 emu/g), mesmo apresentando M_s menor que outras amostras, como a própria Cc.01, com mesma $[\text{OH}^-]_{\text{exc}}$, mas com injeção de precursor a temperatura ambiente.

Figura 22 – Curvas de magnetização em função de campo auxiliar H aplicado das amostras do grupo de estudo do pH.



Apesar dos valores de coercividade intrínseca H_c (campo reverso requerido para reduzir M a zero) serem baixos – menores do que 30 Oe – pode ser notado como o tal parâmetro apresenta uma tendência de aumento com o tamanho médio de cristalito, como mostrado pela linha exponencial em vermelho (guia para os olhos) na Figura 23. Entretanto, uma correlação entre os parâmetros deve ser realizada analisando os dados de temperatura de bloqueio magnético (T_B) obtidas através das curvas de magnetização em função da temperatura, denominadas curvas FC e ZFC (do inglês *field-cooling* e *zero-field-cooling*), as quais não foram possíveis realizar nesse trabalho. Em partículas de monodomínio magnético (*single domain*), os momentos magnéticos dos átomos se tornam mais bloqueados com o aumento dos cristais, deixando o regime superparamagnético, no qual os momentos alternam seu sentido constantemente (CULLITY; GRAHAM, 2009). Em sistemas polidispersos, partículas maiores, de momentos bloqueados, também influenciam a magnetização da amostra ao criar um campo estático local, magnetizando as partículas menores.

Figura 23 – Correlação entre coercividade e tamanho de cristalito para as amostras de magnetita, com curva exponencial como guia.



Para avaliação a viabilidade de aplicação no tratamento de câncer por hipertermia magnética, foi testada a capacidade das suspensões de nanopartículas produzirem calor através da aplicação de campo magnético alternado. A partir da aplicação do campo magnético com frequência 109,8 kHz e amplitude de 24 mT, as partículas aquecem o meio dispersante, com taxas que dependem das concentrações e das características físico-químicas de cada amostra de nanopartículas. A Figura 24 mostra o aquecimento das amostras M9 (a) e S12 (b), nas concentrações de 3 mg/mL e 5 mg/mL, em que o campo é ligado na marca de 30 s e desligado aos 500 s. A taxa de aquecimento aumenta de acordo com o aumento da concentração de partículas das suspensões pois aumenta o número de fontes de calor no meio, mas também influencia na interação entre partículas, não sendo necessariamente linear. Quanto às características das partículas, sua morfologia, distribuição de tamanhos, magnetização, cristalinidade e estabilidade coloidal são determinantes para o potencial de aquecimento, como mostram os resultados das amostras sintetizadas com diferentes excessos de base, na Figura 25.

Figura 24 – Resultados de hipertermia de M9 (a) e S12 (b) em concentrações de 3 mg/mL e 5 mg/mL.

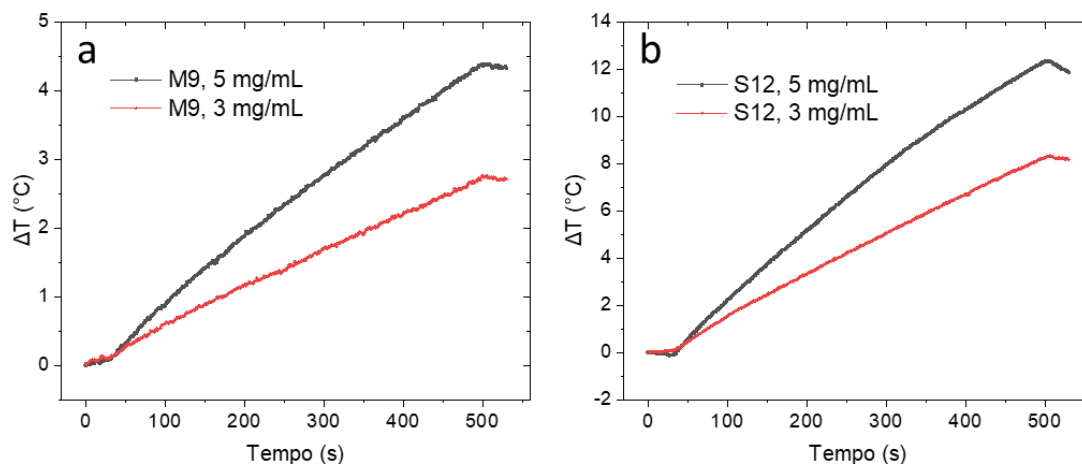
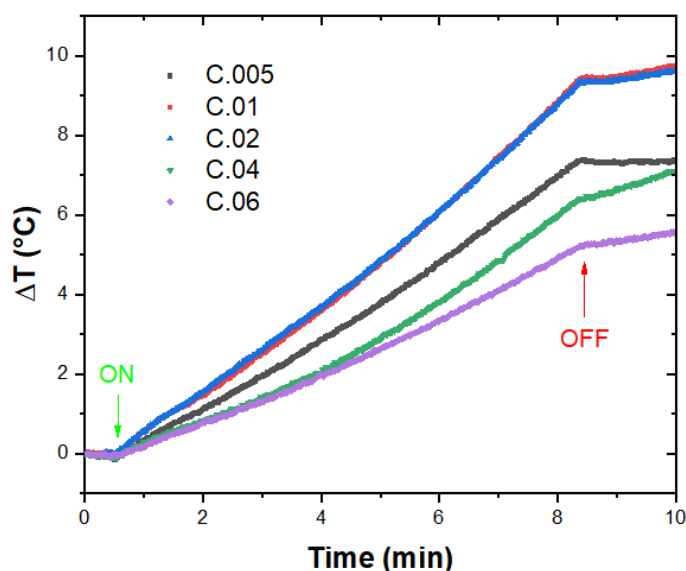


Figura 25 - Resultados de hipertermia pela aplicação de campo magnético de 109 kHz e 25 mT.

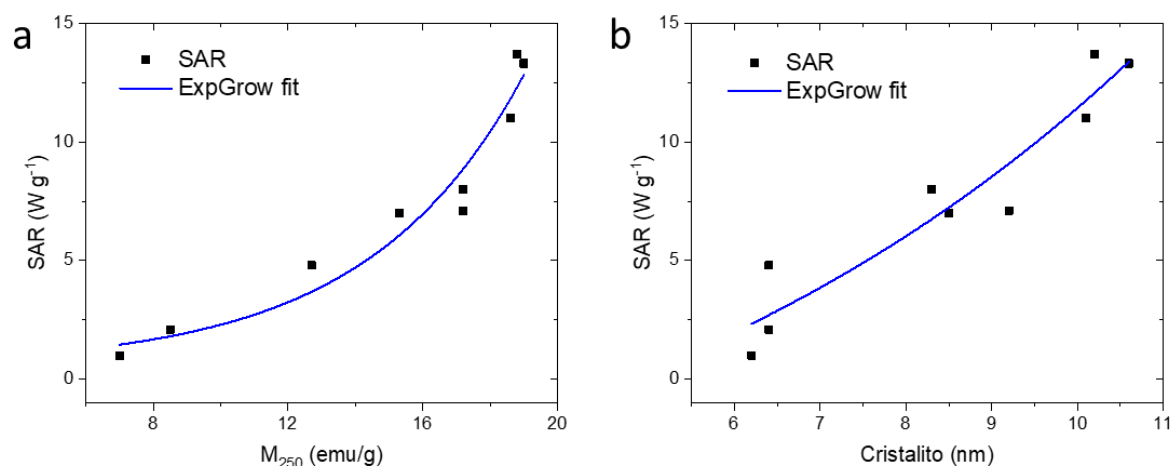


Com as curvas, é possível calcular os respectivos valores de SAR (*Specific Absorption Rate*). Na literatura diversos métodos já foram aplicados para calcular o SAR, sendo os principais baseados na variação de temperatura ao longo de todo o experimento ($\Delta T/\Delta t$), na inclinação inicial curva em que o aquecimento é máximo, $(dT/dt)_{\text{máximo}}$, ou calculado de acordo com o ajuste da curva com uma equação exponencial do tipo Box Lucas. Este último método é considerado o mais adequado para a estimativa do potencial de aquecimento de uma suspensão de partículas em um sistema não adiabático; o ajuste da curva diminui os erros associados à seleção de pontos específicos para a medida, sujeitos a flutuações pontuais de temperatura (LANIER; KOROTYCH; MONSALVE; WABLE *et al.*, 2019). Portanto, com aplicação da equação 10, os valores de SAR foram calculados, com unidade de Watts por grama de

amostra, e estão reportados nas Tabelas 4, 6 e 7. Os valores de SAR obtidos são bons, se considerando que algumas amostras foram capazes de aquecer a suspensão com taxa de aquecimento superior a $1,1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, suficientes para atingir em menos de 5 min a faixa de temperatura do tratamento de hipertermia, a partir de $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ (considerando temperatura corpórea inicial de cerca de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$). A comparação de valores de SAR nem sempre é ideal devido à grande variabilidade experimental encontrada na literatura, no entanto, há resultados melhores apresentados para partículas de tamanho maior, especialmente as sintetizadas por rotas que permitem maior controle morfológico, como a decomposição térmica (VREELAND; WATT; SCHOBBER; HANCE *et al.*, 2015).

É comum ser apontado na literatura que a magnetização de saturação (M_s) é um parâmetro determinante para o desempenho das partículas em hipertermia magnética. No entanto, não se nota uma correlação direta entre a M_s e o valor de SAR das amostras. A amostra Cc.01, por exemplo, apresenta alta M_s , de $56,5\text{ emu/g}$, mas SAR relativamente baixo de $8,0\text{ W g}^{-1}$, enquanto C.01 tem M_s menor de $51,7\text{ emu/g}$ e SAR maior de $13,3\text{ W g}^{-1}$. Na verdade, o aquecimento produzido está sempre relacionado com as características do campo magnético aplicado – no caso dos valores reportados aqui, foi aplicado campo alternado de frequência de $109,8\text{ kHz}$ e amplitude de 25 mT (igual a 250 Oe), condições semelhantes ao equipamento comercial comumente aplicado para tratamento de câncer por hipertermia magnética, que trabalha a 226 Oe e 100 kHz (GNEVECKOW; JORDAN; SCHOLZ; BRUSS *et al.*, 2004). Quando avaliada com campo aplicado H de 250 Oe , a magnetização (M_{250}) se mostra um fator importante na predição do SAR. A Figura 26a mostra essa correlação para as amostras do grupo de estudo de pH; as demais amostras não foram incluídas devido à alta heterogeneidade de características e à maior polidispersão de tamanhos de algumas delas, fatores que diminuem a correlação.

Figura 26 - Correlações entre M_{250} (a) e tamanho de cristalito (b) e os resultados de SAR, com curvas exponenciais como guias.



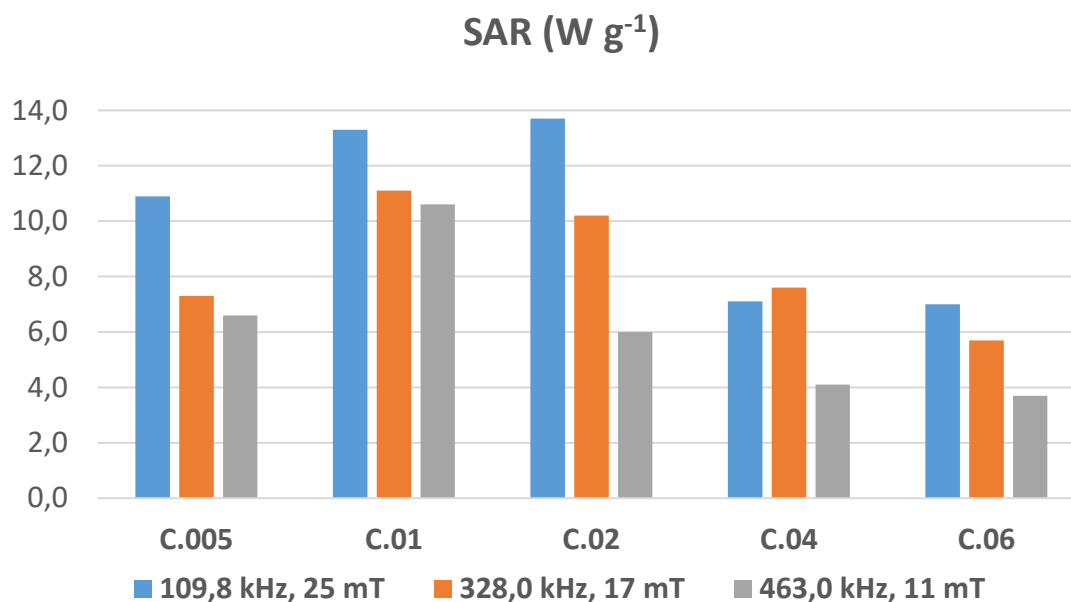
Como o campo magnético alternado aplicado chega até apenas 250 Oe, para o SAR não importa a capacidade de magnetização da amostra sob campos mais intensos. Logo, é a magnetização nessa faixa de campo que deve ser avaliada para predizer e tentar potencializar o SAR. Quando se trata da hipertermia de materiais superparamagnéticos, o que importa é a facilidade de magnetizar o sistema com baixo campo H, e não a magnetização máxima do sistema; em termos físicos, é mais uma questão da suscetibilidade magnética inicial sob campo de baixa intensidade, e não de saturação magnética sob altos campos.

A temperatura aplicada durante o processo de nucleação foi um parâmetro crítico da síntese para a obtenção de um alto valor de SAR: em geral, as partículas sintetizadas com injeção de precursor a 90 °C apresentaram maiores valores em relação às realizadas a temperatura ambiente. Um exemplo interessante é a comparação entre duas as amostras sintetizadas em temperaturas diferentes, C.01 (90 °C) e Cc.01 (21 °C): a primeira tem M_s menor (51,7 emu/g vs. 56,5 emu/g) mas M_{250} maior (19,0 emu/g vs. 17,2 emu/g). A Figura 22c acima mostra como a suscetibilidade magnética das amostras se comporta de forma diferente dependendo do campo H, com C.01 tendo uma maior verticalidade inicial da curva de magnetização, o que se reflete nos resultados de hipertermia com SAR maior para C.01 (13,3 $W g^{-1}$ vs. 8,0 $W g^{-1}$). Além da magnetização, o SAR está diretamente relacionado ao tamanho de partícula, que também foi maior para as partículas de injeção a quente. Diversos estudos apontam que o SAR aumenta com o tamanho das partículas de magnetita, chegando a um máximo ao redor de 25 nm, e depois caindo novamente (SHAH; DAVIS; GOVER; NIKLES *et al.*, 2015; VREELAND; WATT; SCHOBBER; HANCE *et al.*, 2015). Nos estudos desta tese, foi verificada

correlação do SAR principalmente com o tamanho de cristalito (Figura 26b) e também do tamanho por MET. Entre C.01 e Cc.01, os tamanhos de cristalito foram de 10,6 nm e 8,3 nm, respectivamente, e os tamanhos por MET, 11,4 nm e 9,8 nm, respectivamente, corroborando a justificativa da diferença dos aquecimentos gerados.

Os experimentos de hipertermia também foram realizados variando as condições hipertérmicas de campo e frequência (Figura 27). Os valores de SAR diminuíram nas condições de maior frequência e menor amplitude de campo; ambos os fatores são diretamente proporcionais ao aquecimento, sendo que a amplitude se mostrou o mais preponderante. Se cada ciclo gera a mesma quantidade de energia, o aumento do número de ciclos teoricamente aumentaria linearmente a liberação de energia, mas a amplitude do campo possui um efeito mais importante, uma vez que o aumento da magnetização das partículas no campo aplicado é muito significativo na faixa de campo H até 25 mT. De fato, a equação de liberação de energia intrínseca (ILP, do inglês *Intrinsic Loss Power*: $ILP = SAR/(f H^2)$), tipicamente aplicada na literatura para tentar ponderar a influência da frequência (f) e da amplitude (H), divide o valor de SAR por H elevado à segunda potência e f, à primeira (LANIER; KOROTYCH; MONSALVE; WABLE *et al.*, 2019). Além disso, estudos recentes mostraram que a magnetização de uma partícula ocorre primeiro pela rotação dos momentos magnéticos (rotação de Néel) e depois pela rotação da partícula (Browniano), com tempos de relaxação da ordem de 10^{-5} s e 10^{-8} s, respectivamente. Na faixa de 1 kHz, a resposta magnética se dá de forma dominante pela relaxação Browniana, mas conforme a frequência aumenta para além de 100 kHz, este fenômeno fica limitado, com aumento da dominância da relaxação de Néel (OTA; TAKEMURA, 2019).

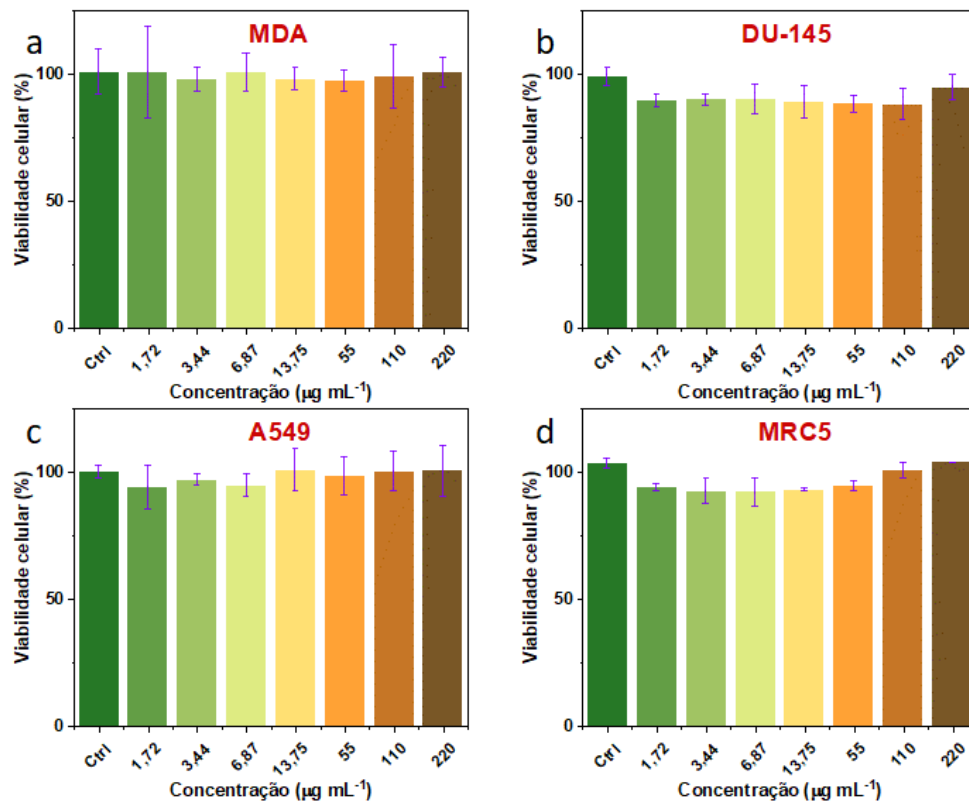
Figura 27 – Resultados de SAR das amostras sintetizadas em diferentes valores de pH, realizados em 3 condições de campo. SAR calculado por ajuste Box Lucas.



4.3 Viabilidade celular

O efeito das nanopartículas C.02 na viabilidade celular de diferentes linhagens tumorais e não tumorais foi avaliado por ensaio de MTT. O objetivo destes testes foi investigar se as partículas apresentam efeito citotóxico mesmo sem a aplicação do campo magnético para hipertermia, principalmente para verificar a segurança da aplicação do material. Foram avaliadas as linhagens MDA-MB-231 (câncer de mama), A549 (câncer de pulmão), DU-145 (câncer de próstata) e MRC-5 (pulmão não tumoral), em contato com nanopartículas nas concentrações de 1,72 até 220 $\mu g mL^{-1}$, por 48 h. Os resultados estão apresentados na Figura 28.

Figura 28 – Resultados de viabilidade celular de acordo com a concentração de nanopartículas C.02, para as linhagens MDA (a), DU-145 (b), A549 (c) e MRC5 (d).



As medidas mostram que as nanopartículas não modificaram a viabilidade celular de forma relevante em relação ao controle (células sem nanopartículas), indicando que não são citotóxicas às linhagens nas concentrações testadas. Essas observações confirmam as expectativas a partir de resultados anteriores da literatura que atestam a biocompatibilidade da magnetita *in vitro*. Anteriormente, nanopartículas de magnetita haviam sido testadas contra as linhagens MDA-MB-231 com até $75 \mu\text{g mL}^{-1}$ (POLLER; ZALOGA; SCHREIBER; UNTERWEGER *et al.*, 2017), A549 até $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (KONONENKO; ERMAN; PETAN; KRIZAJ *et al.*, 2017) MRC-5 até $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ALIAKBARI; MOHAMMADIAN; ESMAEILI; PAHLEVANNESHAN, 2019), em todos os casos também por 48 h, sem mostrar toxicidade. Um aspecto interessante dos resultados é que a concentração mais alta de nanopartículas ($220 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentou uma viabilidade alta, comparável ou até mais alta que o controle. Estão sendo realizados estudos em concentrações maiores para avaliar o que está causando este efeito.

5. Conclusão parcial

Este capítulo da tese apresentou como foram explorados diferentes parâmetros para o aperfeiçoamento da rota de síntese de nanopartículas de magnetita por redução-precipitação proposta por Qu *et al.*, visando a aplicação principal de hipertermia magnética para tratamento de câncer. De forma geral, foram obtidas partículas de fase principal de magnetita, de tamanhos médios de 6 a 14 nm, mas tipicamente na faixa de 11 nm. A superfície das nanopartículas apresenta grupos hidroxila e sulfato, os quais conferem carga negativa que auxilia na repulsão eletrostática entre as partículas, resultando em estabilidade coloidal sem precipitação por meses. Sob efeito de campo magnético alternado, as partículas foram capazes de aquecer o meio com taxas maiores que 1 °C/min, com valores de SAR de até 28 W/g de amostra.

De acordo com os objetivos traçados, inicialmente foram desenvolvidos protocolos que permitiram obter um produto de maior uniformidade morfológica, como nas amostras M19, de tamanho 10,7 nm ± 2,1 (MET) e adição de Fe à solução de hidróxido de sódio de $[\text{OH}^-]_{\text{exc}}$ de 0,04 mol/L, na temperatura de 21 °C, com envelhecimento de 18 horas a 90 °C. Posteriormente, buscou-se estratégias para aumentar o SAR, em que se provou eficiente realizar a injeção de Fe à solução de hidróxido de sódio de $[\text{OH}^-]_{\text{exc}}$ de 0,01 mol/L a 0,02 mol/L, a 90 °C, como na amostra C.01, de tamanho 11,4 nm ± 3,5 nm (MET). O uso do reagente sulfato férrico no lugar do cloreto férrico também se mostrou eficiente para aumentar o valor de SAR, provavelmente devido à presença de partículas maiores decorrente de uma maior distribuição de tamanhos mais larga, mas o uso desse precursor ainda demanda um melhor ajuste das condições experimentais. Os resultados foram relacionados com os processos de nucleação e crescimento de nanopartículas, explicados de acordo com argumentos a partir da descrição clássica da literatura e com o caso especial descrito como não-clássico.

Os resultados de viabilidade celular de diferentes linhagens mostraram que as partículas não afetaram de forma significativa seu crescimento em concentrações de até 220 µg/mL, o que permitiria a sequência de estudos de aplicação *in vivo* nessas condições. Espera-se que o trabalho possa contribuir com a comunidade científica para o desenvolvimento de rotas de síntese de nanopartículas de óxido de ferro com possibilidade de escalonamento de produção, com alto controle morfológico por química verde e, em última instância, para o aperfeiçoamento do tratamento de câncer por hipertermia magnética.

Capítulo 2: Polímeros e encapsulação de nanopartículas

1. Revisão bibliográfica

Nanopartículas inorgânicas, em especial as metálicas e seus óxidos, possuem propriedades de imenso potencial para serem aplicadas no tratamento e no diagnóstico de doenças. No entanto, sabe-se que tais partículas geralmente apresentam limitações para sua aplicação clínica, principalmente relacionadas a baixa estabilidade coloidal em meio aquoso e toxicidade aos organismos. Portanto, um passo fundamental para a produção de plataformas teranósticas é relacionado à encapsulação dessas nanopartículas com revestimentos hidrofílicos e biocompatíveis, de forma a superar esses obstáculos. Além disso, o acoplamento de moléculas ativas ou funcionais de diferentes características à camada de superfície da nanopartícula permite a adição das respectivas especificidades ao produto final, como a capacidade de atuarem como agentes citotóxicos sinérgicos contra tumores ou como promotores de reconhecimento específico a tecidos-alvo. O sistema pode ser constituído então pela nanopartícula inorgânica com diversos ligantes que, como “blocos de construção”, formam uma plataforma multifuncional (LIM, E.; KIM, T.; PAIK, S.; HAAM, S. *et al.*, 2015; SUN; ZHANG; PANG; HYUN *et al.*, 2014). Algumas das possibilidades para a formação de tal estrutura estão descritas a seguir, assim como as motivações de suas escolhas, discutidas inicialmente.

Estabilidade coloidal

A estabilidade coloidal de um sistema de nanopartículas em suspensão é fundamental para sua aplicação. No caso de administração intravenosa, partículas de baixa estabilidade podem flocular em um meio de alta força iônica como sangue. Neste caso, sua eliminação pelo organismo pode ser acelerada pelo sistema de defesa via fagocitose, o que deve ser evitado para que atinjam seu alvo no organismo. Para que apresentem disponibilidade na corrente sanguínea por um tempo mais longo (longa meia vida de circulação), diversas características são apontadas de acordo com estudos prévios da literatura. Além da estabilidade coloidal, é indicado que sejam hidrofílicas, tenham carga superficial neutra ou negativa e tamanho em geral na faixa de 6 nm a 200 nm. Em casos mais extremos, partículas que possam formar grandes agregados ainda podem causar riscos graves à saúde no caso de promover embolia (SUN; ZHANG; PANG; HYUN *et al.*, 2014).

A dinâmica entre as partículas é regida por forças de atração, como de van der Waals, magnética e de depleção, e de repulsão, como a eletrostática e estérica, como preconiza a teoria DLVO (Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek), formando um sistema complexo principalmente em fluidos biológicos. Para evitar a agregação, as forças de repulsão devem se sobrepôr às de atração; geralmente, isto é atingido por repulsão eletrostática com a produção de partículas com alta carga de superfície, ou por repulsão estérica, através da incorporação de moléculas hidrofílicas de superfície que constituem de uma barreira física que não permite a aproximação dos núcleos (GUERRINI; ALVAREZ-PUEBLA; PAZOS-PEREZ, 2018; VARANDA; SOUZA; PERECIN; MORAES *et al.*, 2019).

Direcionamento tumoral

Uma demanda essencial e um grande desafio para aplicações intravenosas de sistemas nanoparticulados para o tratamento do câncer é que o efeito citotóxico seja específico para as células tumorais, de forma a aumentar o potencial terapêutico e diminuir os efeitos colaterais. As estratégias de direcionamento de nanopartículas para um alvo no organismo podem ser divididas como passivas ou ativas, sendo que a primeira visa sua acumulação por características fisiológicas da região de interesse e a segunda ocorre através de uma interação sítio específica com algum receptor celular (LI; ZHANG, 2019).

Como estratégia passiva, uma vez que o material chega à região desejada através da corrente sanguínea, seu tamanho nanométrico pode permitir sua acumulação em tumores através do Efeito de Permeação e Retenção Aumentada (EPR). O efeito se baseia nos fatos que os vasos sanguíneos que irrigam tumores geralmente apresentam aberturas da ordem de 300 nm, através das quais as nanopartículas podem extravasar, e que o sistema linfático é ineficiente na região, não conseguindo drenar todo o material estranho (MAEDA; NAKAMURA; FANG, 2013; PERRAULT; WALKEY; JENNINGS; FISCHER *et al.*, 2009). Como estratégia ativa, pode ser realizado o acoplamento de moléculas que tenham afinidade por tecidos-alvo específicos à superfície da partícula. Diferentes agentes-alvo e tipos de ancoramento para células tumorais vêm sendo relatados na literatura (WICKI; WITZIGMANN; BALASUBRAMANIAN; HUWYLER, 2015), como o ácido fólico, cujos receptores são super expressados na maioria das células tumorais e são mais raros em tecidos saudáveis (LU; LOW, 2012).

No caso de nanopartículas de magnetita, sua propriedade de magnetismo também pode ser explorada para o direcionamento das partículas. Com a aplicação externa de um gradiente de campo magnético, o material pode ser guiado pela corrente sanguínea até a região de interesse (CORCHERO; VILLAVERDE, 2009).

Fármacos e encapsulação

Para utilização em tratamento de tumores, também é interessante a inserção de fármacos no sistema nanométrico, os quais podem vir a atuar como um segundo agente terapêutico em conjunto com a nanopartícula (KUO; LIU; CHAN; TSAI *et al.*, 2016). Dessa forma, é possível formar um sistema antitumoral poderoso ao combinar quimioterapia e hipertermia. Além disso, a nanopartícula pode atuar em conjunto com inúmeros tipos de fármacos que podem apresentar alta capacidade de matar células tumorais *in vitro*, mas sofrer de dificuldades relacionadas à sua administração para o tratamento. Por exemplo, doxorrubicina é um antibiótico potente contra diversos tipos de câncer, mas sua alta toxicidade exige que ela seja incorporada a um carreador que a direcione até o alvo terapêutico, aumentando sua eficácia (JOHN; JEONG; JOHNSON; HEO *et al.*, 2015). A plataforma magnética em questão pode acondicionar o fármaco em sua camada de recobrimento mais externa e conduzi-lo com menor risco de toxicidade até o tecido tumoral.

Para a incorporação de fármacos e outras moléculas, é necessário prover uma estrutura com a qual tenham afinidade química, que favoreça seu aprisionamento em relação à interação com o meio externo. Geralmente, para fármacos hidrofóbicos em um meio aquoso isso é atingido com estruturas poliméricas de cadeias hidrofóbicas (FERRARI; SPONCHIONI; MORBIDELLI; MOSCATELLI, 2018). Uma vez no local de interesse, o fármaco deve ser liberado, visto que em geral o efeito quimioterápico do fármaco só é efetivo quando a molécula está livre (MALUGIN; KOPECKOVA; KOPECEK, 2007). Dependendo das características da partícula, a liberação pode ser controlada de acordo com diversos estímulos, como: o pH do meio (LIM, E. K.; KIM, T.; PAIK, S.; HAAM, S. *et al.*, 2015), o que é conveniente uma vez que na região tumoral tipicamente há uma mudança de pH para valores menores (PERSI; DURAN-FRIGOLA; DAMAGHI; ROUSH *et al.*, 2018); em função de aumento de temperatura, que pode ser desencadeada pela hipertermia magnética (LIU; HU; LIU; CHEN *et al.*, 2009), em polímeros termossensíveis (WARD; GEORGIU, 2011); ou pela degradabilidade da cápsula, o que faz desmontar a estrutura de encapsulação (PALMIERO; MOROSI; BELLO; PONZO *et al.*, 2018).

Quanto à molécula bioativa a ser encapsulada, sua escolha depende do tipo de alvo a ser tratado. Dexametasona (DEXA), por exemplo, um fármaco vastamente utilizado para o tratamento de tumores do tipo mieloma (CHIM; KUMAR; ORLOWSKI; COOK *et al.*, 2018), pode ser encapsulado para este fim. Este tipo de câncer tem se mostrado bastante sensível à hipertermia magnética (MIKI; SHINGEN; ASUKA; HIROFUMI *et al.*, 2018; SHA; GOLDBERG, 2020), portanto essa pode ser uma combinação de interesse para o desenvolvimento de novas terapias. Além disso, a propriedade anti-inflamatória da DEXA pode auxiliar no tratamento de traumas cerebrais, em que sua liberação controlada tem impacto positivo na regeneração tecidual (JEONG; BAE; MACKS; WHITAKER *et al.*, 2021), e inclusive já foi utilizada na redução de efeitos colaterais associados a inflamação local após tratamento de câncer por hipertermia magnética (GRAUER; JABER; HESS; WECKESSER *et al.*, 2019). Ainda há outras aplicações dessa combinação, como o tratamento da aterosclerose, para o qual recentemente DEXA foi encapsulada com partículas de magnetita, que neste caso atua como plataforma de entrega às artérias de interesse (MATUSZAK; LUTZ; SEKITA; ZALOGA *et al.*, 2018).

Outras funcionalidades podem ser inseridas nas nanopartículas através de moléculas ou outro sistema nanoparticulado ancorados à superfície ou encapsulados na camada biocompatível. Com o intuito de rastrear nanopartículas para estudos *in vivo*, por exemplo, se pode inserir materiais fluorescentes, como nanopartículas de pontos quânticos ou pequenas moléculas. A incorporação do corante rodamina B é uma estratégia comum para esse propósito (COVA; BIGINI; DIANA; SITIA *et al.*, 2013), e alguns trabalhos nos quais ela é combinada com magnetita podem ser encontrados na literatura (SOUZA; BECK; VARANDA, 2013). Além disso, este corante pode atuar como um modelo de fármaco para estudar a encapsulação e liberação de moléculas por nanopartículas, visto que é geralmente mais barata e é facilmente quantificada por espectrofotômetros de UV-Vis.

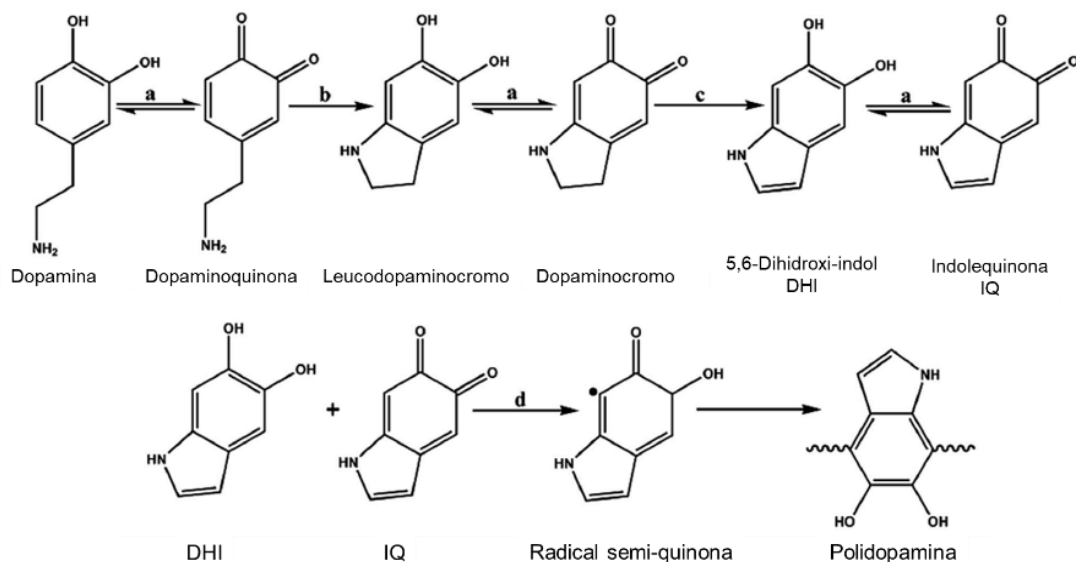
Para realizar o revestimento polimérico, a ligação dos polímeros à nanopartícula inorgânica pode se dar por simples adsorção, interações eletrostáticas, hidrofóbicas, ou através de ligantes com ligação específica aos átomos da superfície. Portanto, a primeira camada de moléculas a se ligar diretamente à superfície da magnetita deve ser biocompatível, aumentar a estabilidade coloidal em meios aquosos, além de disponibilizar grupos funcionais sujeitos a ligações subsequentes com outros blocos de construção. A literatura indica uma ampla variedade de compostos ou moléculas para essa finalidade. A dopamina é uma

molécula reconhecidamente biocompatível que pode desempenhar tais funções (BIJU, 2014; LING; HYEON, 2013).

Polidopamina

Inspirados pela composição de proteínas adesivas de mexilhões, ricas em 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-dopa) e aminoácidos lisina, Lee *et al.* (LEE; DELLATORE; MILLER; MESSERSMITH, 2007) utilizaram a dopamina para o desenvolvimento de filmes capazes de aderirem sobre diversas superfícies. A dopamina polimeriza formando polidopamina, que se arranja formando um revestimento sobre superfície das partículas (LEE; DELLATORE; MILLER; MESSERSMITH, 2007), de forma que seus grupos funcionais catecol e amina ficam expostos na parte externa da nanopartícula, permitindo ligações subseqüentes (LIN; CONG; CAO; KE *et al.*, 2014). O processo de polimerização é realizado pela simples exposição de objetos com uma solução de dopamina em pH 8,5, situação na qual a molécula passa por oxidação, ciclização, rearranjo e dismutação, formando, por fim, polidopamina, segundo mecanismo proposto por Wang descrito na Figura 29.

Figura 29 – Mecanismo proposto para a polimerização de dopamina (a- oxidação, b- ciclização, c- rearranjo, d- dismutação).



Fonte: Adaptado de Wang *et al.* (WANG; HU; GAO; ZHAO *et al.*, 2015).

Diversos sistemas compostos de polidopamina têm sido usados também como carreadores de fármacos, com mecanismos de carregamento e liberação dependentes de pH. Os fármacos podem ser acondicionados no interior de nanocápsulas “ocas” (CHENG; ZHANG; XU; HU *et al.*, 2013), na superfície de partículas “maciças” (ZHU; SU, 2017) ou ainda na parte

externa de sistemas casca-caroço (LIU; GUO; ODUSOTE; QU *et al.*, 2013; ZHU; SU, 2017), como pode ser aplicado com nanopartículas de magnetita. A carga de superfície da polidopamina dependerá fortemente do pH, ao influenciar a protonação de seus grupos amino e catecol, possibilitando a incorporação de fármacos catiônicos e aniônicos, de acordo com o meio (LIU; YU; YE; ZHOU, 2011). Além dessas interações eletrostáticas, mecanismos de coordenação e interações π - π também podem reger a incorporação de moléculas (ZHU; SU, 2017).

A literatura da área ainda reporta outras vantagens deste polímero para sua aplicação em nanopartículas, como o fato de que partículas encapsuladas com polidopamina apresentaram maior capacidade de internalização em células (XIONG; PENG; CHEN; LI, 2015), podendo potencializar o efeito citotóxico ao tecido alvo. Visando aplicação em hipertermia, a polidopamina pode ainda auxiliar ao ser uma fonte adicional de calor através de fototerapia. O polímero apresenta grande absorção na região do vermelho próximo (NIR), na qual a absorção dos tecidos biológicos é mínima, o que permite a aplicação da radiação até órgãos mais internos (LI; JIN; CHO; JEON *et al.*, 2017).

Além da sua forma polimerizada, as moléculas de dopamina podem ser utilizadas de forma alternativa, compondo um monômero de um polímero compartimentado (WANG; JI; NA; SAFI *et al.*, 2014). Assim, seu grupo catecol realiza a função de ligação específica à superfície da magnetita, mas o material é composto por outros monômeros, que podem ceder características diferenciadas, como biodegradabilidade, hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, dependendo do interesse.

Policaprolactona

Visando aplicações biomédicas, possíveis toxicidades e acúmulos no organismo são grandes preocupações. A combinação com poliésteres biodegradáveis pode aumentar a biocompatibilidade do material final, facilitando sua eliminação após o objetivo terapêutico ter sido alcançado (FERRARI; SPONCHIONI; MORBIDELLI; MOSCATELLI, 2018). Polímeros formados por ϵ -caprolactona (CL) são uma opção para este fim, visto que sua ligação éster é degradada em meio fisiológico (GATTI; AGOSTINI; FERRARI; MOSCATELLI, 2017). Para a obtenção de blocos de monômeros de CL, pode ser realizada polimerização por abertura de anel (*ring opening polymerization*, ROP) de CL com hidróxi-etil metacrilato (HEMA) como iniciador de ROP, procedimento que permite um alto controle de síntese (PALMIERO; SPONCHIONI; MANFREDINI; MARALDI *et al.*, 2018).

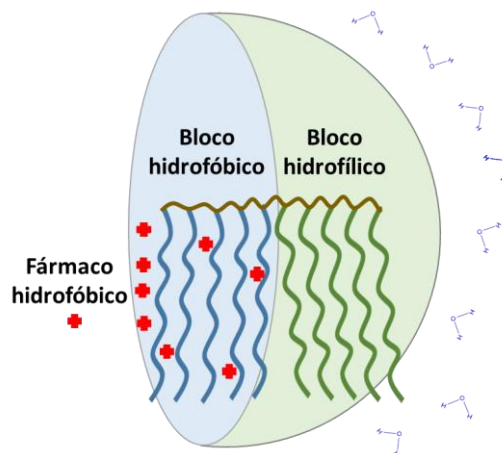
Polímeros para estabilidade coloidal

Quanto ao bloco responsável pela estabilidade coloidal da partícula final, diversos polímeros hidrofílicos podem ser aplicados, com maior proeminência na literatura científica para os baseados em polietilenoglicol (PEG); no entanto, recentemente tem sido reportado que materiais com PEG podem apresentar eliminação acelerada da corrente sanguínea após administração, devido à ação de anticorpos específicos anti-PEG formados pelo seu uso repetitivo (MIMA; HASHIMOTO; SHIMIZU; KIWADA *et al.*, 2015). Mas outra estratégia de bastante sucesso é o uso de polímeros zwitteriônicos, como o PMPC, poli-(2-metacrilóiloxietil fosforilcolina), por apresentar uma altíssima capacidade de hidratação sobre a superfície, o que o faz evitar a adsorção de proteínas (propriedade *antifouling*) e aumentar o tempo de circulação *in vivo*, além de se mostrar biocompatível (ZHANG; LIU; REN; ZHANG *et al.*, 2019). Trabalhos já mostraram como o MPC pode estabilizar nanopartículas de magnetita tanto na forma de homopolímero (LUONGO; CAMPAGNOLO; PEREZ; KOSEL *et al.*, 2017), pela sua adsorção direta à superfície, quanto como bloco de um copolímero (YUAN; ARMES; TAKABAYASHI; PRASSIDES *et al.*, 2006), como a porção voltada para o meio aquoso externo.

Polimerização RAFT

A síntese de tais estruturas poliméricas complexas exige um processo com alto controle de peso molecular e ordenamento dos monômeros. A rota de Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação (do inglês, *reversible addition-fragmentation chain transfer*, ou RAFT) cumpre tais requisitos. Sendo um tipo de polimerização radicalar com desativação reversível (do inglês, *reversible deactivation radical polymerization*, ou RDRP), a RAFT pode ser sempre reiniciada através do radical livre presente na extremidade da cadeia, o que a faz ser chamada de polimerização radicalar viva (PERRIER, 2017). É essa propriedade que permite que sejam formados copolímeros de blocos de monômeros através de etapas subsequentes (KEDDIE, 2014). Dessa forma, podem ser formados copolímeros anfifílicos do tipo “escova” (*brushlike*), com um bloco de cadeias hidrofóbicas e outro de hidrofílicas, que formam nanopartículas em meio aquoso, com as primeiras voltadas para dentro e as segundas para o meio externo (PALMIERO; MARALDI; MANFREDINI; MOSCATELLI, 2018). Tal sistema pode ser utilizado para a encapsulação de fármacos hidrofóbicos, como mostra a Figura 30, ou ainda para encapsular nanopartículas inorgânicas, desde que devidamente planejado para se ligar a elas.

Figura 30 - Esquema de nanopartícula polimérica formada por copolímeros de blocos hidrofílico e hidrofóbico, com fármaco encapsulado.



Fonte: autoria própria.

Portanto, as plataformas magnéticas multifuncionais podem ser desenvolvidas ao associar os blocos de construção citados, de formas variadas, visando interesses específicos. Tais estruturas apresentam finalidades de extrema relevância para a sociedade, em especial o tratamento e diagnóstico de câncer. Os nanocompósitos podem ser capazes de tratar o câncer por hipertermia magnética, aliada a quimioterapia advinda de fármacos encapsulados, com direcionamento do efeito ao tumor de acordo com modificações de superfície, provendo um tratamento eficiente que minimiza os efeitos colaterais. Para este intento, faz-se necessário desenvolver revestimentos para as nanopartículas magnéticas e elaborar processos para a incorporação dos blocos de construção da plataforma multifuncional.

2. Objetivos

O objetivo principal desta parte do trabalho de doutorado foi o desenvolvimento de um material capaz de atuar em aplicações biomédicas, em especial o tratamento de câncer, através da síntese de copolímeros e seu uso para encapsulação de nanopartículas de magnetita e outras moléculas. Para tanto, os objetivos específicos foram:

- Sintetizar polímeros baseados em dopamina que sejam capazes de ligar à superfície de nanopartículas de magnetita, de encapsular fármacos em sua estrutura e de promover estabilidade coloidal e biocompatibilidade do material;

- Realizar o recobrimento das nanopartículas de magnetita empregando os polímeros funcionais sintetizados;
- Realizar o recobrimento de nanopartículas de magnetita concomitantemente com moléculas de interesse para aplicação biomédica, e avaliar o perfil de liberação das moléculas ao longo do tempo;
- Estudar os efeitos do processo de encapsulação sobre as propriedades das nanopartículas de magnetita, através de caracterizações físico-químicas e testes de hipertermia magnética.

3. Materiais e métodos

3.1 Materiais

Para o revestimento de polidopamina, cloridrato de dopamina e tris(hidroximetil)aminometano da Sigma-Aldrich, etanol etílico desnaturalizado 40B da Baker. Rodamina B ($\geq 95\%$) da Sigma-Aldrich.

Para a síntese dos copolímeros, foram utilizados hidroxietil metacrilato (HEMA, 97%), octoato de estanho ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$), ϵ -Caprolactona (CL, 97%), sodium sulphate (Na_2SO_4), anidrido succínico (99%), N-Hidroxisuccinimida (NHS), N,N'-Diciclohexilcarbodiimida (DCC, 99%), cloridrato dopamina, trietilamina, da Sigma-Aldrich. Para as reações RAFT, 2-metacrililoiloxietil fosforilcolina (MPC, 97%), CPA (*4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)-pentanoic acid*) (97%), ACVA (*4,4'-azobis(cyanovaleric acid)*, 98%), também Sigma-Aldrich. Fármaco dexametasona (>99%) da TCI Europe. Para caracterização por RMN, metanol-*d*4 (MeOD) e clorofórmio-*d* (CDCl_3) da Sigma-Aldrich.

3.2 Recobrimento de polidopamina

Este procedimento foi realizado com o objetivo de formar um filme de polidopamina como recobrimento das partículas. A dopamina se polimeriza em pH 8,5 (LEE; DELLATORE; MILLER; MESSERSMITH, 2007) e possui grupos catecol que têm forte adesão à superfície da magnetita (WANG; JI; NA; SAFI *et al.*, 2014).

Inicialmente foi preparada a solução tampão Tris (tris(hidroximetil) aminometano), na qual ocorre a reação. Então, um pequeno volume de suspensão de magnetita foi adicionado ao tampão TRIS e a suspensão resultante colocada em banho de ultrassom por 10 min. Sob agitação magnética, uma solução de dopamina foi adicionada, e o pH ajustado para 8,5 com soluções de NaOH e HCl. Nas amostras de MD11 em diante, neste ponto foi adicionado etanol. Então a reação seguiu por diferentes períodos e, por fim, as partículas foram lavadas magneticamente.

Foram testadas diferentes concentrações de magnetita e dopamina, para alterar a espessura da camada polimérica; agitações magnética, mecânica e por ultrassom, para estudar o efeito da possível agregação das nanopartículas durante a reação; diferentes

tempos de reação, para verificar a extensão da polimerização com o tempo; e adição de etanol ao meio para frear a velocidade de polimerização. Também foi realizada uma reação sem a presença de magnetita, para comparação de caracterização. As condições de cada processo estão descritas na Tabela 9.

Tabela 9 – Condições para o recobrimento das partículas de magnetita com polidopamina. Abreviações: V_F: volume final; Etn.: Etanol; Magn.: magnética; Mec.: mecânica. Ultr.: ultrassom.

Amostra	Amostr a mag.	[mag.] (g/L)	[dopa] (g/L)	[mag]/ [dopa]	V _F (mL)	Meio de reação	Agitação	Tempo
MD1	M10	1	1	1	40	TRIS 10 mM	Magn.	6 h
MD2	M10	0,5	0,5	1	40	TRIS 10 mM	Mec.	6 h
MD3	M11	0,5	0,5	1	40	TRIS 10 mM	Mec.	6 h
MD4	M11	4	4	1	5	TRIS 10 mM	Magn.	6 h
MD5	M10	0,5	0,5	1	40	TRIS 10 mM	Mec.	6 h
MD6	M10 pó	0,9	1,8	0,5	15	TRIS 10 mM	Ultr.	4 h
MD7	M13	1	2	0,5	15	TRIS 10 mM	Ultr.	4 h
MD8	M15	0,5	0,5	1	40	TRIS 10 mM	Magn.	6 h
MD9	M15	0,5	0,1	5	40	TRIS 10 mM	Mec.	6 h
MD10	M15	0,375	0,125	3	40	TRIS 10 mM	Mec.	6 h
MD11	M15	0,375	0,125	3	20	1 TRIS 20 mM: 1 etn.	Ultr.	6 h
MD12	M15	0,25	0,125	2	40	1 TRIS 20 mM: 1 etn.	Ultr.	4 h
MD13	M15	0,25	0,125	2	20	1 TRIS 20 mM: 1 etn.	Ultr.	6 h
MD14	M15	0,375	0,125	3	20	1 TRIS 20 mM: 1 etn.	Ultr.	2, 4 e 6 h
Polidopa- mina	-	-	0,125	-	40	1 TRIS 20 mM: 1 etn.	Ultr.	4 h
MDRh1	M15	0,3	0,15	2	12	1 TRIS 20 mM: 1 etn.	Ultr.	6 h

Como primeiro teste para encapsular moléculas bioativas na estrutura, a amostra MDRh1 foi sintetizada com rodamina B presente no meio de reação. Primeiro, a suspensão de 10 mL de magnetita e a solução de rodamina foram dispersas em solução tampão TRIS em banho de ultrassom por 10 min, então 2 mL de dopamina foi adicionado sob agitação magnética, o pH foi ajustado para 8,5 e a reação seguiu por 6 horas. Então, o pH foi reduzido para 8,0 e a agitação continuou por 18 h. Por fim, o excesso de rodamina e dopamina foi eliminado em lavagens com água por 2 centrifugações a 9300 rpm em *ependorfs* de 2 mL.

Para avaliar a liberação de rodamina, as amostras foram inseridas em membranas de diálise amarradas de ambos os lados, que por sua vez foram imersos em água deionizada com diferentes valores de pH. Foram realizadas medidas de absorvância da solução externa em espectrofotômetro UV-Visível, de acordo com o tempo, e a liberação de rodamina foi acompanhada pelo aumento da banda em 552 nm.

3.3 Síntese de copolímeros

A síntese dos copolímeros baseados em caprolactona e MPC foi realizada através de diversas etapas, descritas nos itens abaixo. As etapas de síntese dos polímeros, de encapsulação das nanopartículas de magnetita e de caracterização de parte dos materiais obtidos (itens 0 e 3.5 descritos em seguida) foram realizadas no Departamento de Química, Materiais e Engenharia Química Giulio Natta, da universidade Politecnico di Milano, na Itália.

3.3.1 Polimerização por abertura de anel (ROP)

Reação de polimerização por abertura de anel (*ring opening polymerization*, ROP) de ϵ -caprolactona (CL), para obtenção de um macromonômero hidrofóbico biodegradável. Foram realizadas 3 reações, com diferentes graus de polimerização (DP_n , do inglês *degree of polymerization*), 3, 5 e 7. O DP_n se refere ao número de unidades de caprolactona de cada macromonômero.

Para preparar as soluções, foram pesadas as massas de hidroxietil metacrilato (HEMA) e $Sn(Oct)_2$ em um frasco e ϵ -Caprolactona (CL) com Na_2SO_4 em um balão de 100 mL de uma boca, como indica a Tabela 10. O Na_2SO_4 tem função de capturar a água da solução, que poderia diminuir o rendimento da reação; o $Sn(Oct)_2$ funciona como um catalisador. O balão com CL e Na_2SO_4 foi colocado em banho de óleo a 125°C, então a solução de HEMA e $Sn(Oct)_2$ foi adicionada. A reação se estendeu por 4 horas, a 125°C.

Tabela 10 – Reagentes utilizados nas reações de ROP e nas reações seguintes com anidrido succínico.

Amostra	DP_n	ϵ -CL		HEMA	$Sn(Oct)_2$	Na_2SO_4	Anidrido succínico
		(g)	(mmol)	(mmol)	(mmol)	(mg)	(mmol)
CL3SA	3	10	87,6	29,2	0,146	10	32,1
CL5SA	5	10	87,6	17,5	0,088	10	19,3
CL7SA	7	10	87,6	12,5	0,062	10	13,8

Ao fim da reação, o frasco foi resfriado à temperatura ambiente. Os nomes são: CL3, CL5 e CL7, ou CL_n, genericamente, na qual n é o valor de DP_n. Em seguida, foi realizada reação com anidrido succínico a todas as CL_nMA, ao simplesmente adicionar o pó deste reagente aos balões, nas quantidades indicadas na Tabela 10 e deixar agitar em banho de óleo a 90°C *overnight* (17 horas). Os produtos foram chamados de CL_nSA.

Para as lavagens dos produtos, foram solubilizados em diclorometano (DCM). Em um funil de separação, a solução em DCM foi misturada com solução de HCl 0,1 molL⁻¹, na proporção 1:1, 50 mL de cada um. Após ser agitada, a mistura se separou de forma que o DCM com polímero ficou embaixo (mais denso) e a solução de ácido com subprodutos da reação ficou em cima (menos denso). A solução de DCM foi eluída e guardada; a solução de ácido foi descartada. A operação foi repetida outras duas vezes. Por fim, o solvente DCM foi extraído com o uso de rotoevaporador.

3.3.2 Funcionalização com dopamina

Na etapa seguinte, os macromônmeros CL_nSA foram funcionalizados com N-Hidroxisuccinimida (NHS), para depois pudessem ser funcionalizados com a dopamina, nas quantidades da Tabela 11. O macromônmero foi misturado ao NHS em 20 mL de DCM. A solução foi colocada em balão de 50 mL, inserido em banho de gelo para a mistura inicial dos reagentes. N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) também foi solubilizado em DCM e adicionado ao balão, gota-a-gota. A reação seguiu por 18 h a temperatura ambiente. Os produtos, chamados de CL_n-NHS, foram filtrados e lavados novamente com DCM e solução de HCl 0,1 molL⁻¹.

Tabela 11 – Reagentes utilizados nas reações de ligação dos macromônmeros com NHS.

Amostra	CL _n SA		NHS	DCC	DCM
	(g)	(mmol)	(mmol)	(mmol)	(mL)
CL3NHS	3	5,2	6,8	6,8	39,0
CL5NHS	3	3,7	4,9	4,9	34,3
CL7NHS	3	2,9	3,8	3,8	31,7

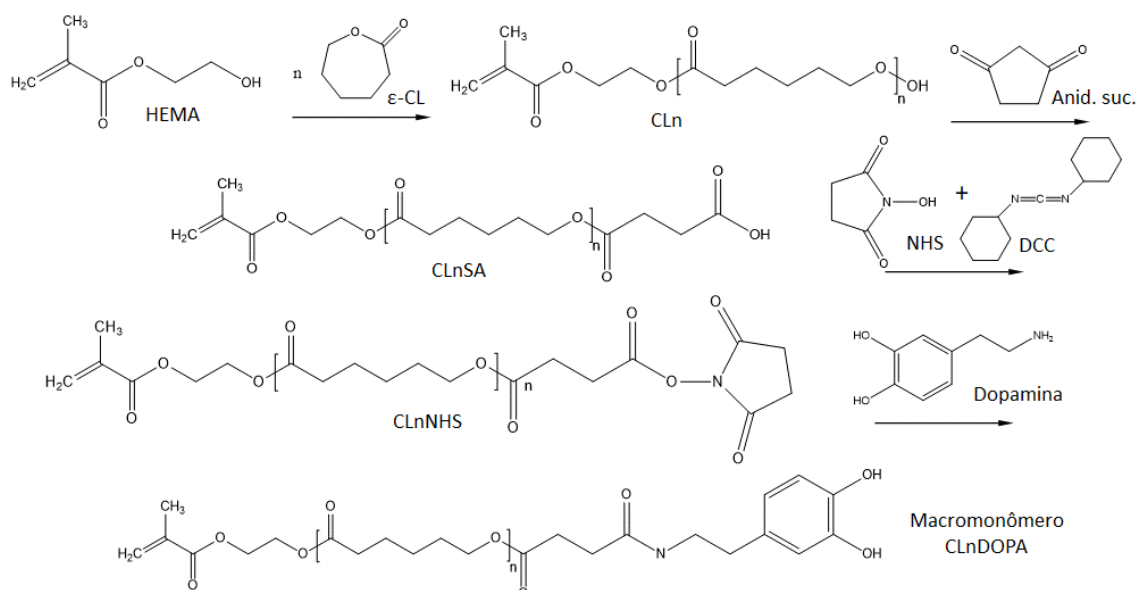
Para a modificação das cadeias do macromônmero com dopamina, foram utilizados os reagentes da Tabela 12. Em um balão de 100 mL (1 boca), foi adicionado o macromônmero

CLnNHS com DCM. Em um frasco, foi pesada dopamina, que foi solubilizada em metanol, e foi adicionado trietilamina (TEA) – a solução solubilizou após 5 min. O balão foi imerso em banho de gelo, e então o conteúdo do frasco de dopamina foi adicionado gota-a-gota. A reação seguiu por 48 h a temperatura ambiente e, por fim, os produtos foram filtrados e lavados com solução de HCl 0,1 molL⁻¹. As etapas do processo de obtenção dos macromônômeros finais, nomeados CLnDopa, estão apresentadas na Figura 31.

Tabela 12 – Reagentes utilizados nas reações de ligação do macromônômero com dopamina.

Amostra	CLn-NHS		Dopamina	Trietilamina	Metanol	DCM
	(g)	(mmol)	Massa (g)	Massa (g)	Volume (mL)	Volume (mL)
CL3Dopa	3	4,5	4,5	5,9	3,3	33,4
CL5Dopa	3	3,3	3,3	4,4	3,1	30,6
CL7Dopa	3	2,6	2,6	3,5	2,9	29,0

Figura 31 - Reações químicas realizadas para a obtenção do macromônômero CLnDopa.

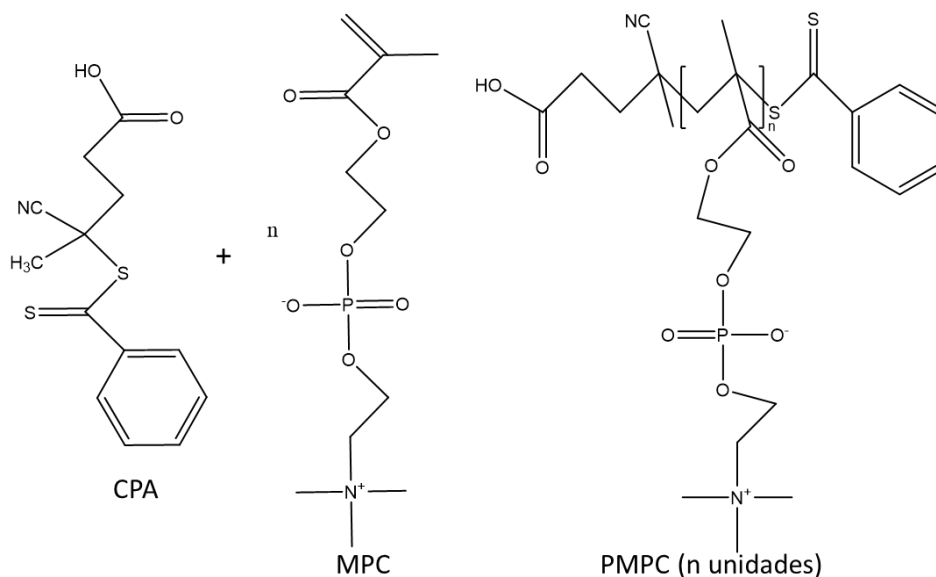


3.3.3 Polímero hidrofílico (MPC)

Em paralelo, foi preparada a porção hidrofílica do polímero, através de uma Transferência Reversível de Cadeia por Adição-Fragmentação (*reversible addition-fragmentation chain transfer*, RAFT) do monômero MPC, com grau de polimerização alvo $n=25$, como mostra a Figura 32. Os reagentes utilizados foram: monômero MPC (2-

methacrililoxietyl fosforilcolina), 2,236 g ou 7,5 mmol; agente RAFT CPA (4-cyano-4-(phenylcarbonothioylthio)-pentanoic acid), 0,3 mmol; iniciador ACVA (4,4'-azobis(cyanovaleric acid)), 0,1 mmol. Todos foram solubilizados em 10 mL de solução, sendo 5 mL de etanol e 5 mL de solução tampão de ácido acético a pH 5,4. A solução foi degasada com N₂ por 20 minutos e a reação foi realizada a 65°C por 24 horas.

Figura 32 – Representação da reação química da síntese de polímero MPC com n monômeros.



O produto foi lavado três vezes com volume excedente de acetona, através de centrifugação a 5000 rpm, por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e o produto precipitado foi seco em estufa a vácuo a 40°C. A amostra foi chamada de PMPC.

3.3.4 RAFT para formação do polímero final

Finalmente, o polímero final foi produzido por RAFT do bloco hidrofílico com o hidrofóbico. Todas as reações foram realizadas em metanol, em concentração de 10% massa/volume, nas condições da Tabela 13. As reações foram realizadas para CL3Dopa, CL5Dopa e CL7Dopa, com MPC em diferentes graus de polimerização (DP_m) entre os blocos:

$$DP_m = \frac{[CLnDopa]}{[PMPC]} \quad (\text{equação 12})$$

Tabela 13 – Materiais utilizados nas reações RAFT de CLnDopa e PMPC.

Amostra	DP _m	CLnDopa		PMPC	ACVA
		(g)	(mol)	(mol)	(mol)
Pn10	10	0,05	6,72E-05	6,72E-06	2,24E-06
Pn20	20	0,05	6,72E-05	3,36E-06	1,12E-06
Pn30	30	0,05	6,72E-05	2,24E-06	7,46E-07
Pn40	40	0,05	6,72E-05	1,68E-06	5,60E-07

3.4 Nanoprecipitação dos polímeros

Para a formação de revestimento polimérico sobre as nanopartículas de magnetita, assim como para a produção de partículas estritamente poliméricas, foi realizado processo chamado de nanoprecipitação. Os copolímeros produzidos via RAFT foram solubilizados em metanol (concentração de 10% massa/volume) e injetados através uma seringa com agulha em um volume de água 9 vezes maior (concentração final de 1% massa/volume), em geral com a mesma quantidade em massa de magnetita (1:1) em suspensão, ou somente com água pura. A dispersão resultante foi aspirada e expulsa por 3 vezes, visando induzir turbulência para o sistema se auto-organizar. As amostras de magnetita com polímeros foram chamadas de MP_nm, em que *n* é o número do DP_n e *m* é o número do DP_m do copolímero. Para a encapsulação de dexametasona, o fármaco (5% da massa de polímero) foi solubilizado em metanol juntamente com o polímero P730 e o protocolo foi realizado da mesma maneira.

3.5 Caracterizações físico-químicas

As análises de FTIR, TGA, DLS, VSM e hipertermia foram realizadas da mesma maneira que para as amostras de magnetita, como descrito no item 3.3 do Capítulo 1 desta tese. Análises de MET foram feitas em alguns casos em equipamento CM 200 FEG (Philips), operando a 200 kV.

As análises de Espectrofotometria no UV-Vis para verificar a liberação de rodamina foram realizadas em espectrofotômetro Lambda 35 da PerkinElmer, no intervalo de 200 nm a 800 nm. Em todos os espectros, os sinais de transmitância em 100% e 0% foram ajustados, e o branco de água foi utilizado para maior precisão dos valores de absorvância.

Para caracterização das estruturas orgânicas sintetizadas, foi realizada ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H em equipamento Bruker AV 400 (400 MHz). As amostras

foram diluídas em d-metanol, d-clorofórmio ou água deuterada, na concentração de 15 mg/mL.

Foi realizada cromatografia de permeação em gel (CPG), visando o estudo do peso molecular dos macromônômeros, em equipamento Jasco Series Apparatus. As amostras foram diluídas em solvente THF a 4 mg/mL e filtradas em membrana PTFE 0,45 µm. A separação foi feita a um fluxo de 0,5 mL/min.

Para o estudo da encapsulação e liberação do fármaco dexametasona, foi realizada cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em equipamento Agilent 1100 com detector de espectrômetro de massa Agilent 6140 quadrupolo LC/MS. Após a realização do protocolo de encapsulação, uma alíquota de 1,0 mL da suspensão foi retirada para verificar a eficiência de encapsulação ($EE\% = [\text{fármaco encapsulado}] / [\text{total de fármaco utilizado}]$). A alíquota foi lavada em tubo vivaspin500 10 kDa MWCO, através de centrifugação a 8000 rpm por 15 min, adição de 15 mL de água e centrifugação por mais 15 min. Para a liberação do fármaco, a suspensão restante foi adicionada a um tubo de diálise, que foi mergulhado em um béquer com 500 mL de água, sob agitação magnética. Então, de hora em hora, foram retiradas alíquotas de 200 mg de suspensão de partículas em duplicata, para verificar a quantidade de fármaco ainda encapsulada. Todas as amostras, incluindo a retirada do tubo vivaspin, foram congeladas após a retirada e liofilizadas. Às amostras secas, foi adicionado acetonitrila, a suspensão foi centrifugada, o sobrenadante foi retirado, e foi adicionado mais 1,0 mL de acetonitrila. As partículas foram separadas com filtro de seringa e as soluções resultantes foram analisadas no HPLC. Para relacionar com a concentração do fármaco, foi realizada curva de calibração da dexametasona em acetonitrila.

4. Resultados e discussão

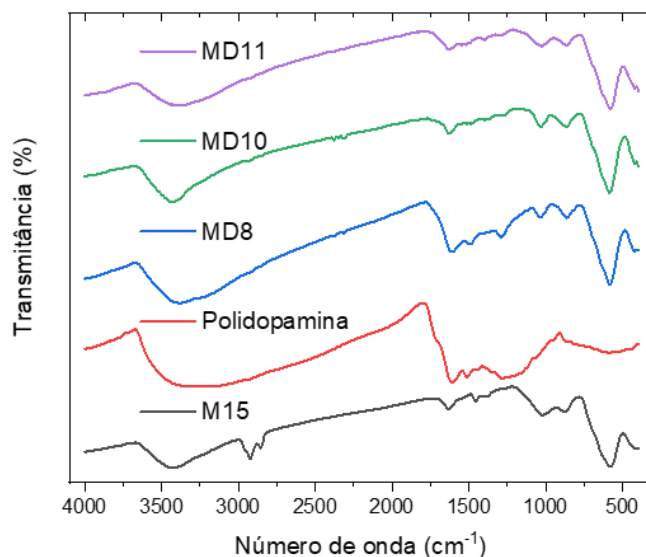
Através de duas diferentes abordagens, foram sintetizados compósitos do tipo casca-carço (*core-shell*) de nanopartículas de magnetita recobertas com polímeros baseados em dopamina. Primeiro serão descritos os resultados da formação de polidopamina sobre a magnetita, no item 4.3, depois serão descritas as sínteses de copolímeros para posterior recobrimento via nanoprecipitação, no item 4.4.

4.3 Polidopamina e encapsulação de magnetita

4.3.1 Caracterização físico-química

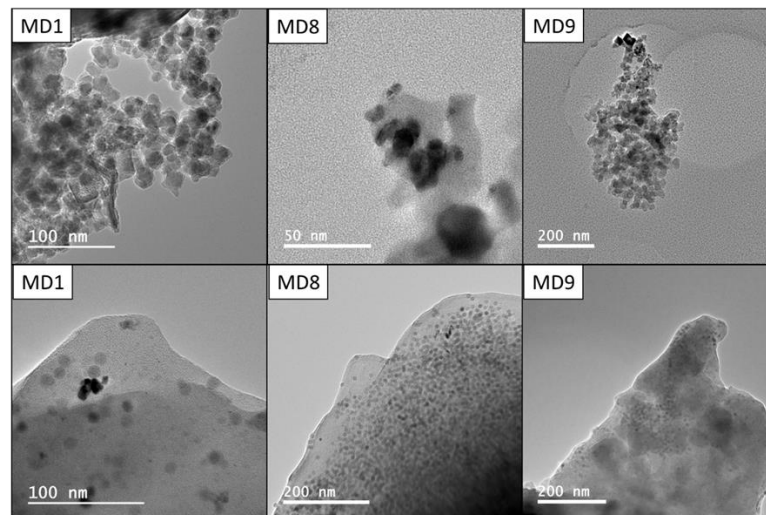
As amostras de nanopartículas de magnetita com polidopamina tiveram sua composição química verificada pelas análises de FTIR. Todos os espectros confirmam a presença de magnetita e polidopamina, como mostra a Figura 33, com três exemplos de amostras. O óxido de ferro é indicado pela forte banda de estiramento Fe-O em 580 cm^{-1} . As bandas de dopamina estão presentes principalmente em 1287 cm^{-1} e 1610 cm^{-1} , verificadas tanto na amostra apenas com polidopamina quanto nas de magnetita recobertas. Nota-se também uma diferença de intensidade das bandas de polidopamina entre as amostras; em MD8 a razão magnetita/polidopamina utilizada na reação de polimerização foi de 1:1, enquanto em MD10 foi 3:1 e em MD9, 5:1. Apesar do FTIR não ser uma maneira eficiente de quantificar os materiais, os resultados indicam que há maior proporção de polidopamina em MD8 que nas outras duas amostras.

Figura 33 - FTIR de amostras de magnetita com polidopamina, em comparação com a amostra de magnetita e com a amostra apenas de polidopamina.



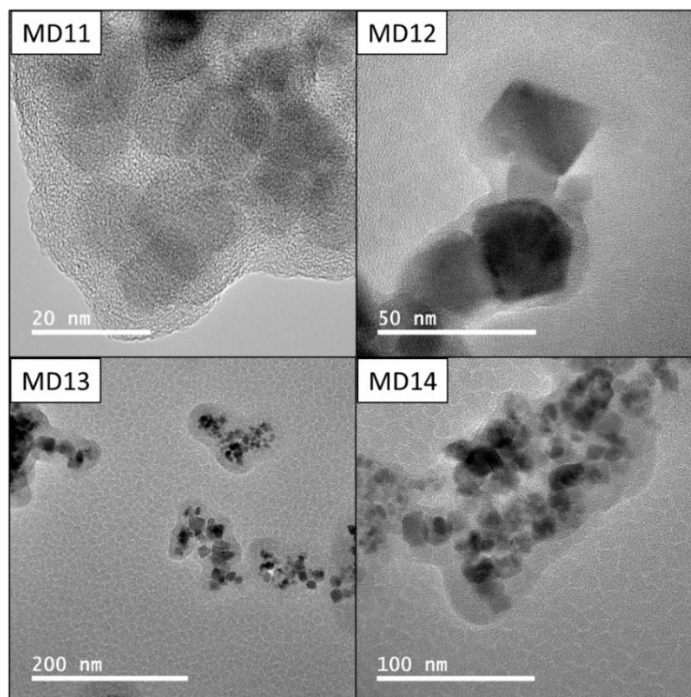
Através das análises de MET, podemos verificar como se dá a organização do sistema de polidopamina e magnetita. Nos experimentos iniciais foram verificadas camadas finas de polímero sobre nanopartículas de magnetita, como desejado, mas concomitantes com grandes agregados de polímero com magnetita, como mostra a imagem de MD1 na Figura 34. Como alternativas, foram testados agitação mecânica em detrimento da magnética e concentrações menores de monômero e partículas, no entanto o problema persistiu, como vemos nas imagens de MD8. Também foi testado aumentar drasticamente a proporção de magnetita/dopamina de 1 para 5, ao diminuir a concentração de dopamina, em MD9; os agregados diminuíram, mas continuaram presentes, com o novo problema de que algumas partículas ficaram sem recobrimento. As causas poderiam estar na formação de cadeias de polímero muito longas ou na agregação entre as cadeias de polidopamina, que ocorre por ligações cruzadas, interações π - π e ligações de hidrogênio (SEDO; SAIZ-POSEU; BUSQUE; RUIZ-MOLINA, 2013).

Figura 34 - Imagens de MET das amostras MD1, MD8 e MD9.



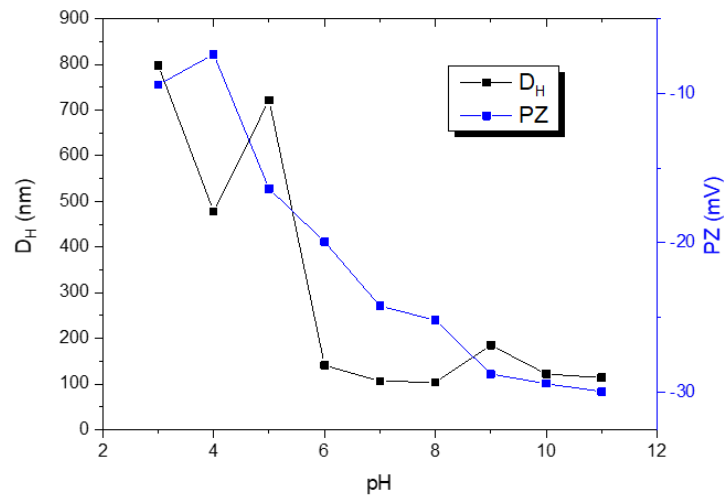
Então foi testada a adição de etanol ao meio de reação, em proporção 1:1 com a solução de tampão TRIS de pH 8,5, a partir de MD10. A mudança, cujo propósito foi diminuir a velocidade de polimerização da dopamina (YUE; WANG; SUN; WANG *et al.*, 2013), se mostrou eficiente ao diminuir bastante as grandes matrizes poliméricas vistas anteriormente. No entanto, foi a partir de MD11, quando foi testada a agitação por banho de ultrassom, que os grandes agregados foram realmente eliminados e foi possível verificar maior controle do recobrimento. Nessas amostras são visíveis as finas camadas de recobrimento polimérico sobre as partículas, como mostrado nas imagens de MET da Figura 35.

Figura 35 – Imagens de MET de MD11, MD12, MD13 e MD14.



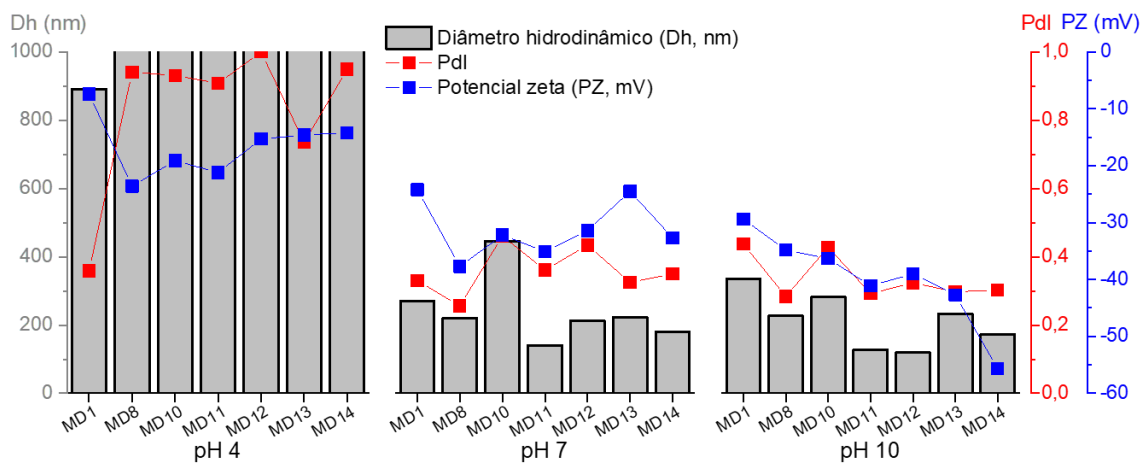
Resultados dos testes de estabilidade coloidal da amostra MD1 estão descritos na Figura 36. De forma semelhante aos resultados obtidos previamente ao recobrimento, as partículas apresentam potencial de superfície negativo mesmo em pH ácido. O potencial se torna mais negativo conforme o pH aumenta, com acompanhamento da diminuição dos diâmetros hidrodinâmicos médios. Os valores de pK_a da dopamina são de aproximadamente 9,0 (primeira hidroxila), 10,5 (amina) e 12,0 (segunda hidroxila), sendo similares para a polidopamina (BARCLAY; HEGAB; CLARKE; GINIC-MARKOVIC, 2017). Portanto, em $pH < 9$, a variação de potencial está relacionada à concentração de H^+ e OH^- da solução, que altera a composição da camada difusa ao redor da partícula. Em $pH > 9$, ocorre a desprotonação da primeira hidroxila e em $pH > 10,5$, a da amina, reduzindo ainda mais o potencial zeta.

Figura 36 – Diâmetro hidrodinâmico (D_H , da distribuição por número) e potencial zeta (PZ) da amostra MD1 em diferentes valores de pH.



A tendência de MD1 é vista nas demais amostras, com resultados na Figura 37. É interessante que, mesmo as partículas que na análise de MET aparentavam ser compostas por agregados da ordem de micrômetros, quando em soluções de pH neutro ou básico apresentaram tamanhos hidrodinâmicos em torno de 200 a 400 nm, sugerindo que os agregados de tamanhos maiores observados na microscopia podem estar relacionados à floculação de pequenos agregados devido à remoção do solvente. Em relação às amostras sintetizadas com etanol, em geral os tamanhos foram menores do que as demais nos mesmos valores de pH, como verificado por MET.

Figura 37 - Resultados de DLS das amostras com polidopamina de diâmetro hidrodinâmico (D_H) por intensidade, potencial zeta (PZ) e índice de polidispersividade (Pdl).



4.3.2 Incorporação e liberação de moléculas

Foram realizados testes iniciais para avaliar a possibilidade de carregamento e liberação de moléculas bioativas. Nestes primeiros testes, a molécula de rodamina B foi inserida ao sistema e a liberação foi avaliada pela análise das curvas de absorção no espectro UV-Visível da solução externa ao tubo de diálise no qual às partículas foram acondicionadas, como mostra a Figura 38.

Houve liberação sustentada da rodamina B, sendo que a absorbância praticamente se estabilizou a partir da medida de 90 h. Após a medida de 140 h, o béquer com o saco de diálise foi submetido a banho de ultrassom por 10 minutos para acelerar a liberação e foi realizada última medida, com resultado de aumento da banda, mostrando que ainda havia rodamina a ser liberada. As Figura 38c e d mostram os resultados para liberação em pH 5,5, o qual foi similar às demais condições. Os experimentos foram realizados em diferentes valores de pH e os perfis de liberação foram avaliados de acordo com o crescimento do valor de absorbância em 552 nm, como mostra a Figura 39. As liberações de rodamina B de acordo com o tempo foram similares, com a liberação em pH 7 se destacando como a mais rápida.

Figura 38 – Fotos das amostras em tubos de diálise imersos em água com diferentes valores de pH. No começo (a) e depois de 140 h (b). Espectro de absorbância da liberação de rodamina de acordo com o tempo em pH 5,5 (c) e detalhe do pico em 552 nm (d).

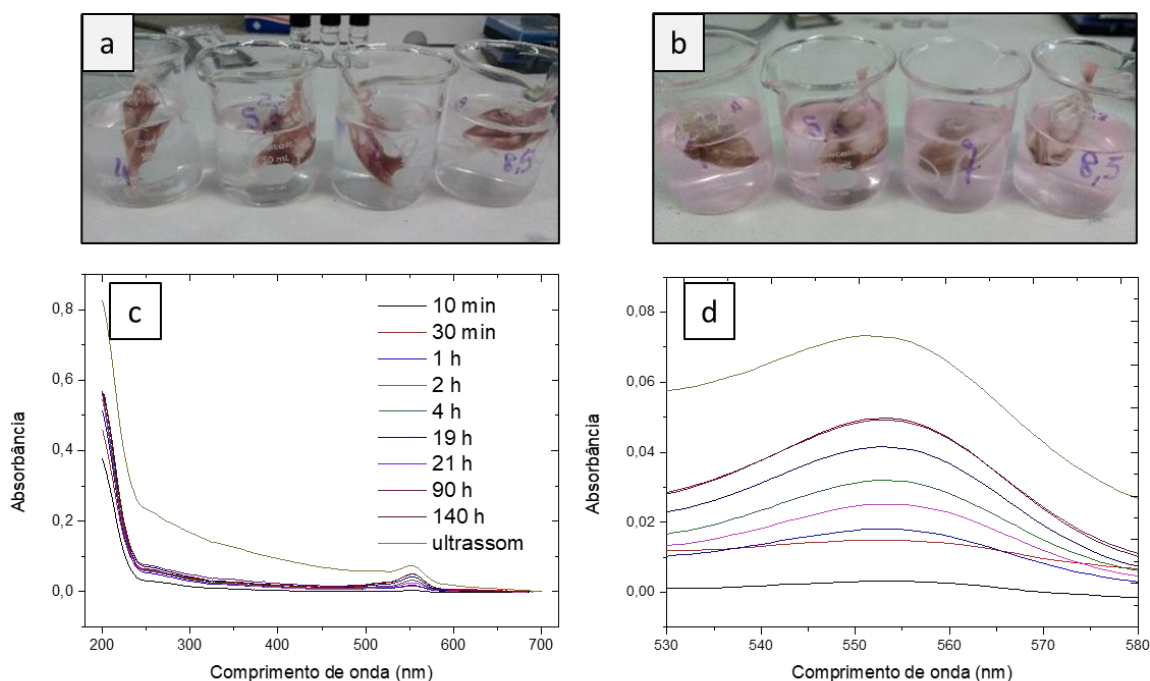
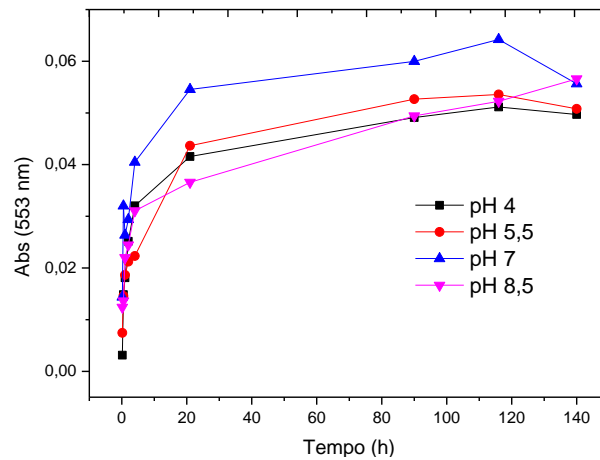


Figura 39 – Resultados do aumento da Abs em 553 nm, referente à absorção da rodamina, através da sua liberação ao longo do tempo, em diferentes valores de pH.



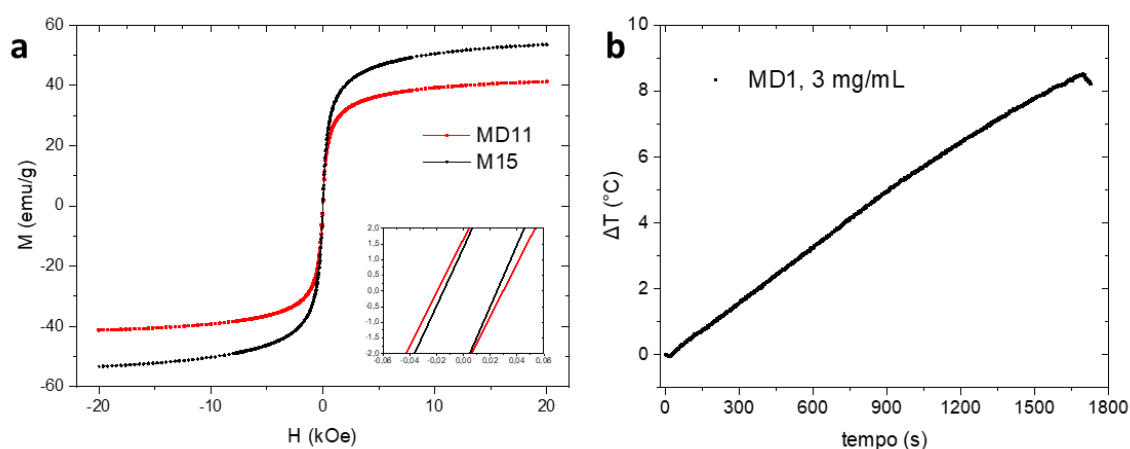
4.3.3 Comportamento magnético e hipertermia

Após o recobrimento, as amostras de compósito seguem apresentando comportamento superparamagnético, como mostram as medidas da Figura 40a. Devido ao polímero não contribuir para a magnetização, a saturação naturalmente é menor nas amostras com polidopamina. A diminuição deverá ser proporcional à massa de polímero ligada à magnetita. A partir da introdução do etanol ao meio de reação, a proporção de polímero na amostra diminui, possibilitando valores de magnetização maiores. A Tabela 14 apresenta os valores de magnetização de saturação das amostras analisadas.

Tabela 14 - Magnetização de saturação (M_s) de amostras de magnetita encapsuladas com polidopamina, com a porcentagem das medidas do compósito em relação à da magnetita pura.

Amostra	Amostra mag.	M_s (emu/g)	% M_s (comp./mag.)
MD1	M10	25,6	50,6%
MD5	M10	13,9	27,5%
MD8	M15	33,1	61,9%
MD11	M15	41,1	76,8%

Figura 40 - Magnetização de MD11 em comparação com M15 (a) e resultado de hipertermia de MD1 a 3 mg/mL (b).



Na Figura 40b é apresentado o comportamento térmico na medida de hipertermia para a amostra MD1, a 3 mg/mL, que apresentou valor de SAR de $8,3 \text{ W g}^{-1}$. Pela escassez de massa de amostra disponível, não foi possível realizar as medidas das demais amostras em uma concentração que permitisse aquecimentos relevantes para o cálculo do SAR. Apesar do recobrimento polimérico não contribuir para a magnetização, ainda foi obtido um aquecimento relevante, o que viabilizaria a aplicação dessas partículas no tratamento de hipertermia. É de se esperar que quanto maior é a proporção em massa de polímero na amostra, maior será a diminuição do valor de SAR em relação à amostra de magnetita original; portanto, a massa de polímero deve ser sempre minimizada para maximizar o SAR, mas mantendo a estabilidade coloidal da partícula e, quando conveniente, possibilitar a encapsulação de moléculas.

4.4 Copolímeros e encapsulação de magnetita

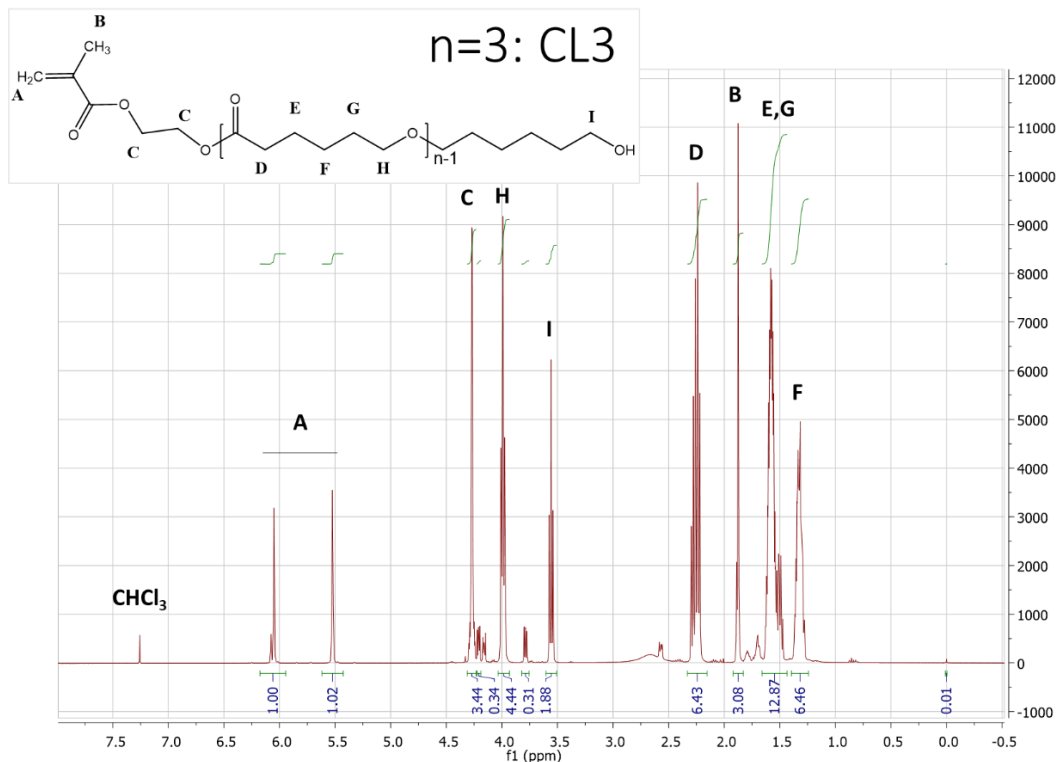
Nesta frente de trabalho, inicialmente foram sintetizados os macromônômeros baseados em caprolactona e polímeros de MPC, com acompanhamento das diferentes etapas da síntese através de caracterização por RMN. Em seguida, foi realizado processo de encapsulação das nanopartículas de magnetita, cujo produto foi caracterizado por diferentes técnicas físico-químicas. Os resultados serão apresentados e discutidos abaixo.

4.4.1 Síntese de copolímeros

A obtenção do macromônômero, composto por cadeias de HEMA ligado a unidades de caprolactona (CL) e dopamina, se deu por diversas etapas. Inicialmente, foi realizada a

polimerização por abertura de anel (ROP) de ϵ -caprolactona com 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) como co-catalisador, desenvolvida a partir de trabalho de Ferrari *et al.* (FERRARI; YU; MORBIDELLI; HUTCHINSON *et al.*, 2011). As reações foram planejadas para diferentes graus de polimerização (DP): 3, 5 e 7 unidades (n), de acordo com a proporção molar de [HEMA]:[CL] aplicada. Ao fim da reação, as amostras foram caracterizadas por ^1H RMN, para determinar sua estrutura e os rendimentos das reações. O resultado de CL3 está registrado na Figura 41.

Figura 41 - Estrutura química e resultado de análise de RMN ^1H da amostra CL3 (n=3).



A partir dos resultados, puderam ser determinados os valores de grau de polimerização real (DP_{real}), relativo à média de n unidades de CL presentes em cada macromonômero. Espera-se que haja apenas um carbono nomeado "I" (C_I) na Figura 41, ao final da cadeia, ligado à hidroxila e a dois átomos de hidrogênio, enquanto há n-1 carbonos nomeados "H" (C_H), dentro da porção que se repete no macromonômero, cada um ligado a outros dois átomos de hidrogênio. Portanto, o DP_{real} (ou n_{real}) é dado pela razão entre a intensidade dada pelos 2 hidrogênios ligados ao carbono C_I (H_I) e a intensidade dada pelos 2 hidrogênios ligados ao carbono C_H (H_H), mais uma unidade:

$$DP_{real}(CL3) = \frac{H_H}{H_I} + 1 = \frac{4,44}{1,88} + 1 = 3,3 \quad (\text{equação 13})$$

Também pode ser calculado o rendimento da reação de duas maneiras, de acordo com as frações dos picos de HEMA e de CL nos macromônmeros e os residuais, que não reagiram, respectivamente χ_{HEMA} e χ_{CL} :

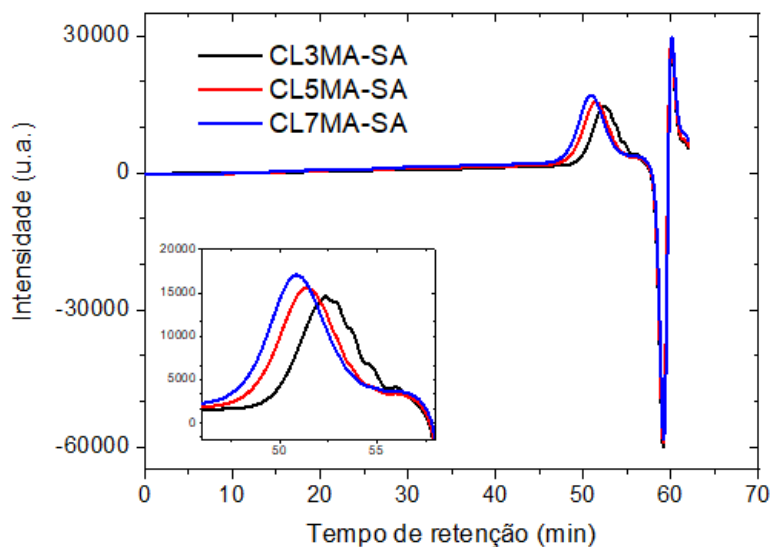
$$\chi_{HEMA} = \left(1 - \frac{0,34}{3,44+0,34}\right) \times 100 = 91,0\% \quad (\text{equação 14})$$

$$\chi_{CL} = \left(1 - \frac{0,31}{4,44+0,31}\right) \times 100 = 93,5\% \quad (\text{equação 15})$$

Resultando em um rendimento calculado de 92,3%, pela média dos dois cálculos. Da mesma forma, foram realizadas reações com DP de 5 e 7, cujos produtos foram caracterizados por RMN, com resultados apresentados no Anexo 1. Os resultados de DP_{real} foram de 5,1 e 5,9 e os rendimentos foram de 95,8% e 96,3%, para DP 5 e 7, respectivamente. Apesar do tamanho da cadeia real para o DP=7 ter sido menor que o esperado, este macromônmero continuou a ser nomeado de CL7.

Em seguida, foram realizadas reações de CLn com anidrido succínico para produzir o macromônmero funcionalizado com ácido carboxílico, CLnSA. Ainda para estudo do tamanho de cadeia dos macromônmeros, os produtos CLnSA foram analisados por cromatografia de permeação em gel (GPC), com resultados na Figura 42. O resultado mostra a tendência de aumento de tamanho de cadeia esperado, como mostra a Figura 42, sendo eluído primeiro o menor macromônmero, de DP=3, seguido do de DP=5 e, por fim, com a eluição do de DP=7. Os dois últimos apresentam tamanho mais próximo que o planejado inicialmente, mas ainda são claramente diferenciáveis.

Figura 42 – Resultados de GPC dos macromônmeros CLnSA.

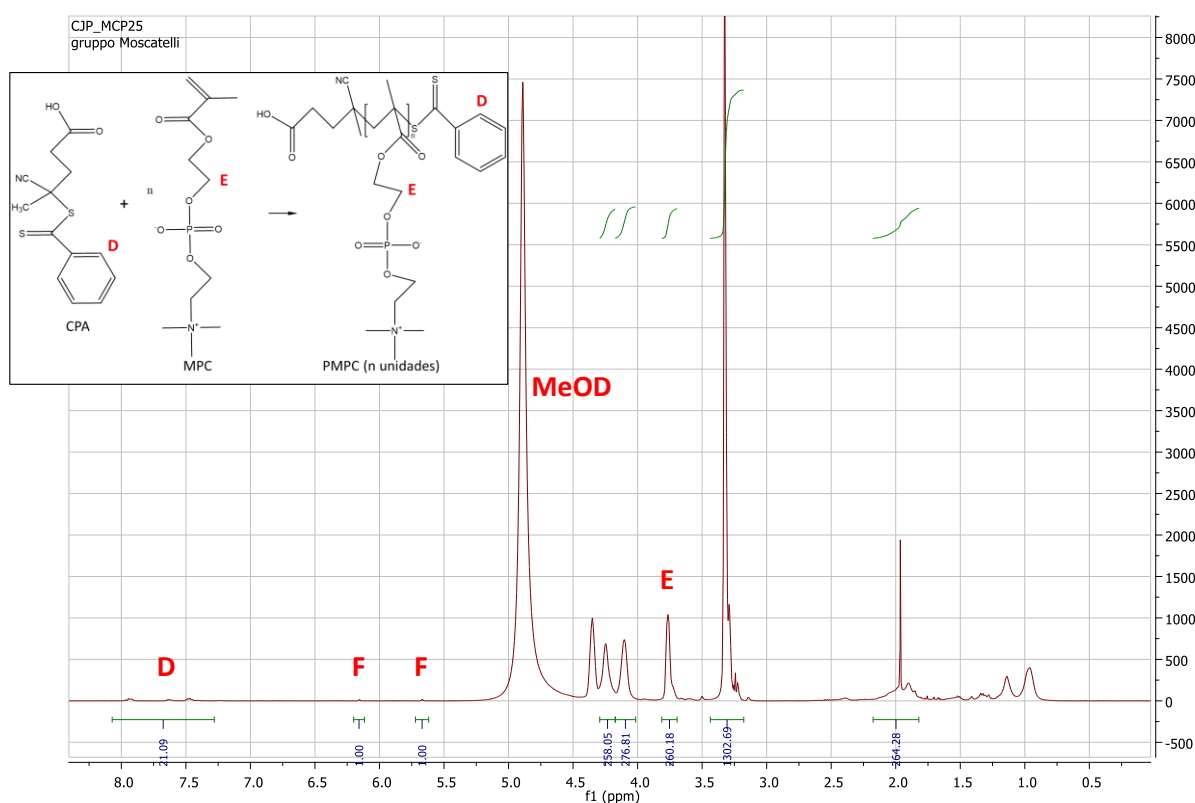


Após a reação com o anidrido succínico, os produtos foram purificados para a realização das reações com NHS, produzindo CLnNHS e, por fim, com dopamina, para a obtenção dos macromônmeros hidrofóbicos biodegradáveis CLnDOPA. Entre cada etapa, os três produtos obtidos foram caracterizados por RMN. Os resultados também estão apresentados no Anexo 1 e estiveram de acordo com os graus de polimerização desejados, sendo que os rendimentos de cada reação foram todos acima de 90%.

Em paralelo, foi sintetizado o polímero PMPC, hidrofílico devido ao caráter zwitteriônico do monômero MPC. O resultado de RMN (Figura 43) foi utilizado para o cálculo do DP, através da razão entre as intensidades do pico relativo aos hidrogênios do carbono identificado como E do MPC (H_E) e dos picos relativos aos hidrogênios do anel do CPA (H_D), que indicou que o polímero apresentou 31 unidades de monômero, um pouco acima do DP alvo de 25:

$$DP_{real}(PMPC) = \frac{H_E/2}{H_D/5} = \frac{260/2}{21/5} = 31 \quad (\text{equação 16})$$

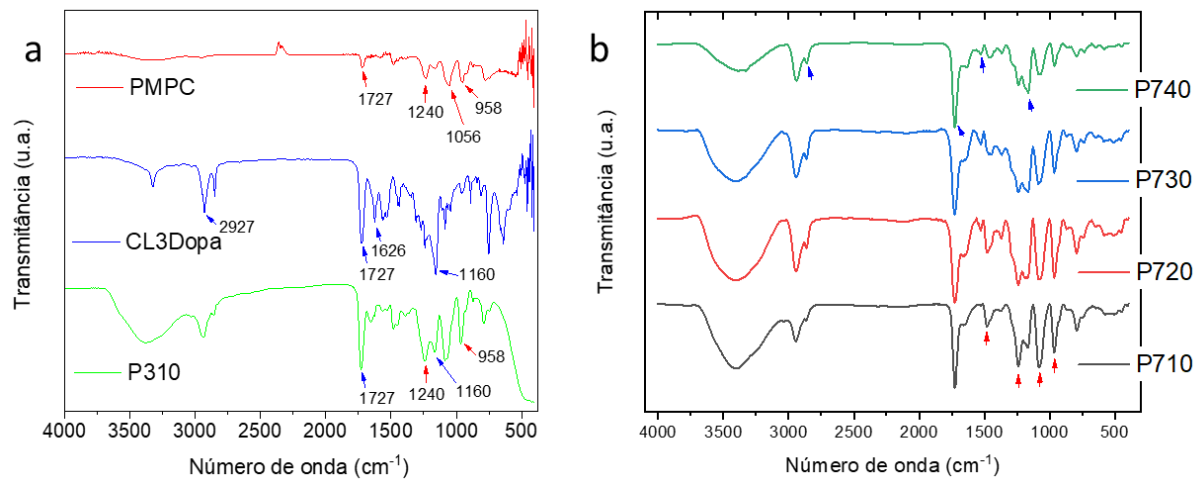
Figura 43 - Resultado de RMN do polímero PMPC e detalhe das estruturas químicas com as identificações dos carbonos.



Após a obtenção dos macromônômeros CLnDOPA e do polímero PMPC, foi possível realizar a síntese dos copolímeros com diferentes proporções desses blocos de construção, visando balancear a hidrofobicidade do primeiro, que confere a capacidade de encapsular fármacos hidrofóbicos, e de hidrofiliabilidade do segundo, que promove a estabilidade coloidal do sistema. Além disso, mais unidades de CLnDOPA também poderiam aumentar a eficiência de ligação à superfície da nanopartícula ao prover os grupos catecol da dopamina. Considerando este balanço, através de reações RAFT foi preparada uma biblioteca de copolímeros usando os três macromônômeros CLnDOPA com grau de polimerização DP_m em relação aos polímeros PMPC iguais a 10, 20, 30 e 40, somando um total de 12 copolímeros para serem testados para encapsulação.

Para confirmar as composições químicas dos polímeros, suas soluções foram secas e submetidas a análise por FTIR, como mostra a Figura 44a. O espectro de PMPC apresenta as bandas em 1240 cm^{-1} e 1056 cm^{-1} relacionadas às ligações P=O e P-O, respectivamente, do fosfato; em 958 cm^{-1} , há uma banda correspondente à ligação N-C da amina quaternária; e o grupo éster é localizado pelas bandas em 1700 cm^{-1} da ligação C=O e em 1160 cm^{-1} da ligação C-O. No macromônômero de ϵ -caprolactona com dopamina (CL3Dopa), também ocorrem as duas bandas do éster da CL; em 2927 cm^{-1} ocorre a banda respectiva à ligação C-H; em 1626 cm^{-1} há uma banda referente ao estiramento de ligação C=C proveniente do anel aromático da dopamina (ZHU; LU; WANG; ZHANG *et al.*, 2012). No espectro do copolímero P310, as bandas se combinam de acordo com a proporção dos monômeros, sendo que as bandas de PMPC estão indicadas por setas vermelhas, e as de CL3Dopa, por azuis. Na Figura 44b, os espectros dos copolímeros de CL7Dopa com MPC (tipo P7m) foram normalizados de acordo com a banda de éster em 1700 cm^{-1} , em vista de comparar a intensidade das demais bandas. Conforme a razão $[CL7Dopa]/[MPC]$ aumenta, as bandas fosfato e amina do MPC diminuem de intensidade, de forma oposta às bandas de CL.

Figura 44 – Resultados de FTIR dos polímeros sintetizados. As setas vermelhas indicam as bandas referentes ao MPC e as azuis, as referentes ao CL3Dopa.



4.4.2 Nanoprecipitação

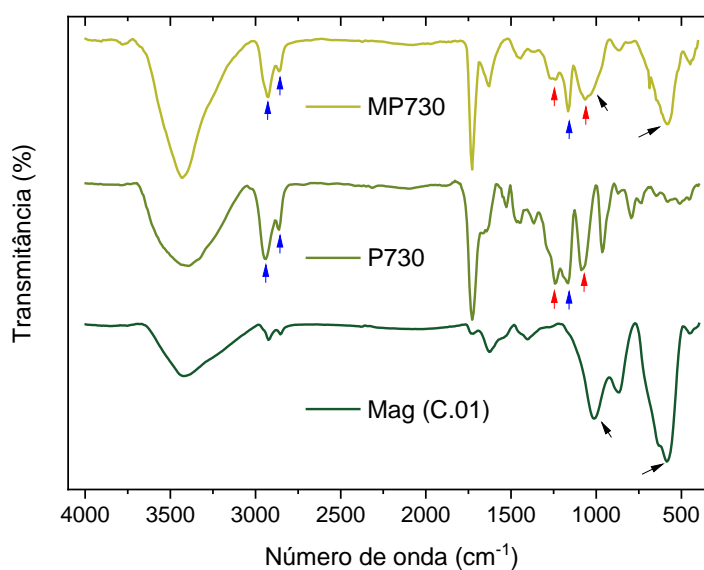
O protocolo de nanoprecipitação de polímeros anfifílicos solúveis em solvente orgânico através da injeção desta solução em água, de forma a causar turbulência por seguidas aspirações e novas injeções, é bastante eficiente para a formação rápida de nanopartículas poliméricas através da sua auto-organização (PALMIERO; MOROSI; BELLO; PONZO *et al.*, 2018). Em polímeros organizados com uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica, a primeira aponta para o meio aquoso externo e a segunda, para o interior, em estruturas muito usadas para encapsular moléculas hidrofóbicas. Neste caso, o macromonômero hidrofóbico tem uma cabeça hidrofílica correspondente à dopamina com seu grupo catecol, planejada para se ligar à superfície da magnetita, o que torna o sistema um pouco mais complexo.

No experimento sem magnetita, momento da injeção da solução de polímero límpida em metanol à água, imediatamente a solução se torna turva (esbranquiçada), indicando a precipitação de nanopartículas poliméricas. No experimento de encapsulação da magnetita, a suspensão escura não apresenta mudança de aspecto, sendo que se espera que o polímero se organize predominantemente sobre às partículas, e não de forma isolada.

Foram realizadas caracterizações físico-químicas para estudar diferentes aspectos das suspensões de nanopartículas. Análise de FTIR foi realizada para verificar a composição química final do material após secagem, como mostra a Figura 45, referente à amostra MP730,

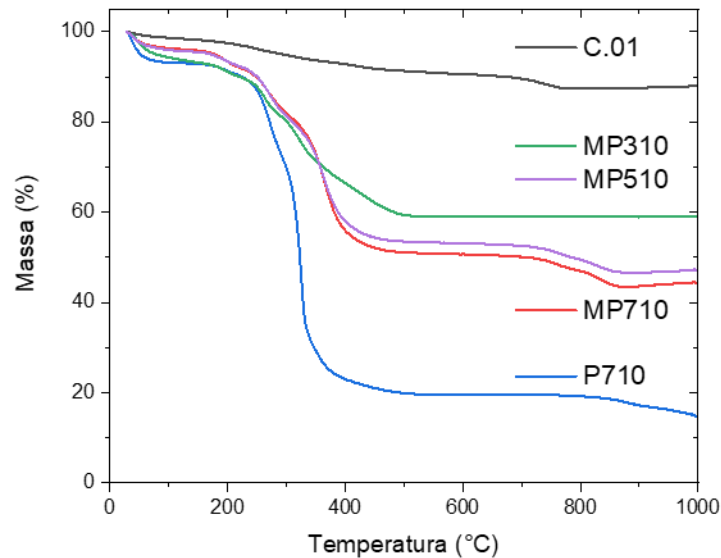
partícula encapsulada com polímero P730. A amostra MP730 apresenta espectro composto pela combinação da amostra de magnetita (Mag, C.01, descrita no Capítulo 1), com as bandas da ligação Fe-O em 580 cm^{-1} e resíduos de sulfato em 870 cm^{-1} e 1015 cm^{-1} (ambas indicadas por setas pretas), e do polímero P730, com as bandas de CL mais proeminentes (setas azuis) e as de MPC menos evidentes (setas vermelhas).

Figura 45 - FTIR das amostras de magnetita (Mag, C.01), polímero (P730) e partícula revestida (MP730). Setas vermelhas indicam bandas de MPC; azuis, de CL7Dopa; e pretas, de magnetita.



Na análise termogravimétrica (Figura 46) também da amostra seca, quando exposta até $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ em atmosfera de nitrogênio, a magnetita não é degradada, apenas perde hidratação de superfície e possíveis sais residuais. Os polímeros, por outro lado, perdem a maior parte da sua massa. A perda é maior conforme a proporção de CL aumenta, uma vez que esta porção é degradada através da sua ligação éster, enquanto o MPC não é completamente degradado. Os graus de polimerização dos copolímeros (DP_m) foram mantidos constantes para esta análise independentemente do comprimento da cadeia de CL (DP_n) para as amostras da análise, para evidenciar a diferença de proporção CL:MPC entre os polímeros.

Figura 46 - Resultado de análise TG das amostras C.01, MP310, MP510, MP710 e P710.



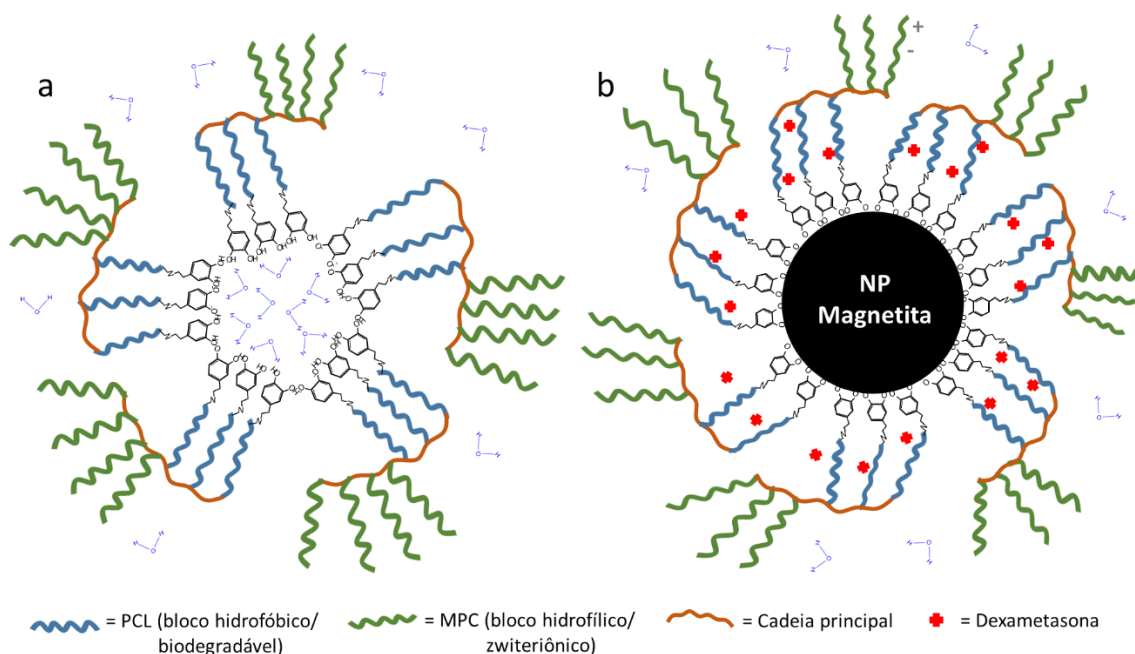
Para analisar o comportamento dos polímeros em solução, inicialmente foi realizada análise de DLS das amostras em água sem magnetita, e os resultados mostrados na Tabela 15 confirmam a formação de partículas poliméricas. Os tamanhos por intensidade variam entre 100 e 400 nm e índices de polidispersividade (PDI) de 0,18 até 0,53, possivelmente pela formação de alguns agregados que espalham mais luz. Para $DP_n=3$, quando se verifica a distribuição por número, considerando a média das partículas de maior predominância em suspensão, pode ser extraída uma tendência de acordo com os tamanhos de cadeia. P320, P330 e P340 formam partículas pequenas de tamanhos bem próximos, na faixa de 18 nm, enquanto P310 e P510 são maiores, com 130,7 nm e 112,8 nm, respectivamente. Quando dispersas em meio aquoso, moléculas anfifílicas se organizam ao esconder as regiões hidrofóbicas e expor as hidrofílicas ao meio aquoso externo, formando estruturas que dependem do balanço hidrofílico-lipofílico (BHL), peso molecular total, concentração, grupos funcionais e outros. Para $DP_n=7$, ocorre um aumento de tamanho de partícula de acordo com o DP_m na distribuição por número (e por intensidade para $DP_m \geq 20$), provavelmente porque, em uma estrutura de maior dominância hidrofóbica, a cabeça polar da dopamina passa a ter menor efeito e o tamanho aumenta de acordo com comprimento das cadeias maiores de CL.

Tabela 15 – Resultados de DLS das amostras de nanopartículas poliméricas.

Amostra	Diâmetro hidr. (Z-average) (nm)	PdI	Medida por número (nm)
Pol-310	201,6	0,183	130,7
Pol-320	107,3	0,354	18,3
Pol-330	291,7	0,396	17,3
Pol-340	145,9	0,354	19,9
Pol-510	241,0	0,250	112,8
Pol-710	395,0	0,530	19,5
Pol-720	76,4	0,322	32,6
Pol-730	123,3	0,319	42,9
Pol-740	148,2	0,240	68,5

Portanto, de forma geral, a nanopartícula polimérica deve ter uma estrutura semelhante ao esquema da Figura 47a. Os monômeros do bloco de CL formam uma estrutura interna com a cabeça de dopamina apontada para o interior que engloba moléculas de água, enquanto o bloco de MPC aponta para fora, interagindo com o meio aquoso externo. No entanto, um copolímero de menor porção hidrofóbica de CL pode não conseguir estabilizar tal estrutura, pois o movimento browniano irá competir com as forças hidrofóbicas que a mantém, principalmente.

Figura 47 – Esquemas das estruturas das nanopartículas somente poliméricas (a) e de magnetita revestida com polímeros (b).



Fonte: autoria própria.

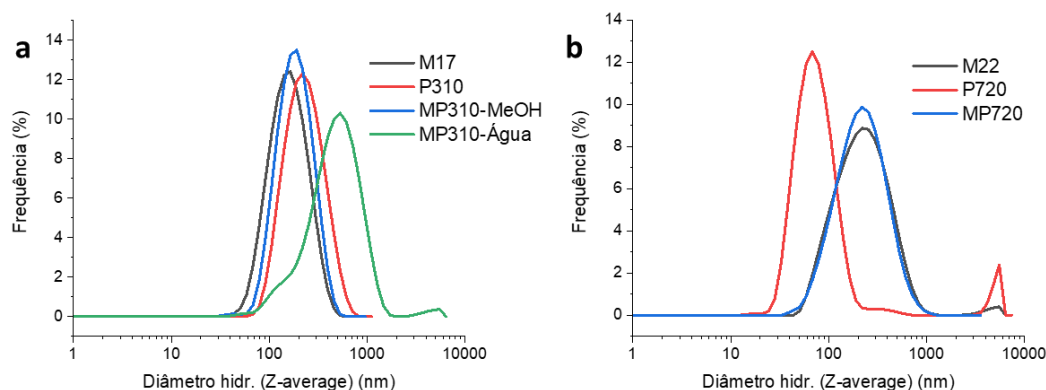
Quando os polímeros são dispersos em um meio na presença das nanopartículas de magnetita, espera-se que sua orientação seja similar à descrita acima, mas com a magnetita como núcleo, como mostra a Figura 47b. O efeito inicial sobre a organização dos polímeros pode ser pelo escape das cadeias hidrofóbicas do meio aquoso para a superfície, seguido pela ligação específica do catecol da dopamina ao óxido de ferro. Em relação à magnetita, sabe-se que as nanopartículas estão dispersas na forma de pequenos agregados (*clusters*), o que é determinante para o tamanho de partícula final após a encapsulação, conforme os dados mostrados na Tabela 16. Para estes experimentos, foi utilizada a amostra de magnetita M22, cujo tamanho por intensidade é de 191,8; os tamanhos da partícula não variam de forma substancial após a encapsulação com os diferentes polímeros, realizando o protocolo típico, com os polímeros solubilizados em MeOH adicionados à suspensão de magnetita em água.

Tabela 16 – Resultados de DLS das partículas de magnetita revestidas com polímeros.

Amostra	Diâmetro hydr. (Z-average) (nm)	Pdl	Medida por número (nm)
M22	191,8	0,252	80,0
MP310	202,4	0,264	102,3
MP320	177,6	0,218	80,8
MP330	180,2	0,213	102,0
MP340	175,6	0,210	81,9
MP510	169,0	0,191	96,4
MP710	187,4	0,208	87,9
MP720	188,3	0,241	70,5
MP730	192,1	0,259	103,8
MP740	179,5	0,230	92,3

Tal procedimento foi avaliado em comparação com um protocolo alternativo, com precipitação inicial dos polímeros de MeOH para água e mistura posterior com a suspensão de magnetita. Na Figura 48a estão comparados os resultados de DLS da nanopartícula polimérica P310; da partícula MP310-MeOH, encapsulada através do protocolo típico de MeOH; da partícula encapsulada MP-310-Água, através de do protocolo alternativo; além da magnetita utilizada M17. Nota-se que M17, P310 e MP310-MeOH têm distribuições de tamanho hidrodinâmico (*Z-average*) bem similares, enquanto MP310-Água apresentou tamanho maior. Devido a essa agregação das partículas causada com este protocolo, o protocolo em MeOH foi definido para os demais experimentos.

Figura 48 - Resultados de DLS de amostras de magnetita encapsuladas, MP310 sintetizada por dois métodos (a) e MP720 (b), comparados às nanopartículas de magnetita e de polímeros.



Outro desafio do protocolo é evitar que sejam formadas somente partículas poliméricas isoladas das nanopartículas de magnetita, não realizando seu recobrimento. Na Figura 48b, os resultados da amostra MP720 é bem similar ao da partícula utilizada M22, mas difere da partícula polimérica P720, indicando que o polímero deve estar organizado sobre as nanopartículas de magnetita, que por sua vez estão organizadas em pequenos *clusters*. A capacidade dos polímeros em desagregar a magnetita é limitada, mas o revestimento orgânico confere maior estabilidade contra floculação.

Também foram testadas diferentes proporções de concentração de [magnetita]/[polímero], com resultados de DLS na Tabela 17. Não houve alteração substancial dos resultados por intensidade. Na medida por número, em proporção de 75% de polímero (MP720-75), o tamanho caiu para 45,3 nm, possivelmente devido à formação de partículas poliméricas menores isoladas, uma vez que a precipitação de P720 em água formou partículas de 32,6 nm (número). Dessa forma, o protocolo foi mantido na proporção 1:1.

Tabela 17 – Resultados de DLS das partículas de magnetita com polímeros em diferentes proporções.

Amostra	Diâmetro hidr. (Z-average) (nm)	Pdl	Medida por número (nm)
MP310-25	175,2	0,213	89,2
MP310-40	184,0	0,223	54,7
MP310-50	202,4	0,264	102,3
MP310-60	184,4	0,237	113,5
MP310-75	186,1	0,274	105
MP720-25	181,1	0,228	66,1
MP720-50	188,3	0,241	70,5
MP720-75	180,9	0,340	45,3

As imagens de MET ajudam a confirmar a encapsulação das nanopartículas de magnetita pela camada polimérica. Na Figura 49, com uso do copolímero P310 com a magnetita M17, podem ser notadas camadas finas de polímero, em contraste claro, sobre as partículas de magnetita, de contraste mais escuro. Com o material seco, as camadas de polímero se contraem; em suspensão, principalmente as cadeias de MPC interagem com a água, formando uma camada polimérica de maior espessura que atua por repulsão eletrostática e estérica para estabilizar as partículas. Também, durante a secagem sobre o suporte para a MET ocorre agregação das partículas como se nota na imagem, portanto a análise sobre a estabilidade coloidal e estado de agregação deve ser realizado pelos resultados de DLS.

Figura 49 – Imagens de MET de amostra M17 recoberta com P310, MP310.

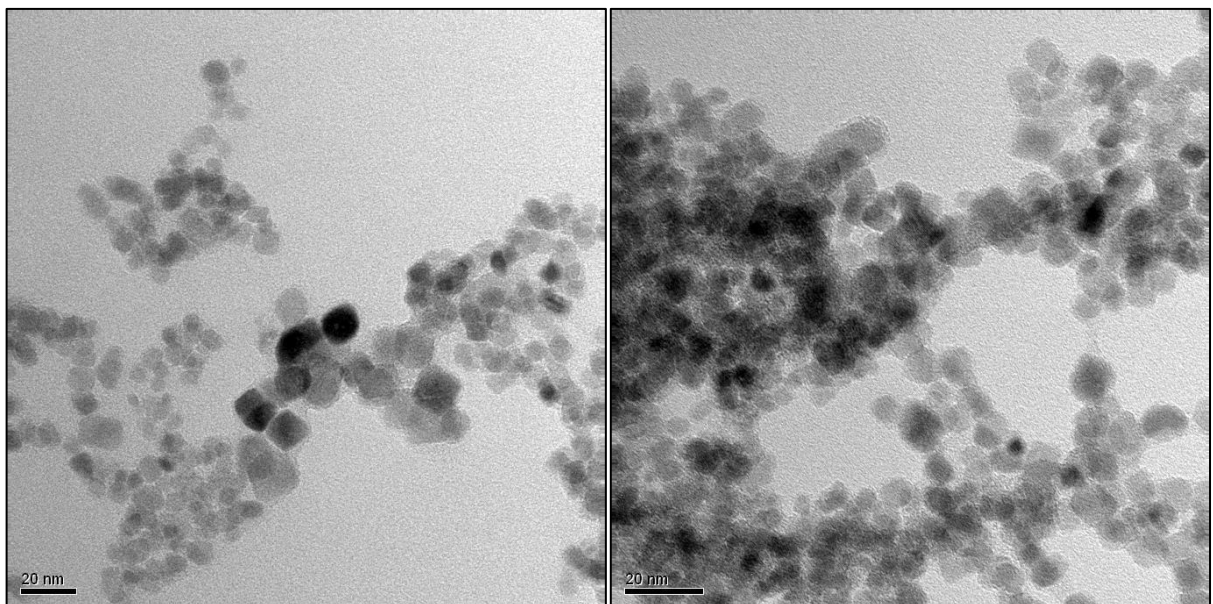
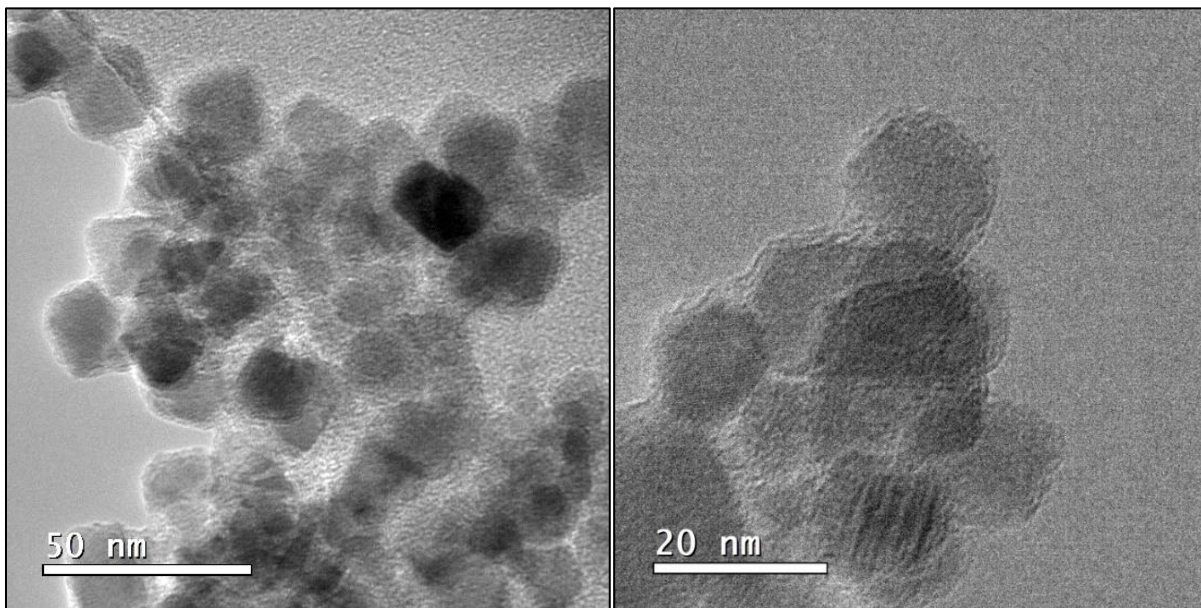
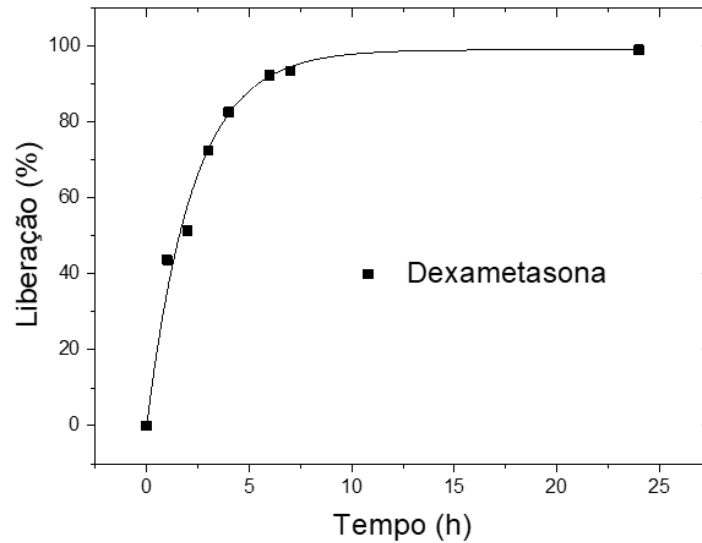


Figura 50 – Imagens de MET da amostra C.01 encapsulada com P730, M730.



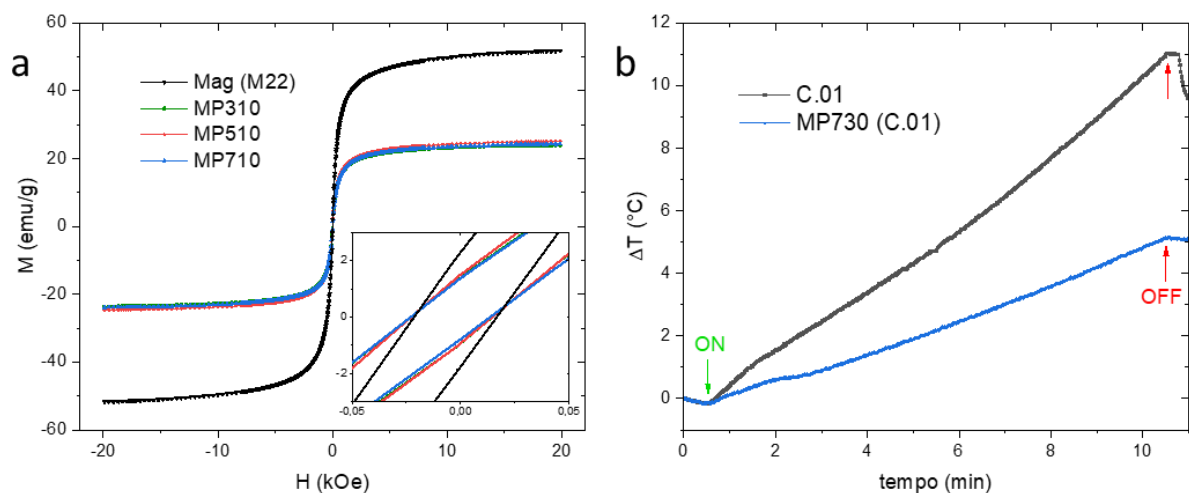
Para verificar a capacidade do sistema de encapsular moléculas, foi realizado teste com o fármaco dexametasona, um glicocorticóide de propriedades anti-inflamatórias que tem sido aplicado no tratamento de tumores como o mieloma (PALUMBO; CHANAN-KHAN; WEISEL; NOOKA *et al.*, 2016). Como esta molécula é hidrofóbica, ela pode ser acondicionada junto das cadeias de caprolactona, especialmente se o copolímero apresenta mais unidades do macromônômero, como no P730 utilizado. O protocolo foi o mesmo aplicado anteriormente, mas com o fármaco solubilizado em metanol com o polímero. Os resultados a partir de medidas por cromatografia (HPLC) apontaram uma eficiência de encapsulação (EE%) de 75,5%. A liberação do fármaco ocorreu através de uma liberação imediata (típico *burst release*) inicial (FERRARI; SPONCHIONI; MORBIDELLI; MOSCATELLI, 2018), com 51% após 2 h, e após 7 horas atingiu 95% (Figura 51). Este sistema de encapsulação não “esconde” o fármaco de forma tão eficiente como um sistema micelar pode fazê-lo ao acondicioná-lo no núcleo da micela; neste caso, o fármaco fica mais livre, estando sujeito a dobramentos da cadeia polimérica na superfície da magnetita para ser liberado por difusão mais rapidamente para a solução externa. Ainda assim, a EE% é comparável a sistemas eficientes de nanopartículas poliméricas (COLOMBO; GALLETI; LEPRI; CARON *et al.*, 2015), e o sistema poderia ser indicado para aplicações que não requeiram liberação tão lenta.

Figura 51 – Perfil de liberação de dexametasona de partículas MP730 de acordo com o tempo.



O comportamento magnético das amostras de magnetita encapsulada é mostrado na Figura 52a. A amostra de magnetita encapsulada é a M22, e seu comportamento segue sendo superparamagnético, com baixa coercividade registrada de 18 Oe. A magnetização de saturação, no entanto, é perto da metade da magnetita pura para M310, M510 e M710, visto que a massa magnética é reduzida pela metade ao realizar a encapsulação na proporção 1:1 de magnetita/polímero em massa.

Figura 52 - Resultados de magnetização (a) e de hipertermia (b) das amostras de magnetita com polímeros.



Foi verificado comportamento similar para a capacidade de aquecimento por hipertermia magnética, com campo magnético de frequência de 109,8 kHz e amplitude de 25 mT, conforme mostrado na Figura 52b. Em concentração total de 5 mg/mL (considerando a

massa de magnetita e polímero), o SAR cai para próximo da metade do que o da amostra somente de óxido de ferro, como esperado. Ainda assim, para atingir um aumento de temperatura de 5°C, a temperatura de início do tratamento de hipertermia, foram necessários apenas 10 min, o que seria exequível na prática clínica.

5. Conclusão parcial

Neste capítulo da tese, foram abordadas duas estratégias para a encapsulação polimérica de nanopartículas de magnetita, ambas baseadas na capacidade da dopamina se ligar à superfície da partícula. Na primeira, buscou-se realizar a polimerização da dopamina *in situ* e na segunda, inicialmente foram sintetizados copolímeros para sua posterior ligação às partículas.

Em relação ao revestimento com polidopamina, um desafio foi controlar de forma eficiente o processo de polimerização. Diversos parâmetros foram avaliados, sendo que o uso de meio de reação com etanol e sua agitação por banho de ultrassom se mostraram eficientes para reduzir a velocidade de polimerização e obter camadas mais finas de polímero sobre as nanopartículas, para a obtenção de um sistema com alta estabilidade coloidal, e tamanhos hidrodinâmicos da ordem de 100 nm a 200 nm (*Z-average*). Também foi mostrado que é possível encapsular moléculas na estrutura, através da incorporação corante rodamina B. O perfil de liberação da molécula se deu com pequena diferença quando em contato com soluções de diferentes valores de pH.

Numa segunda estratégia, foram sintetizados copolímeros anfífilicos via polimerização RAFT com um bloco de monômeros de MPC e outro, de caprolactona funcionalizada com dopamina, através de seguidas reações orgânicas com altas conversões de produto confirmadas por RMN. O revestimento das partículas se deu por técnica de nanoprecipitação, que se mostrou eficiente através da verificação da caracterização dos materiais, DLS, MET, FTIR e TGA, com tamanhos também tipicamente entre 100 nm e 200 nm (*Z-average*), ou menores na medida por número do DLS – o tamanho após encapsulação depende diretamente do estado de agregação prévio das partículas de magnetita. Foi realizada a incorporação do fármaco dexametasona ao sistema, com eficiência de encapsulação de 75% e rápida liberação de cerca de 95% após 7 horas.

Com o uso dos dois protocolos, ainda foi mostrado como as partículas mantêm sua propriedade superparamagnética e sua capacidade de aquecer seus fluidos pela aplicação de campo magnético alternado, confirmando seu potencial de aplicação em hipertermia magnética. Dessa forma, as duas estratégias se mostram viáveis para a produção de plataformas magnéticas multifuncionais para aplicações biomédicas.

Conclusão

De acordo com o proposto para o doutorado, os trabalhos foram realizados em duas frentes: a primeira realizada desde o seu início, por experimentos de síntese de nanopartículas de magnetita; e a segunda, de funcionalização da superfície, iniciada ao longo do projeto, com as estratégias de polimerização de dopamina sobre a magnetita e de síntese de copolímeros de caprolactona e MPC para recobrimento de magnetita por nanoprecipitação, esta última realizada na universidade Politecnico di Milano.

Na primeira frente, o estudo para o desenvolvimento da síntese de nanopartículas de magnetita por redução-precipitação permitiu a identificação de diversos parâmetros que influenciam as características de composição, morfologia, magnetização e, conseqüentemente, de potencial de aquecimento (SAR). Tais resultados foram relacionados às teorias de nucleação e crescimento clássicas e não-clássicas, que seguem sendo motivo de intenso debate na literatura científica. Um parâmetro de influência determinante, por exemplo, é a temperatura de precipitação dos núcleos de magnetita, cujo aumento levou à obtenção de nanopartículas maiores, fenômeno explicado de acordo com a teoria não-clássica que descreve o crescimento pela coalescência de partículas primárias – nossos resultados com a abordagem apresentada podem ajudar a fundamentar este mecanismo para a descrição da formação das nanopartículas de magnetita.

Na segunda frente, as duas estratégias de revestimento das nanopartículas de magnetita se mostraram eficientes para formar materiais compósitos nanoestruturados, em geral, menores de 200 nm, com manutenção das propriedades magnéticas e de hipertermia. Em especial, os protocolos de fabricação de copolímeros de bloco com ligantes específicos, que representam os chamados blocos de construção, se apresenta como uma abordagem extremamente versátil para a encapsulação de diferentes tipos de nanopartículas inorgânicas.

Perspectivas

Os materiais sintetizados durante os trabalhos do doutorado ainda serão submetidos a novos testes de aplicação. As partículas com revestimento passarão por testes de viabilidade celular, como os já realizados para as nanopartículas de magnetita nuas. Além disso, serão realizados testes de citotoxicidade sob a aplicação de campo magnético, para verificar o efeito de tratamento seletivo para as células tumorais *in vitro*.

Para a otimização do processo de síntese de nanopartículas, a pesquisa descrita no Capítulo 1 desta tese apontou o caminho para a produção de partículas monodispersas que produzam maior SAR. Agora, se deve aplicar os conhecimentos adquiridos para refinar os parâmetros além da temperatura e pH, como as condições de agitação da mistura do ferro com a base, a concentração de HCl, o uso de precursor $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, entre outros, assim como realizar estudo da viabilidade de escalonamento da produção, que estão sendo conduzidos no Grupo de Materiais Coloidais juntamente com outros alunos, também sob orientação do Prof. Dr. Laudemir Carlos Varanda. O processo de envelhecimento também deve ser otimizado, uma vez que favorece a obtenção de partículas maiores e mais monodispersas, mas ainda é um processo de duração muito longa visando a produção em larga escala. Em uma das amostras, também foi realizado processo hidrotérmico a 100 °C em sistema fechado por 24 h, que leva a maior cristalinidade e crescimento das partículas, mas também é pouco viável a nível industrial. Uma estratégia alternativa é realizar o processo em tubulação em fluxo contínuo, que permitem maior controle da pressão do sistema com o uso de válvulas reguladoras, e é uma nova tendência para a síntese de nanopartículas (DARR; ZHANG; MAKWANA; WENG, 2017). Também nessa linha, sistemas baseados microfluídica podem ser aplicados, visando um processo mais controlado de mistura inicial do ferro com a base para a nucleação de magnetita; os microcanais podem ser conectados diretamente ao sistema tubular para o processo hidrotérmico subsequente. Um processo como esse será montado no Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) para a síntese de nanopartículas e sua caracterização será realizada em parceria com o IQSC.

Quanto aos polímeros e seu uso para a encapsulação de nanopartículas, estão sendo realizados estudos similares para a encapsulação de magnetita em associação com RNA de interferência, visando terapia gênica, em parceria com um aluno de doutorado do IPT. Um outro bloco de construção a ser adicionado neste caso é uma molécula de reconhecimento

específico por células tumorais, que favoreça a internalização das partículas, como o ácido fólico. Também deverão ser realizados testes com nanopartículas sintetizadas no Grupo de Materiais Coloidais por rotas em solventes orgânicos, que produzem partículas hidrofóbicas; os copolímeros anfifílicos com ligantes específicos à superfície das partículas podem ser aplicados para a encapsulação por nanoprecipitação, sendo uma opção de processo rápido para tornar as partículas hidrofílicas.

Referências

ABENOJAR, E. C.; WICKRAMASINGHE, S.; BAS-CONCEPCION, J.; SAMIA, A. C. S. Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles. **Progress in Natural Science-Materials International**, New York, v. 26, n. 5, p. 440-448, 2016.

ADELEYE, A.; CONWAY, J.; GARNER, K.; HUANG, Y. HUANG, Y. SU, Y. KELLER, A. Engineered nanomaterials for water treatment and remediation: costs, benefits, and applicability. **Chemical Engineering Journal**, New York, v. 286, p. 640-662, 2016.

AL-JAMAL, K. T.; BAI, J.; WANG, J. T. W.; PROTTI, A.; SOUTHERN, P.; BOGART, L.; HEIDARI, H.; LI, X.; CAKEBREAD, A.; ASKER, D.; AL-JAMAL, W.; SHAH, A.; BALS, S.; SOSABOWSKI, J.; PANKHURST, Q. Magnetic drug targeting: preclinical in vivo studies, mathematical modeling, and extrapolation to humans. **Nano Letters**, Washington, v. 16, n. 9, p. 5652-5660, 2016.

ALIAKBARI, M.; MOHAMMADIAN, E.; ESMAEILI, A.; PAHLEVANNESHAN, Z. Differential effect of polyvinylpyrrolidone-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles on BT-474 human breast cancer cell viability. **Toxicology in Vitro**, New York, v. 54, p. 114-122, 2019.

ALTAN, C. L.; LENDERS, J. J. M.; BOMANS, P. H. H.; DE WITH, G.; FRIEDRICH, H. BUCAK, S.; SOMMERDIJK, N. Partial oxidation as a rational approach to kinetic control in bioinspired magnetite synthesis. **Chemistry: a european journal**, Weinheim, v. 21, n. 16, p. 6150-6156, 2015.

ANSELMO, A. C.; MITRAGOTRI, S. A review of clinical translation of inorganic nanoparticles. **Aaps Journal**, Cham, v. 17, n. 5, p. 1041-1054, 2015.

BABU, C. S.; MADHUSOODANAN, M.; SRIDHAR, G.; TEMBE, B. L. Orientations of Fe(H₂O)(6) (2+) and Fe(H₂O)(6) (3+) complexes at a reactive separation in water. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 119, n. 24, p. 5679-5681, 1997.

BARCLAY, T. G.; HEGAB, H. M.; CLARKE, S. R.; GINIC-MARKOVIC, M. Versatile surface modification using polydopamine and related polycatecholamines: chemistry, structure, and applications. **Advanced Materials Interfaces**, Weinheim, 4, n. 19, p. 38, 2017.

BAUMGARTNER, J.; DEY, A.; BOMANS, P. H. H.; LE COADOU, C. FRATZL, P.; SOMMERDIJK, N.; FAIVRE, D. Nucleation and growth of magnetite from solution. **Nature Materials**, Cham, v. 12, n. 4, p. 310-314, 2013.

BIJU, V. Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. **Chemical Society Reviews**, Washington, v. 43, n. 3, p. 744-764, 2014.

BLANCO-ANDUJAR, C.; ORTEGA, D.; SOUTHERN, P.; NESBITT, S. A.; THANH, N. T. K.; PANKHURST, Q. A. Real-time tracking of delayed-onset cellular apoptosis induced by intracellular magnetic hyperthermia. **Nanomedicine**, London, v. 11, n. 2, p. 121-136, 2016.

CAVALIERE, R.; CIOCATTO, E. C.; GIOVANELLA, B. C.; HEIDELBERGER, C.; JOHNSON, R. O.; MARGOTTINI, M.; MONDOVI, B.; MORICCA, G.; ROSSI-FANELLI, A. Selective heat sensitivity of cancer cells - biochemical and clinical studies. **Cancer**, Weinheim, v. 20, n. 9, p. 1351-1381, 1967.

CHENG, F. F.; ZHANG, J. J.; XU, F.; HU, L. H.; ABDEL-HALIM, E. S.; ZHU, J. J. pH-sensitive polydopamine nanocapsules for cell imaging and drug delivery based on folate receptor targeting. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, Valencia, v. 9, n. 7, p. 1155-1163, 2013.

CHIM, C. S.; KUMAR, S. K.; ORLOWSKI, R. Z.; COOK, G.; RICHARDSON, P. G.; GERTZ, M. A.; GIRALT, S.; MATEOS, M. V.; LELEU, X.; ANDERSON, K. C. Management of relapsed and refractory multiple myeloma: novel agents, antibodies, immunotherapies and beyond. **Leukemia**, London, v. 32, n. 2, p. 252-262, 2018.

COLOMBO, C.; GALLETI, L.; LEPRI, M.; CARON, I.; MAGAGNIN, L.; VEGLIANESE, P.; ROSSI, F.; MOSCATELLI, D. Multidrug encapsulation within self-assembled 3D structures formed by biodegradable nanoparticles. **European Polymer Journal**, Oxford, v. 68, p. 216-225, 2015. Article.

CONDE-LEBORAN, I.; BALDOMIR, D.; MARTINEZ-BOUBETA, C.; CHUBYKALO-FESENKO, O.; MORALES, M. D.; SALAS, G.; CABRERA, D.; CAMARERO, J.; TERAN, F. J.; SERANTES, D. A single picture explains diversity of hyperthermia response of magnetic nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, Washington, v. 119, n. 27, p. 15698-15706, 2015.

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

CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. **The iron oxides**: structure, properties, reactions, occurrences and uses. 2. ed. Weinheim: WILEY-VCH, 2003.

COVA, L.; BIGINI, P.; DIANA, V.; SITIA, L.; SITIA, L.; FERRARI, R.; PESCE, R. M.; KHALAF, R.; BOSSOLASCO, P.; UBEZIO, P.; LUPI, M.; TORTAROLO, M.; COLOMBO, L.; GIARDINO, D.; SILANI, V.; MORBIDELLI, M.; SALMONA, M.; MOSCATELLI, D. Biocompatible fluorescent nanoparticles for in vivo stem cell tracking. **Nanotechnology**, Bristol, v. 24, n. 24, 2013.

CULLITY, B. D.; GRAHAM, C. D. **Introduction to magnetic materials**. 2. ed. Piscataway: IEEE Press, 2009.

DAOU, T. J.; POURROY, G.; BEGIN-COLIN, S.; GRENECHE, J. M.; ULHAQ-BOUILLET, C.; LEGARE, P.; BERNHARDT, P.; LEUVREY, C.; ROGEZ, G. Hydrothermal synthesis of monodisperse magnetite nanoparticles. **Chemistry of Materials**, Washington, v. 18, n. 18, p. 4399-4404, 2006.

DARR, J. A.; ZHANG, J. Y.; MAKWANA, N. M.; WENG, X. L. Continuous hydrothermal synthesis of inorganic nanoparticles: applications and future directions. **Chemical Reviews**, Washington, v. 117, n. 17, p. 11125-11238, 2017.

DULINSKA-LITEWKA, J.; LAZARCZYK, A.; HALUBIEC, P.; SZAFRANSKI, O.; HALUBIEC, P.; SZAFRANSKI, O.; KARNAS, K.; KAREWICZ, A. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: current and prospective medical applications. **Materials**, Basel, v. 12, n. 4, p. 26, 2019.

FERRARI, R.; SPONCHIONI, M.; MORBIDELLI, M.; MOSCATELLI, D. Polymer nanoparticles for the intravenous delivery of anticancer drugs: the checkpoints on the road from the synthesis to clinical translation. **Nanoscale**, Cambridge, v. 10, n. 48, p. 22701-22719, 2018.

FERRARI, R.; YU, Y.; MORBIDELLI, M.; HUTCHINSON, R.; MOSCATELLI, D. Epsilon-caprolactone-based macromonomers suitable for biodegradable nanoparticles synthesis through free radical polymerization. **Macromolecules**, Washington, v. 44, n. 23, p. 9205-9212, 2011.

FORGE, D.; ROCH, A.; LAURENT, S.; TELLEZ, H.; GOSSUIN, Y.; RENAUX, F.; VANDER ELST, L.; MULLER, R. N. Optimization of the synthesis of superparamagnetic contrast agents by the design of experiments method. **Journal of Physical Chemistry C**, Washington, v. 112, n. 49, p. 19178-19185, 2008.

GATTI, S.; AGOSTINI, A.; FERRARI, R.; MOSCATELLI, D. Synthesis and nanoprecipitation of HEMA-CLn based polymers for the production of biodegradable nanoparticles. **Polymers**, Basel, v. 9, n. 9, 2017.

GNEVECKOW, U.; JORDAN, A.; SCHOLZ, R.; BRUSS, V.; WALDOFNER, N.; RICKE, J.; FEUSSNER, A.; HILDEBRANDT, B.; RAU, B.; WUST, P. Description and characterization of the novel hyperthermia- and thermoablation-system MFH (R) 300F for clinical magnetic fluid hyperthermia. **Medical Physics**, Hoboken, 31, n. 6, p. 1444-1451, 2004.

GRAUER, O.; JABER, M.; HESS, K.; WECKESSER, M.; SCHWINDT, W.; MARING, S.; WOLFER, J.; STUMMER, W. Combined intracavitary thermotherapy with iron oxide nanoparticles and radiotherapy as local treatment modality in recurrent glioblastoma patients. **Journal of Neuro-Oncology**, New York, v. 141, n. 1, p. 83-94, 2019.

GUERRINI, L.; ALVAREZ-PUEBLA, R. A.; PAZOS-PEREZ, N. Surface modifications of nanoparticles for stability in biological fluids. **Materials**, Basel, v. 11, n. 7, p. 28, 2018.

GUPTA, R.; SHARMA, D. Evolution of magnetic hyperthermia for glioblastoma multiforme therapy. **ACS Chemical Neuroscience**, Washington, v. 10, n. 3, p. 1157-1172, 2019.

HANINI, A.; LARTIGUE, L.; GAVARD, J.; SCHMITT, A.; KACEM, K.; WILHELM, C.; GAZEAU, F.; CHAU, F.; AMMAR, S. Thermosensitivity profile of malignant glioma U87-MG cells and human endothelial cells following gamma-Fe₂O₃ NPs internalization and magnetic field application. **Rsc Advances**, Cambridge, v. 6, n. 19, p. 15415-15423, 2016.

HUNTER, R. J. **Foundations of Colloid Science**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2001.

INCA. **Estimativa 2020**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

JEONG, D. U.; BAE, S.; MACKS, C.; WHITAKER, J.; LYNN, M.; WEBB, K.; LEE, J. S. Hydrogel-mediated local delivery of dexamethasone reduces neuroinflammation after traumatic brain injury. **Biomedical Materials**, Bristol, v. 16, n. 3, p. 14, 2021.

JOHANNSEN, M.; THIESEN, B.; WUST, P.; JORDAN, A. Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer. **International Journal of Hyperthermia**, New York, v. 26, n. 8, p. 790-795, 2010.

JOHN, J. V.; JEONG, Y. I.; JOHNSON, R. P.; HEO, M. S.; KANG, D.; KIM, I. Cell specific doxorubicin delivery through the temperature responsive lipopolymer nanocarriers engineered by the combination of RAFT polymerization and click chemistry. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 213, p. E59-E59, 2015.

KEDDIE, D. A guide to the synthesis of block copolymers using reversible-addition fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization. **Chemical Society Reviews**, Cambridge, v. 43, n. 2, p. 496-505, 2014.

KIEVIT, F.; VEISEH, O.; FANG, C.; BHATTARAI, N.; LEE, D.; ELLENBOGEN, R. G.; ZHANG, M. Q. Chlorotoxin labeled magnetic nanovectors for targeted gene delivery to glioma. **ACS Nano**, Washington, v. 4, n. 8, p. 4587-4594, 2010.

KONONENKO, V.; ERMAN, A.; PETAN, T.; KRIZAJ, I.; KRIZAJ, I.; KRALJ, S.; MAKOVEC, D.; DROBNE, D. Harmful at non-cytotoxic concentrations: SiO₂-SPIONs affect surfactant metabolism and lamellar body biogenesis in A549 human alveolar epithelial cells. **Nanotoxicology**, Oxon, v. 11, n. 3, p. 419-429, 2017.

KRAWCZYK, P. M.; EPPINK, B.; ESSERS, J.; STAP, J. STAP, J.; RODERMOND, H.; ODIJK, H.; ZELENSKY, A.; VAN BREE, C.; STALPERS, L. J.; BUIST, M. R.; SOULLIE, T.; RENS, J.; VERHAGEN, H.; O'CONNOR, M. J.; FRANKEN, N.; TEN HAGEN, T.; KANAAR, R.; ATEN, J. A. 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, 2011.

KUO, C. Y.; LIU, T. Y.; CHAN, T. Y.; TSAI, S. C.; HARDIANSYAH, A.; HUANG, L. Y.; YANG, M. C.; LU, R. H.; JIANG, J. K.; YANG, C. Y.; LIN, C. H.; CHIU, W. Y. Magnetically triggered nanovehicles for controlled drug release as a colorectal cancer therapy. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, Amsterdam, v. 140, p. 567-573, 2016.

KWON, S. G.; HYEON, T. Formation mechanisms of uniform nanocrystals via hot-injection and heat-up methods. **Small**, Weinheim, 7, n. 19, p. 2685-2702, 2011.

LAMER, V. K.; DINEGAR, R. H. Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 72, n. 11, p. 4847-4854, 1950.

LANGFORD, J. I.; WILSON, A. J. C. Seherrer after sixty years: a survey and some new results in the determination of crystallite size. **Journal of Applied Crystallography**, Chester, v. 11, p. 102-113, 1978.

LANIER, O.; KOROTYCH, O.; MONSALVE, A.; WABLE, D.; SAVLIWALA, S.; GROOMS, N. W.; NACEA, C.; TUITT, O. R.; DOBSON, J. Evaluation of magnetic nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia. **International Journal of Hyperthermia**, Oxon, v. 36, n. 1, p. 687-701, 2019.

LAZZARI, S.; MOSCATELLI, D.; CODARI, F.; SALMONA, M.; MORBIDELLI, M.; DIOMEDE, L. Colloidal stability of polymeric nanoparticles in biological fluids. **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 14, n. 6, 2012.

LEE, H.; DELLATORE, S. M.; MILLER, W. M.; MESSERSMITH, P. B. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. **Science**, Washington, v. 318, n. 5849, p. 426-430, 2007.

LEE, J.; YANG, J.; KWON, S. G.; HYEON, T. Nonclassical nucleation and growth of inorganic nanoparticles. **Nature Reviews Materials**, London, v. 1, n. 8, p. 16, 2016.

LI, H.; JIN, Z.; CHO, S.; JEON, M.; NGUYEN, V. D.; PARK, J. O.; PARK, S. Folate-receptor-targeted NIR-sensitive polydopamine nanoparticles for chemophotothermal cancer therapy. **Nanotechnology**, Bristol, v. 28, n. 42, 2017.

LI, Q.; KARTIKOWATI, C. W.; HORIE, S.; OGI, T.; IWAKI, T.; OKUYAMA, K. Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe₃O₄ nanoparticles. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 9894, 2017.

LI, Y. A.; ZHANG, H. Nanoparticle-based drug delivery systems for enhanced tumor-targeting treatment. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, Valencia, v. 15, n. 1, p. 1-27, 2019.

LIM, E.; KIM, T.; PAIK, S.; HAAM, S.; HUH, Y. M.; LEE, K. Nanomaterials for theranostics: recent advances and future challenges. **Chemical Reviews**, Washington, v. 115, n. 1, p. 327-394, 2015.

LIN, L. S.; CONG, Z. X.; CAO, J. B.; KE, K. M.; PENG, Q. L.; GAO, J. H.; YANG, H. H.; LIU, G.; CHEN, X. Y. Multifunctional Fe₃O₄@Polydopamine Core-Shell nanocomposites for intracellular mRNA detection and imaging-guided photothermal therapy. **ACS Nano**, Washington, v. 8, n. 4, p. 3876-3883, 2014.

LING, D. S.; HYEON, T. Chemical design of biocompatible iron oxide nanoparticles for medical applications. **Small**, Weinheim, v. 9, n. 9-10, p. 1450-1466, 2013.

- LIU, Q. Z.; YU, B.; YE, W. C.; ZHOU, F. Highly selective uptake and release of charged molecules by pH-responsive polydopamine microcapsules. **Macromolecular Bioscience**, Weinheim, v. 11, n. 9, p. 1227-1234, 2011.
- LIU, R.; GUO, Y. L.; ODUSOTE, G.; QU, F. L. PRIESTLEY, R. D. Core-Shell Fe₃O₄ polydopamine nanoparticles serve multipurpose as drug carrier, catalyst support and carbon adsorbent. **ACS Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 5, n. 18, p. 9167-9171, 2013.
- LIU, T. Y.; HU, S. H.; LIU, D. M.; CHEN, S. Y.; CHEN, I. W. Biomedical nanoparticle carriers with combined thermal and magnetic responses. **Nano Today**, Oxon, v. 4, n. 1, p. 52-65, 2009.
- LIU, Y.; CHEN, J.; LIU, Z.; XU, H.; ZHENG, Y.; ZHONG, J.; YANG, Q.; TIAN, H.; SHI, Z.; YAO, J.; XIONG, C. Facile fabrication of Fe₃O₄ nanoparticle/carbon nanofiber aerogel from Fe-ion cross-linked cellulose nanofibrils as anode for lithium-ion battery with superhigh capacity. **Journal of Alloys and Compounds**, Lausanne, v. 829, 2020.
- LU, Y. J.; LOW, P. S. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 64, p. 342-352, 2012.
- LUENGO, Y.; MORALES, M.; GUTIERREZ, L.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S. Counterion and solvent effects on the size of magnetite nanocrystals obtained by oxidative precipitation. **Journal of Materials Chemistry C**, Cambridge, v. 4, n. 40, p. 9482-9488, 2016.
- LUONGO, G.; CAMPAGNOLO, P.; PEREZ, J.; KOSEL, J.; GEORGIU, T. K.; REGOUTZ, A.; PAYNE, D. J.; STEVENS, M. M.; RYAN, M. P.; PORTER, A. E.; DUNLOP, I. E. Scalable high-affinity stabilization of magnetic iron oxide nanostructures by a biocompatible antifouling homopolymer. **ACS Applied Materials & Interfaces**, Washington, v. 9, n. 46, p. 40059-40069, 2017.
- MAEDA, H.; NAKAMURA, H.; FANG, J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 65, n. 1, p. 71-79, 2013.
- MAGFORCE. **Nanotherm therapy**. Berlin: MagForce, 2018. Disponível em: <http://www.magforce.de/en/nanotherm>. Acesso em: 01 mar. 2018.
- MAIER-HAUFF, K.; ROTHE, R.; SCHOLZ, R.; GNEVECKOW, U.; WUST, P.; THIESEN, B.; FEUSSNER, A.; VON DEIMLING, A.; WALDOEFNER, N.; FELIX, R.; JORDAN, A. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. **Journal of Neuro-Oncology**, New York, v. 81, n. 1, p. 53-60, 2007.
- MALUGIN, A.; KOPECKOVA, P.; KOPECEK, J. Liberation of doxorubicin from HPMA copolymer conjugate is essential for the induction of cell cycle arrest and nuclear fragmentation in ovarian carcinoma cells. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 124, n. 1-2, p. 6-10, 2007.
- MALVERN. **Zetasizer Nano User Manual**. [S. l.]: Malvern Instruments Ltd., 2013.
- MARCIELLO, M.; CONNORD, V.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; VERGES, M.; CARREY, J.; RESPAUD, M.; SERNA, C. J.; MORALES, M. P. Large scale production of biocompatible magnetite nanocrystals with high saturation magnetization values through green aqueous synthesis. **Journal of Materials Chemistry B**, Cambridge, v. 1, n. 43, p. 5995-6004, 2013.
- MASCOLO, M.; PEI, Y.; RING, T. Room temperature Co-precipitation synthesis of magnetite nanoparticles in a large pH window with different bases. **Materials**, Basel, v. 6, n. 12, p. 5549-5567, 2013.
- MASSART, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. **IEEE Transactions on Magnetics**, New York, v. 17, n. 2, p. 1247-1248, 1981.

MATUSZAK, J.; LUTZ, B.; SEKITA, A.; ZALOGA, J.; ALEXIOU, C.; LYER, S.; CICHA, I. Drug delivery to atherosclerotic plaques using superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 13, p. 8443-8460, 2018.

MIKI, H.; SHINGEN, N.; ASUKA, O.; HIROFUMI, T.; TENSHIN, H.; TERAMACHI, J.; HIASA, M.; BAT-ERDENE, A.; MAEDA, Y.; OURA, M.; TAKAHASHI, M.; IWASA, M.; HARADA, T.; FUJII, S.; KURAHASHI, K.; YOSHIDA, S.; KAGAWA, K.; ENDO, I.; AIHARA, K.; IKUO, M.; ITOH, K. HAYASHI, K.; NAKAMURA, M.; ABE, M. Effective impairment of myeloma cells and their progenitors by hyperthermia. **Oncotarget**, Orchard Park, v. 9, n. 12, p. 10307-10316, 2018.

MIMA, Y.; HASHIMOTO, Y.; SHIMIZU, T.; KIWADA, H.; ISHIDA, TATSUHIRO. Anti-PEG IgM is a major contributor to the accelerated blood clearance of polyethylene glycol-conjugated protein. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 12, n. 7, p. 2429-2435, 2015.

MIRABELLO, G.; IANIRO, A.; BOMANS, P. H. H.; YODA, T.; ARAKAKI, A.; FRIEDRICH, H.; DE WITH, G.; SOMMERDIJK, N. Crystallization by particle attachment is a colloidal assembly process. **Nature Materials**, Berlin, v. 19, n. 4, p. 391, 2020.

NEAMTU, M.; NADEJDE, C.; HODOROABA, V.; SCHNEIDER, R.; VERESTIUC, L.; PANNE, U. Functionalized magnetic nanoparticles: synthesis, characterization, catalytic application and assessment of toxicity. **Scientific Reports**, London, v. 8, 2018.

NEVES, H. R.; BINI, R. A.; BARBOSA, J. H. O.; SALMON, C. E. G.; VARANDA, L. C. Dextran-coated antiferromagnetic MnO nanoparticles for a T-1-MRI contrast agent with high colloidal stability. **Particle & Particle Systems Characterization**, Weinheim, v. 33, n. 3, p. 167-176, 2016.

OSTWALD, W. On the assumed isomerism of red and yellow mercury oxide and the surface-tension of solid bodies. **Zeitschrift Fur Physikalische Chemie, Stochiometrie Und Verwandtschaftslehre**, Leipzig, v. 34, n. 4, p. 495-503, 1900.

OTA, S.; TAKEMURA, Y. Characterization of neel and brownian relaxations isolated from complex dynamics influenced by dipole interactions in magnetic nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry C**, Washington, v. 123, n. 47, p. 28859-28866, 2019.

PALMIERO, U.; MOROSI, L.; BELLO, E.; PONZO, M.; FRAPOLLI, R.; MATTEO, C.; FERRARI, M.; ZUCCHETTI, M.; MINOLI, L.; DE MAGLIE, M.; ROMANELLI, P.; MORBIDELLI, M.; D'INCALCI, M.; MOSCATELLI, D. Readily prepared biodegradable nanoparticles to formulate poorly water soluble drugs improving their pharmacological properties: the example of trabectedin. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 276, p. 140-149, 2018.

PALMIERO, U.; SPONCHIONI, M.; MANFREDINI, N.; MARALDI, M.; MOSCATELLI, D. Strategies to combine ROP with ATRP or RAFT polymerization for the synthesis of biodegradable polymeric nanoparticles for biomedical applications. **Polymer Chemistry**, Cambridge, v. 9, n. 30, p. 4084-4099, 2018.

PALMIERO, U. C.; MARALDI, M.; MANFREDINI, N.; MOSCATELLI, D. Zwitterionic polyester-based nanoparticles with tunable size, polymer molecular weight, and degradation time. **Biomacromolecules**, Washington, v. 19, n. 4, p. 1314-1323, 2018.

PALUMBO, A.; CHANAN-KHAN, A.; WEISEL, K.; NOOKA, A.; MASSZI, T.; BEKSAC, M.; SPICKA, I.; HUNGRIA, V.; MUNDER, M.; MATEOS, M. V.; MARK, T. M.; QI, M.; SCHECTER, J.; AMIN, H.; QIN, X.; DERAEDT, W.; AHMADI, T.; SPENCER, A.; SONNEVELD, P. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 375, n. 8, p. 754-766, 2016.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à espectroscopia. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 716 p.

PERRAULT, S. D.; WALKEY, C.; JENNINGS, T.; FISCHER, H. C.; CHAN, W. C. W. Mediating tumor targeting efficiency of nanoparticles through design. **Nano Letters**, Washington, v. 9, n. 5, p. 1909-1915, 2009.

PERRIER, S. 50th Anniversary perspective: RAFT polymerization-a user guide. **Macromolecules**, Washington, v. 50, n. 19, p. 7433-7447, 2017.

PERSI, E.; DURAN-FRIGOLA, M.; DAMAGHI, M.; ROUSH, W. R.; ALOY, P.; CLEVELAND, J. L.; GILLIES, R. J.; RUPPIN, E. Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy. **Nature Communications**, London, v. 9, p. 11, 2018.

POLLER, J. M.; ZALOGA, J.; SCHREIBER, E.; UNTERWEGER, H.; JANKO, C.; RADON, P.; EBERBECK, D.; TRAHMS, L.; ALEXIOU, C.; FRIEDRICH, R. P. Selection of potential iron oxide nanoparticles for breast cancer treatment based on in vitro cytotoxicity and cellular uptake. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, 12, p. 3207-3220, 2017.

QU, S. C.; YANG, H. B.; REN, D. W.; KAN, S. H.; ZOU, G. T.; LI, D. M.; LI, M. H. Magnetite nanoparticles prepared by precipitation from partially reduced ferric chloride aqueous solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, San Diego, v. 215, n. 1, p. 190-192, 1999.

RAVIKUMAR, C.; BANDYOPADHYAYA, R. Mechanistic Study on magnetite nanoparticle formation by thermal decomposition and coprecipitation routes. **Journal of Physical Chemistry C**, Washington, v. 115, n. 5, p. 1380-1387, 2011.

ROTH, H. C.; SCHWAMINGER, S. P.; SCHINDLER, M.; WAGNER, F. E.; BERENSMEIER, S. Influencing factors in the CO-precipitation process of superparamagnetic iron oxide nano particles: a model based study. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, Amsterdam, v. 377, p. 81-89, 2015.

SALUNKHE, A. B.; KHOT, V. M.; PAWAR, S. H. Magnetic hyperthermia with magnetic nanoparticles: a status review. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 14, n. 5, p. 572-594, 2014.

SCHWAMINGER, S. P.; SYHR, C.; BERENSMEIER, S. Controlled synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles: magnetite or maghemite? **Crystals**, Basel, v. 10, n. 3, p. 12, 2020.

SEDO, J.; SAIZ-POSEU, J.; BUSQUE, F.; RUIZ-MOLINA, D. Catechol-based biomimetic functional materials. **Advanced Materials**, Weinheim, v. 25, n. 5, p. 653-701, 2013.

SHA, Z.; GOLDBERG, A. L. Multiple myeloma cells are exceptionally sensitive to heat shock, which overwhelms their proteostasis network and induces apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 117, n. 35, p. 21588-21597, 2020.

SHAH, R. R.; DAVIS, T. P.; GOVER, A. L.; NIKLES, D. E.; BRAZEL, C. S. Impact of magnetic field parameters and iron oxide nanoparticle properties on heat generation for use in magnetic hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, Amsterdam, v. 387, p. 96-106, 2015.

SHEN, Z. Y.; WU, A. G.; CHEN, X. Y. Iron oxide nanoparticle based contrast agents for magnetic resonance imaging. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v. 14, n. 5, p. 1352-1364, 2017.

SOUZA, C. G. S.; BECK, W.; VARANDA, L. C. Multifunctional luminomagnetic FePt@Fe₃O₄/SiO₂/Rhodamine B/SiO₂ nanoparticles with high magnetic emanation for biomedical applications. **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 15, n. 4, 2013.

SUGIMOTO, T.; MATIJEVIC, E. Formation of uniform spherical magnetite particles by crystallization from ferrous hydroxide gels. **Journal of Colloid and Interface Science**, San Diego, v. 74, n. 1, p. 227-243, 1980.

SUN, T. M.; ZHANG, Y. S.; PANG, B.; HYUN, D. C.; YANG, M. X.; XIA, Y. N. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 53, n. 46, p. 12320-12364, 2014.

THANH, N. T. K.; MACLEAN, N.; MAHIDDINE, S. Mechanisms of nucleation and growth of nanoparticles in solution. **Chemical Reviews**, Washington, v. 114, n. 15, p. 7610-7630, 2014.

VARANDA, L. C.; SOUZA, C. G. S. D.; PERECIN, C. J.; MORAES, D. A. D.; QUEIRÓZ, D. F.; NEVES, H. R.; SOUZA JR, J. B.; SILVA, M. F. ALBERS, R. F. SILVA, T. L. Inorganic and organic-inorganic composite nanoparticles with potential biomedical applications: synthesis challenges for enhanced performance. *In*: GRUMEZESCU, V.; GRUMEZESCU, A. M. (ed.). **Materials for biomedical engineering**. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 47-99.

VREELAND, E.; WATT, J.; SCHOBER, G.; HANCE, B.; AUSTIN, M. J.; PRICE, A. D.; FELLOWS, B. D.; MONSON, T. C.; HUDAK, N. S.; MALDONADO-CAMARGO, L.; BOHORQUEZ, A. C.; RINALDI, C.; HUBER, D. L. Enhanced nanoparticle size control by extending LaMer's mechanism. **Chemistry of Materials**, Washington, v. 27, n. 17, p. 6059-6066, 2015.

WANG, L.; HU, L. J.; GAO, S. B.; ZHAO, D. T.; ZHANG, L. Q.; WANG, W. C. Bio-inspired polydopamine-coated clay and its thermo-oxidative stabilization mechanism for styrene butadiene rubber. **RSC Advances**, Cambridge, v. 5, n. 12, p. 9314-9324, 2015.

WANG, W.; JI, X.; NA, H.; SAFI, M.; SMITH, A.; PALUI, G.; PEREZ, J. M.; MATTOUSSI, H. Design of a multi-dopamine-modified polymer ligand optimally suited for interfacing magnetic nanoparticles with biological systems. **Langmuir**, Washington, v. 30, n. 21, p. 6197-6208, 2014.

WARD, M. A.; GEORGIU, T. K. Thermoresponsive polymers for biomedical applications. **Polymers**, Basel, v. 3, n. 3, p. 1215-1242, 2011.

WHITEHEAD, C. B.; OZKAR, S.; FINKE, R. G. LaMer's 1950 model for particle formation of instantaneous nucleation and diffusion-controlled growth: a historical look at the model's origins, assumptions, equations, and underlying sulfur sol formation kinetics data. **Chemistry of Materials**, Washington, v. 31, n. 18, p. 7116-7132, 2019.

WICKI, A.; WITZIGMANN, D.; BALASUBRAMANIAN, V.; HUWYLER, J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 200, p. 138-157, 2015.

WIDDRAT, M.; SCHNECK, E.; REICHEL, V.; BAUMGARTNER, J.; BERTINETTI, L.; HABRAKEN, W.; BENTE, K.; FRATZL, P.; FAIVRE, D. Combined experimental and theoretical approach to the kinetics of magnetite crystal growth from primary particles. **Journal of Physical Chemistry Letters**, Washington, v. 8, n. 6, p. 1132-1136, 2017.

WU, W.; WU, Z. H.; YU, T.; JIANG, C. Z.; KIM, W. S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, Oxon, v. 16, n. 2, p. 43, 2015.

XIONG, W.; PENG, L. X.; CHEN, H. B.; LI, Q. Surface modification of MPEG-b-PCL-based nanoparticles via oxidative self-polymerization of dopamine for malignant melanoma therapy. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 10, p. 2985-2996, 2015.

YOO, D.; LEE, J. H.; SHIN, T. H.; CHEON, J. Theranostic magnetic nanoparticles. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 44, n. 10, p. 863-874, 2011.

YUAN, J.; ARMES, S.; TAKABAYASHI, Y.; PRASSIDES, K.; LEITE, C. A. P.; GALEMBECK, F.; LEWIS, A. L. Synthesis of biocompatible poly[2-(methacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine]-coated magnetite nanoparticles. **Langmuir**, Washington, v. 22, n. 26, p. 10989-10993, 2006.

YUE, Q.; WANG, M. H.; SUN, Z. K.; WANG, C.; WANG, C.; DENG, Y. H.; ZHAO, D. Y. A versatile ethanol-mediated polymerization of dopamine for efficient surface modification and the construction of functional core-shell nanostructures. **Journal of Materials Chemistry B**, Cambridge, v. 1, n. 44, p. 6085-6093, 2013.

ZHANG, Y.; CALDERWOOD, S. K. Autophagy, protein aggregation and hyperthermia: a mini-review. **International Journal of Hyperthermia**, Boston, v. 27, n. 5, p. 409-414, 2011.

ZHANG, Y. X.; LIU, Y. L.; REN, B. P.; ZHANG, D.; XIE, S. W.; CHANG, Y.; YANG, J. T.; WU, J.; XU, L. J.; ZHENG, J. Fundamentals and applications of zwitterionic antifouling polymers. **Journal of Physics D-Applied Physics**, Bristol, v. 52, n. 40, p. 17, 2019.

ZHU, L.; LU, Y.; WANG, Y.; ZHANG, L.; Wang, W. C. Preparation and characterization of dopamine-decorated hydrophilic carbon black. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v. 258, n. 14, p. 5387-5393, 2012.

ZHU, Z. J.; SU, M. Polydopamine nanoparticles for combined chemo- and photothermal cancer therapy. **Nanomaterials**, Basel, v. 7, n. 7, 2017.

Figura Anexa 2 – RMN de CL3NHS.

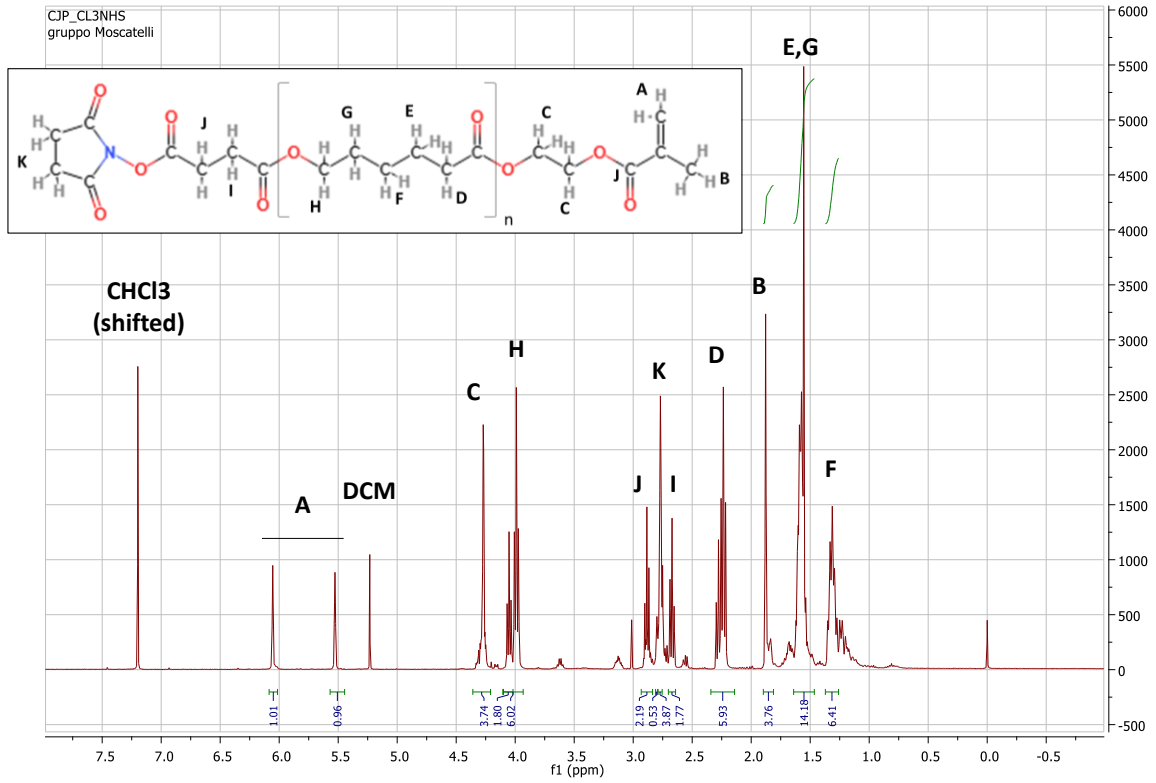
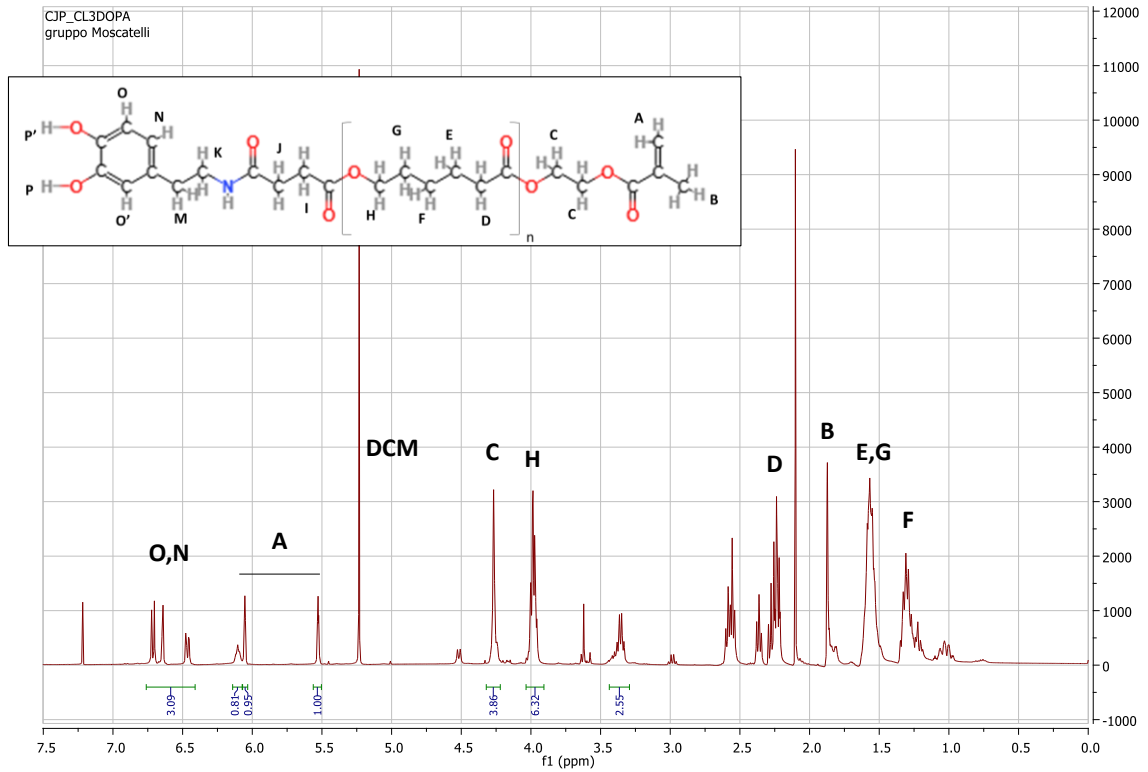


Figura Anexa 3 – RMN de CL3Dopa.



Os resultados dos macromônômeros produzidos por ROP, CL5 e CL7, estão apresentados abaixo, na Figura Anexa 4 e na Figura Anexa 5, respectivamente.

Figura Anexa 4 – RMN de CL5.

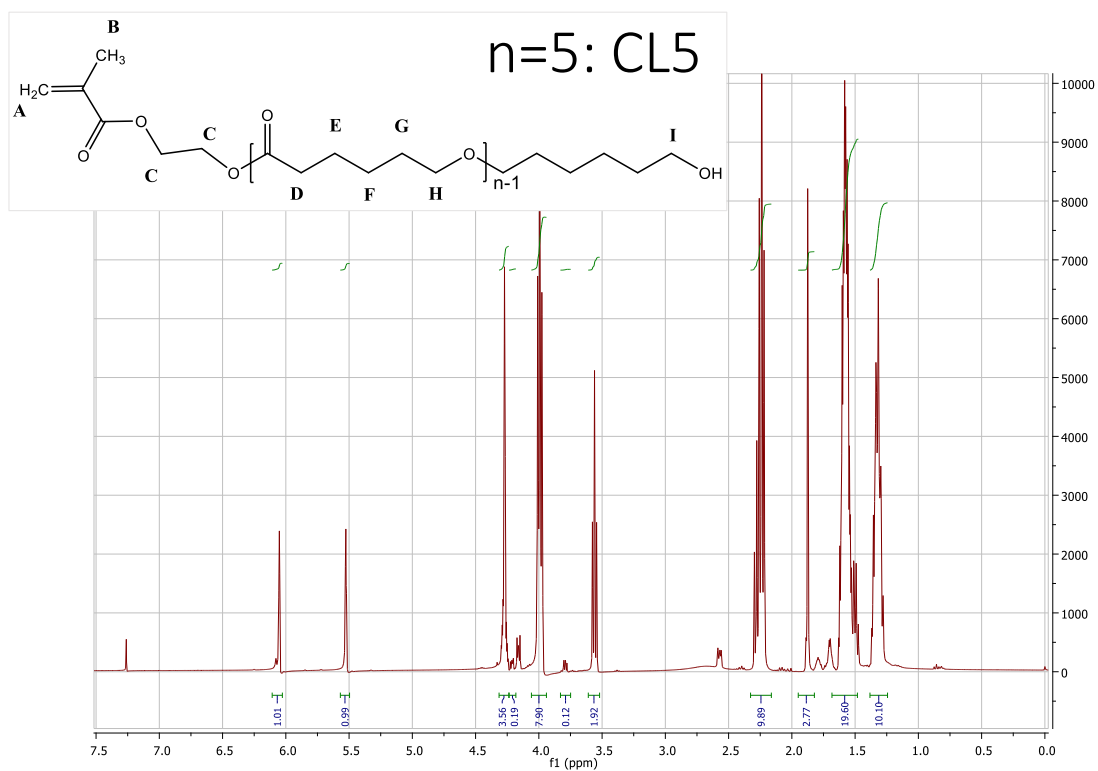
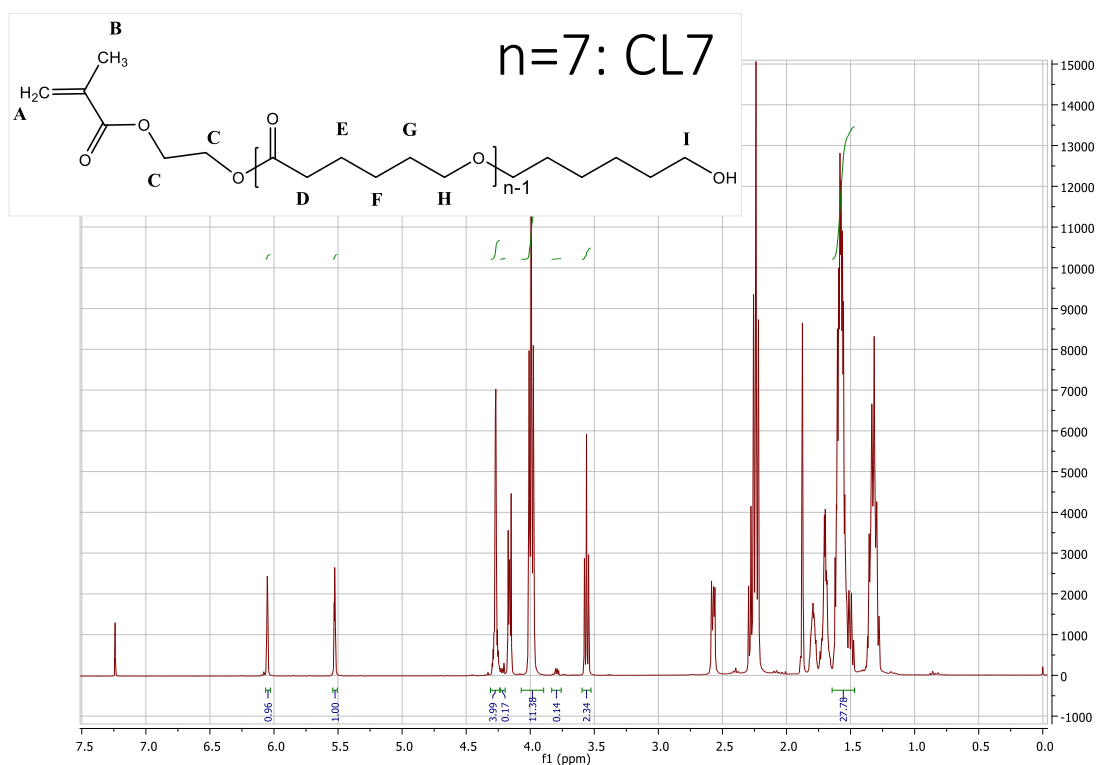


Figura Anexa 5 - RMN de CL7.



Após as etapas análogas às realizadas para a síntese de CL3Dopa, foram obtidos os macromônmeros funcionalizados com dopamina, CL5Dopa e CL7Dopa, com resultados de RMN apresentados abaixo, na Figura Anexa 6 e na Figura Anexa 7, respectivamente.

Figura Anexa 6 - RMN de CL5Dopa.

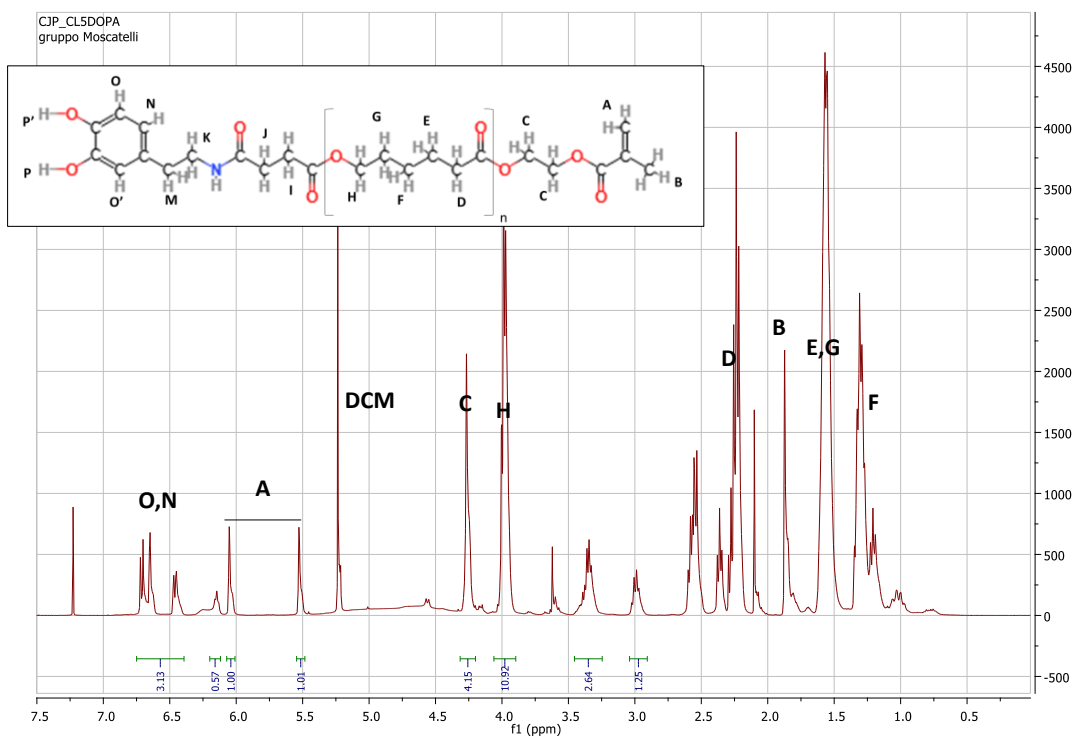


Figura Anexa 7 – RMN de CL7Dopa.

