

Universidade Federal de Ouro Preto

Instituto de Ciências Exatas e Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Química

PPGQUIM

Dissertação

**Síntese, caracterização físico-química,
e avaliação da hematocompatibilidade,
In Vitro, de nanopartículas de magnetita**

Aline Alexandrina Gomes

Ouro Preto
2022



UFOP



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Química



SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, E AVALIAÇÃO DA HEMATOCOMPATIBILIDADE, *IN VITRO*, DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA

Autora: **Aline Alexandrina Gomes**

Orientadora: **Profa. Dra. Ângela Leão Andrade**

Coorientadoras: **Profa. Dra. Thalita Marcolan Valverde e Profa. Dra. Rosana Zacarias Domingues**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Química da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: **Química Analítica**

Ouro Preto

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

G633s Gomes, Aline Alexandrina.

Síntese, caracterização físico-química, e avaliação da hematocompatibilidade, in vitro, de nanopartículas de magnetita. [manuscrito] / Aline Alexandrina Gomes. - 2022.

63 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientadora: Profa. Dra. Ângela Leão Andrade.

Coorientadores: Profa. Dra. Rosana Zacarias Domingues, Profa. Dra. Thalita Marcolan Valverde.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química.

Área de Concentração: Química Analítica.

1. Nanopartículas magnéticas. 2. Terapia de hipertermia. 3. Síntese. 4. Funcionalização. 5. Revestimento. 6. Polímeros orgânicos. I. Andrade, Ângela Leão. II. Domingues, Rosana Zacarias. III. Valverde, Thalita Marcolan. IV. Universidade Federal de Ouro Preto. V. Título.

CDU 543

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline Alexandrina Gomes

Síntese, caracterização físico-química, e avaliação da hematocompatibilidade, in vitro, de nanopartículas de magnetita

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de mestre

Aprovada em 10 de março de 2022

Membros da banca

Dr.^a Ângela Leão Andrade - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Dr. Diego Gomes Rocha - Laboratório Nacional Agropecuário de Minas Gerais
Dr.^a Rosângela Maria Ferreira da Costa e Silva - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Ângela Leão Andrade, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 22/03/2022



Documento assinado eletronicamente por **Angela Leao Andrade, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 29/03/2022, às 11:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0299112** e o código CRC **8D3B2319**.

AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras Profas. Ângela Leão Andrade, Thalita Marcolan Valverde e Rosana Zacarias Domingues pelos ensinamentos, paciência, dedicação, confiança e por terem viabilizado a execução dos meus experimentos fora dos laboratórios da UFOP, em virtude da pandemia.

Aos membros da Comissão Examinadora Profs. Diego Gomes Rocha, Rosangela Maria Ferreira da Costa e Silva, Emanuelli do Nascimento da Silva e Mayara Celle Gonçalves Santos pelas avaliações e contribuições para o trabalho.

Aos professores, coordenação e secretaria do PPGQUIM da UFOP pelos ensinamentos, solicitude, compreensão e paciência em responder meus e-mails.

À equipe do Laboratório de Materiais e Pilhas a Combustível do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, por terem me autorizado a utilizar às instalações para que eu pudesse realizar meus experimentos durante esse período de restrições.

Ao Prof. José Domingos Ardisson pelo empréstimo do equipamento para realização do teste de hipertermia e por ter autorizado a minha entrada no Laboratório de Síntese de Nanoestruturas do CDTN, em período de restrição.

Aos pós-graduandos pela presteza e cordialidade, em especial Daniele Fagundes, Joice Yoko, Karen Bolis e Fernanda Oliveira, do Laboratório de Síntese de Nanoestruturas do CDTN; Eliza Gomes e do Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica; Junnia Alvarenga de Imunologia Celular e Molecular do ICB da UFMG. Obrigada por analisarem minhas amostras, me acompanharem e auxiliarem durante o período que estive no laboratório.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A Renata, Helane, Dhenife, Mayana, Júnia e Gefferson, colegas de pós-graduação, que não pude conhecer pessoalmente ainda, mas que em algum momento me ajudaram, auxiliaram e incentivaram.

Ao Marcos, Priscila, Tatiana, Ana Gabriela e Clayton pela amizade e por se disporem a me ajudar quando eu precisei.

À minha família pelo apoio incondicional e aos amigos pelos momentos de diversão.

A Deus pela vida e bênçãos diárias!

RESUMO

Pesquisas em nanobiotecnologia têm evoluído nos últimos anos. Na área médica, por exemplo, nanopartículas magnéticas têm sido estudadas como agentes de contraste, bioensaios magnéticos, e como carreadoras de fármacos associados à terapia de hipertermia. Sínteses de nanopartículas magnéticas estão sendo feitas com objetivo de obter materiais superparamagnéticos, com formas uniformes, no caso esféricas, potencial magnético e de aquecimento satisfatórios sob campo magnético oscilante, externamente aplicado, e capacidade de adsorver fármacos na sua estrutura para serem usadas como material de transporte para células tumorais. Essas características fazem com que essas nanopartículas magnéticas possam ser classificadas como materiais multimodais. Estudos de hipertermia com nanopartículas magnéticas podem ser usados de forma auxiliar aos tratamentos convencionais (quimioterapia e radioterapia). A finalidade do uso da hipertermia, é diminuir os efeitos colaterais dessas terapias convencionais, já que, a hipertermia consiste em um aumento da temperatura local que pode enfraquecer ou matar as células doentes além de promover a liberação de fármacos diretamente para áreas doentes, potencializando o tratamento. A sensibilidade de células tumorais frente ao tratamento por hipertermia pode ser explicada pelo fato que o tecido tumoral apresenta alterações importantes no microambiente tecidual que prejudica a dissipação do calor. Para que um material possa ser administrado em um organismo vivo, como os materiais usados em hipertermia, é importante avaliar previamente a sua biocompatibilidade por meio de ensaios de biologia celular. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi sintetizar, funcionalizar e revestir nanopartículas magnéticas com polímeros orgânicos a fim de estabilizá-las em soluções aquosas antes do seu uso. Uma análise multivariada foi feita para a obtenção das condições que produzem os menores tamanhos de nanopartículas. A validação do modelo matemático, obtido nessa análise, foi feito pela análise de variância (ANOVA). Caracterizações físico – químicas das partículas sintetizadas e revestidas foram feitas por TEM; HRTEM; Hipertermia; FTIR; DLS; PDI e Potencial Zeta. Adicionalmente, foi realizada uma avaliação biológica por meio do ensaio de hematocompatibilidade *in vitro*.

Palavras-chave: Nanopartículas magnéticas, terapia de hipertermia, síntese, funcionalização, revestimento, polímeros orgânicos.

ABSTRACT

Research in nanobiotechnology has evolved in recent years. In the medical field, for example, magnetic nanoparticles have been studied as contrast agents, magnetic bioassays, and as drug carriers associated with hyperthermia therapy. Syntheses of magnetic nanoparticles are being carried out with the aim of obtaining superparamagnetic materials, with uniform shapes, in this case spherical, satisfactory magnetic and heating potential under an oscillating magnetic field, externally applied, and the ability to adsorb drugs in their structure to be used as transport to tumor cells. These characteristics make these nanoparticles to be classified as multimodal materials. Hyperthermia studies with magnetic nanoparticles can be used to assist conventional treatments (chemotherapy and radiotherapy) in order to reduce the side effects of these therapies, since hyperthermia consists of an increase in local temperature that can weaken or kill cells. patients in addition to promoting the release of drugs directly to diseased areas, enhancing the treatment. The sensitivity of tumor cells to hyperthermia treatment can be explained by the fact that the tumor tissue presents important changes in the tissue microenvironment that impair heat dissipation. In order for a material to be administered to a living organism, such as materials used in hyperthermia, it is important to previously assess its biocompatibility through cell biology assays. Therefore, the objective of this work was to synthesize, functionalize and coat magnetic nanoparticles with organic polymers in order to stabilize them in aqueous solutions before use. A multivariate analysis was performed to obtain the conditions that produce the smallest nanoparticle sizes. The validation of the mathematical model obtained in this analysis was performed by analysis of variance (ANOVA). Physical-chemical characterizations of the synthesized and coated particles were performed by TEM; HRTEM; Hyperthermia; FTIR; DLS; PDI and Zeta Potential. Additionally, a biological evaluation was performed using the in vitro hemato-compatibility assay.

Keywords: Magnetic nanoparticles, hyperthermia therapy, synthesis, functionalization, coating, organic polymers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da célula unitária Fe_3O_4	16
Figura 2: Representação dos mecanismos de relaxamento de Néel e relaxamento Browniano, atuando e nanopartículas superparamagnéticas.	18
Figura 3: Representação do procedimento geral para a injeção endovenosa das nanopartículas magnéticas em suspensão no corpo humano: (a) as partículas são primeiro injetadas em um tumor e, em seguida, (b) um campo magnético alternado aplicado externamente induz a hipertermia.....	21
Figura 4: Comparação da síntese de nanopartículas magnéticas por três rotas diferentes.....	22
Figura 5: Representação dos processos de nucleação e crescimento de nanocristais em função	23
Figura 6: Interação entre hidróxido de tetrametilamônio (TMAOH) e magnetita em solução aquosa: os átomos Fe coordenam-se com água, deixando a superfície do óxido de ferro com grupo hidroxila. Os grupos hidroxila interagem com o grupo $[(CH_3)_4N]^+$ do TMAOH. ²⁰	24
Figura 7: Unidade monomérica do polímero poli(L-co-D,L ácido láctico-co-trimetileno carbonato).....	26
Figura 8: Unidades monoméricas do copolímero PEO-PPO-PEO - Poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno).	26
Figura 9 (modificada): Representação das unidades monoméricas do copolímero em bloco Pluronic (A) e representação da micela (B), com núcleo hidrofílico e parte externa hidrofóbica.....	27
Figura 10 (modificada): Representação da magnetita sintetizada, da magnetita funcionalizada com TMAOH e magnetita revestida com polímero e copolímero, formando o conceito núcleo/casca.	28
Figura 11: Gráficos de diagnóstico, contendo os resíduos das onze sínteses, para análise visual dos resíduos.....	41
Figura 12: Gráficos superfície resposta das sínteses obtidas do Planejamento Experimental. <i>software</i> STATÍSTICA.....	45
Figura 13: Micrografia (esquerda) e histograma (direita) das NPM's funcionalizadas obtidas com a síntese 4.....	47
Figura 14: Imagem de HRTEM das NPM's funcionalizadas.	47
Figura 15: SAD das NPM's	48
Figura 16: Gráfico de hipertermia de suspensão de NPM's revestidas em água.....	49
Figura 17: Gráfico de hipertermia de suspensão de NPM's revestidas em graxa de silicone .	50

Figura 18: Espectro FTIR das amostras: a) magnetita, b) magnetita funcionalizada c) magnetita funcionalizada depois do ultrassom de ponteira, d) magnetita funcionalizada revestida pelo polímero e depois do ultrassom de ponteira.....	52
Figura 19: Distribuição de tamanho hidrodinâmico de nanopartículas da amostra MAG Revestida 0,5 mg. mL ⁻¹ dispersa em água (realizado por triplicata).	53
Figura 20: Fotos das amostras de sangue incubadas em três tempos e após o teste de hipertermia.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes utilizados e respectivas marcas	30
Tabela 2: Equipamentos utilizados nas sínteses das NPM's.....	31
Tabela 3: Planejamento fatorial com as onze sínteses em dois níveis e triplicata no ponto central. As variáveis e suas interações, e o tamanho das NPM's sintetizadas estão representadas abaixo.....	39
Tabela 4: Matrizes usadas para cálculo dos coeficientes	40
Tabela 5: Análise de variância (ANOVA), de acordo com as equações descritas para avaliação do modelo matemático, por meio da definição dos graus de liberdade e valores da SQ e MQ das fontes.....	43
Tabela 6: Média do tamanho hidrodinâmico, PdI e potencial zeta em triplicata das amostras MAG Revestidas.....	53
Tabela 7: Resultados de hematocompatibilidade em sangue em diferentes tempos de incubação e em diferentes concentrações de NPM's no sangue.	56
Tabela 8: Resultados de hematocompatibilidade em sangue em diferentes concentrações de NPM's, após o teste de hipertermia.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
DLS	<i>Dynamic light scatter</i>
FTIR	<i>Fourier transform infrared</i>
HRTEM	<i>High-resolution transmission electron microscopy</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MDS	Método de deslocamento de solvente
NPM's	Nanopartículas magnéticas
PdI	Índice de Polidispersão
PDLLA	Poli (D, L-ácido láctico)
PEO-PPO-PEO	Poli (óxido de etileno) - poli (óxido de etileno) – poli (óxido de propileno)
PLDLA-TMC	Poli (L- co- D, L ácido láctico - co - trimetileno carbonato)
SAD	<i>Selected area electron diffraction</i>
TEM	<i>Transmission electron microscopy</i>
TMAOH	Hidróxido de tetrametilamônio
XRD	<i>X-ray diffraction</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	MAGNETITA	16
3.2	SUPERPARAMAGNETISMO	17
3.3	MOVIMENTO DE NÉEL E MOVIMENTO BROWNIANO	17
3.4	HIPERTERMIA MAGNÉTICA	18
3.4.1	Tipos de aplicações de hipertermia magnética	20
3.5	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	21
3.6	MÉTODO DE COPRECIPITAÇÃO	22
3.7	FUNCIONALIZAÇÃO COM HIDRÓXIDO DE TETRAMETILAMÔNIO	23
3.8	POLÍMEROS	25
3.8.1	PLDLA- co – TMC	25
3.8.2	PEO-PPO-PEO	26
3.9	NANOPRECIPITAÇÃO OU MÉTODO DE DESLOCAMENTO DE SOLVENTE	27
3.9.1	Formação de micelas	28
3.10	CITOTOXICIDADE IN VITRO	29
3.10.1	Ensaio de hematocompatibilidade in vitro ou ensaio de hemólise	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	MATERIAL	30
4.2	MÉTODOS	31
4.2.1	Planejamento fatorial	31
4.2.2	Síntese e funcionalização da magnetita	32
4.2.3	Funcionalização	33
4.2.4	Revestimento da MAG funcionalizada com polímero	33
5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA	35
5.1	TEM	35
5.2	ENSAIOS DE HIPERTERMIA MAGNÉTICA	35
5.3	FTIR	36
5.4	DLS, PdI e Potencial Zeta	36
6	TESTES BIOLÓGICOS	38

6.1	ENSAIO DE HEMÓLISE IN VITRO	38
7	RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
7.1	PLANEJAMENTO FATORIAL.....	39
7.1.1	Validação do modelo matemático por análise de variância (ANOVA)	42
7.1.2	Gráficos de superfície de resposta	44
7.2	TEM	46
7.3	TESTE DE HIPERTERMIA.....	48
7.4	FTIR	50
7.5	DLS	52
8	ENSAIO DE hematocompatibilidade.....	55
9	CONCLUSÃO	57
10	PERSPECTIVAS	58
11	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), órgão auxiliar do Ministério da Saúde no desenvolvimento e coordenação de ações integradas para a prevenção e o controle do câncer no Brasil,¹ o câncer é o principal problema de saúde pública no mundo e já está entre as quatro principais causas de mortes prematuras (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países.²

As células cancerosas são células com mutações exclusivas em genes que regulam o crescimento, o que faz com que se dividam de forma descontrolada. O crescimento desordenado faz com que a rede vascular fique comprometida, resultando no declínio de oxigênio (formando um microambiente hipóxico), com deficiência de nutrientes e acúmulo de substâncias ácidas. O microambiente de uma célula tumoral permite que células imunossupressoras sejam ativadas obtendo escape imunológico, permitindo invasão, metástase e resistência a medicamentos.³

O desenvolvimento de métodos auxiliares para o tratamento do câncer tem como objetivo melhorar a eficácia das terapias já existentes (quimioterapia e radioterapia).⁴ Por exemplo, segundo descrito por Yu e colaboradores (2022),⁵ nanopartículas magnéticas (NPM's) podem ser usadas para carrear quimioterápicos e direcioná-los ao tecido tumoral sem danificar órgãos normais, minimizando os efeitos adversos como: queda de cabelo, náuseas, vômitos e anemia.⁶

A nanotecnologia tem evoluído nas últimas décadas. Na área médica, nanopartículas magnéticas (NPM's) têm sido estudadas como agentes de contraste em ressonância magnética e como carreadoras de fármacos associados a terapia de hipertermia. Esses estudos estão sendo direcionados para auxiliar no tratamento do câncer.^{7,8}

As NPM's podem ser sintetizadas por diferentes técnicas. O que define a escolha da síntese mais adequada são fatores como: tempo de reação da síntese, toxicidade, tamanho das nanopartículas, controle de forma e rendimento. Os métodos de coprecipitação, decomposição térmica, método solvotermal, método de microemulsão, método de sonólise ou sonográfico, método de síntese assistida por micro-ondas, biossíntese, método eletroquímico e método aerossol/ vapor, são exemplos de algumas técnicas para síntese.⁹

Dentre as opções de sínteses de nanopartículas magnéticas, a de coprecipitação se destaca pelos seguintes motivos:

- i) É realizada em meio aquoso;
- ii) O tempo da síntese é curto;
- iii) E há possibilidade de ajustar as condições da reação para controlar as propriedades químicas e magnéticas das nanopartículas.¹⁰

Dentre os trabalhos recentes que utilizaram a síntese de coprecipitação podem ser citados o de Eguía-Eguía e colaboradores (2021)¹¹ e Hayashi e colaboradores (2022)¹² que sintetizaram magnetitas revestidas com (Gd-DTPA, também conhecido como gadopentato dimeglumina), que é um complexo iônico e hidrofílico e polímeros respectivamente, para aplicação futura em ressonância magnética.

Existe uma variedade de NPM's estudadas para aplicações biomédicas, mas a preferência é por partículas de óxido de ferro magnético. A nanoestrutura desse tipo de composto é baseada em um núcleo inorgânico de óxido de ferro biocompatível e com comportamento superparamagnético.^{13,14} Os óxidos de ferro utilizados em aplicações médicas são a magnetita (Fe_3O_4) e a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).^{5,13}

Após a síntese, é necessário manter a estabilidade do colóide (compostos de partículas de tamanhos que variam entre 1 nm e 1 μm dispersas em um solvente cujas moléculas são muito menores em tamanho).¹⁵ Para isso, as nanopartículas sintetizadas devem ser suficientemente pequenas, para evitar a decantação devido à gravidade¹⁶ e funcionalizadas, para que não se aglomerem devido às forças de dipolo magnético e Van der Waals.¹⁷

A funcionalização pode estabilizar as nanopartículas por repulsão estérica ou repulsão eletrostática, mas geralmente, nos estudos, utilizam repulsão estérica.¹⁸ Os funcionalizantes usados para estabilizar as nanopartículas podem ser ligados a grupos $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$ ou $-\text{NH}_2$ para aumentar sua estabilidade e fornecer uma superfície ativa para interagir com certas moléculas.¹¹ Alguns exemplos de estabilizantes são: hidróxido de tetrametilamônio,¹⁹ ácido oleico ou ácido cítrico.²⁰

Após a estabilização com funcionalizante é necessário revestir as nanopartículas para garantir a estabilidade dentro do tecido tumoral.²¹ O revestimento das nanopartículas pode ser feito com polímeros orgânicos como poli- ϵ -caprolactona (PCL), poli(D,L-ácido láctico) (PDLLA) e poli (D, L-láctico-co-ácido glicólico) (PLGA)²², polietilenimina (PEI), poli

(etilenoglicol) (PEG)²³ ou termopolímero orgânico, como por exemplo Poli(L- co- D, L ácido láctico - co - trimetileno carbonato) (PLDLA-TMC).²⁴ Os copolímeros podem ter a base de polietileno glicol ou polivinil álcool²³ ou poli(óxido de etileno) - poli(óxido de etileno) - poli(óxido de propileno) (PEO-PPO-PEO).²⁵ Materiais inorgânicos como sílica ou metais nobres como o ouro também podem ser utilizados para revestimento de NPM's.²⁶

Os revestimentos com polímeros podem ser *in situ* ou pós síntese. O revestimento *in situ* apresenta algumas desvantagens como baixa estabilidade coloidal e dificuldade de controlar a espessura da “casca” do revestimento.⁹ Sendo assim, a opção pelo revestimento pós síntese se torna a mais adequada para o encapsulamento de nanopartículas para uso biomédico.

Os métodos para revestimento com polímeros pós síntese podem ser dividido em dois grupos, conforme descrito por Moro – Huertas e colaboradores (2011).²² Exemplos do primeiro grupo são emulsificação-difusão ou emulsificação deslocamento de solvente (preparação de um emulsionado), emulsificação – evaporação (baseado na formação de partículas por precipitação de polímero ou ligação cruzada). Exemplos do segundo grupo são deslocamento de solvente, preparação de polímeros e técnica de camada por camada. De acordo com a literatura, os dois grupos citados atendem o objetivo de revestir as nanopartículas sintetizadas de forma adequada.²²

O tamanho final das NPM's, após revestimento define suas propriedades magnéticas e seu tempo de circulação na corrente sanguínea.²⁷ O desejável para aplicações *in vivo* são tamanhos acima de 10 nm e abaixo de 200 nm.⁵ Gupta e Gupta (2005)²⁸ descrevem que partículas abaixo de 10 nm são rapidamente removidas através de desobstrução renal. E, de acordo com Caldorera-Moore e colaboradores (2010)²⁹, nanopartículas maiores que 200 nm são facilmente filtradas no baço.

Na síntese de NPM's de óxido de ferro, as diferentes condições produzem diferentes partículas, seja no formato, no tamanho, e na pureza. Dessa forma, a utilização de um planejamento experimental multivariável para analisar o efeito das diferentes variáveis experimentais sobre as propriedades das nanopartículas é desejável.

Alguns trabalhos já utilizaram planejamentos fatoriais fracionários para síntese de NPM's para usos diversos. Como exemplo, Arabi e colaboradores (2016)³⁰ utilizaram o planejamento fatorial fracionário para reduzir o número de experimentos e avaliar os efeitos de 6 variáveis; Zhao e colaboradores (2015)³¹ fizeram uso do planejamento experimental

fracionário ortogonal e da análise de variância (ANOVA) para analisar os efeitos de 6 variáveis e Elmizadeh e colaboradores fizeram uso do planejamento experimental Box-Behnken em 3 níveis e da ANOVA para aferir os efeitos de três variáveis.

A avaliação da qualidade das nanopartículas sintetizadas é feita por caracterizações físico-químicas e é essencial para garantia da qualidade e desenvolvimento seguro e racional de nanomateriais.²⁷ As caracterizações têm como objetivo avaliar, por exemplo, a distribuição de tamanho [pode ser feito por espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *dynamic light scatter*)]; a carga de superfície e estabilidade (analisado por medidas de potencial zeta); a forma e tamanho [para nanopartículas usa-se microscopia eletrônica de transmissão (TEM, do inglês *Transmission electron microscopy*)];²⁷ identificação de minerais {[microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM, *High-resolution transmission electron microscopy*)], [difração de elétrons de área selecionada (SAD, *selected area electron diffraction*)]}; espectroscopia infravermelho com transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier transform infrared*), que fornece evidências da presença de grupos funcionais presentes na estrutura da amostra.³²

Após análise e validação das NPM's pelos métodos físico-químicos, quando o objetivo é empregar o material para uso médico, é importante fazer testes de toxicidade para avaliar potenciais efeitos tóxicos dessas partículas na biologia das células.³³

Neste trabalho foi feito um planejamento fatorial de experimentos para se estabelecer as melhores condições para obtenção de menores tamanhos de nanopartículas, síntese, funcionalização, revestimento, análises físico-químicas e teste de toxicidade *in vitro* de NPM's a base de óxido de ferro. O objetivo é ter um material com boas características físico-químicas para futuros testes biológicos em células.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar, funcionalizar e revestir NPM's. Avaliar a qualidade e toxicidade do material sintetizado através de caracterizações físico-químicas e ensaio biológico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar NPM's pelo método de coprecipitação.
- Escolher as condições de síntese que produzem as NPM's com os menores tamanhos por meio de um planejamento fatorial em dois níveis, com triplicata no ponto central e três variáveis.
- Funcionalizar as NPM's sintetizadas com hidróxido de tetrametilamônio.
- Revestir as NPM's funcionalizadas com polímero, pelo método de deslocamento de solvente.
- Caracterizar, físico-quimicamente, as NPM's funcionalizadas e revestidas por técnicas físico-químicas tais como:
 - Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET);
 - Microscópio Eletrônico de Transmissão de Alta Resolução (HRTEM);
 - Hipertermia;
 - Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR);
 - Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS);
 - Índice de Polidispersão (PDI);
 - Potencial Zeta
- Ensaio de Citotoxicidade.
 - Ensaio de hematocompatibilidade *in vitro*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MAGNETITA

Magnetita (Fe_3O_4) é um mineral de cor preta metálica e brilho lustroso. É da classe dos óxidos metálicos magnéticos, conhecida por ser um ímã natural. É também chamada de ferrita de ferro.³⁴ Sua estrutura é composta por ferro em dois estados de oxidação, Fe^{2+} e Fe^{3+} , sendo, por isso, classificada como um óxido de ferro misto, FeO e Fe_2O_3 .^{9,35}

A magnetita possui uma estrutura cristalina cúbica do tipo espinélio invertido. Em sua célula unitária, os íons Fe^{2+} estão depositados nos sítios octaédricos e os íons Fe^{3+} estão divididos, metade nos sítios octaédricos (ou sítio A) e a outra metade nos sítios tetraédricos (ou sítio B).^{9,35} A figura 1 ilustra a estrutura cristalina da magnetita que favorece o seu uso como material adsorvedor, porque em meio aquoso possui espaço entre as camadas hidratadas e planos com cargas superficiais que tendem a atrair e fixar certos elementos carregados positiva e negativamente, conforme descrito por Leal (2006).³⁴

A miniaturização da magnetita para tamanhos nanométricos (nm), pode ser feita em laboratório a partir de uma síntese simples, com uma solução contendo íons férricos, sulfito e NH_4OH .³⁶ O tamanho das magnetitas obtidas em laboratório, as propriedades magnéticas, a não toxicidade e a biocompatibilidade³⁷ fazem com que esse material possa ser utilizado em aplicações biomédicas como agente de contraste magnético, em hipertermia e para liberação de fármacos.^{9,38}

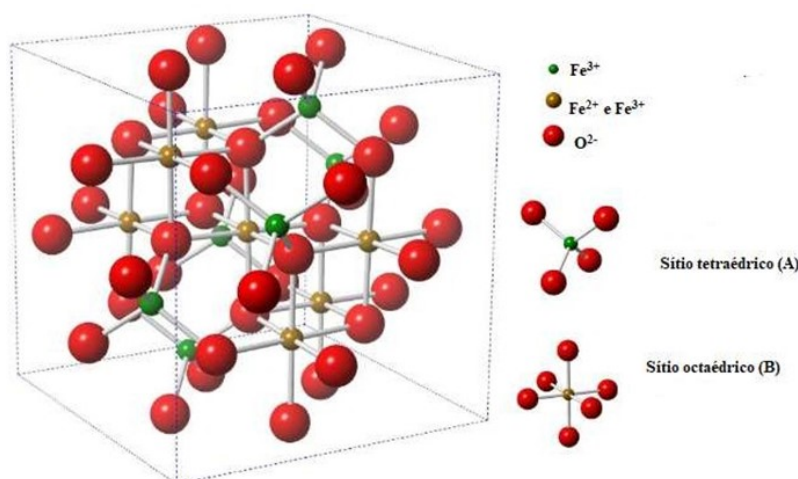


Figura 1: Representação da célula unitária Fe_3O_4
Fonte: Galvão e colaboradores (2016)³⁹

3.2 SUPERPARAMAGNETISMO

O superparamagnetismo é um comportamento próprio de nanopartículas ferromagnéticas⁴⁰ que apresentam monodomínio magnético ou domínio único abaixo do diâmetro crítico de 15 nanômetros.^{9,28}

De acordo com Périgo e colaboradores (2015),⁴¹ Frenkel e Dorfman foram os primeiros pesquisadores a prever, em 1930, que uma partícula de material ferromagnético abaixo de um diâmetro crítico consistia em um único domínio magnético. As nanopartículas de monodomínio ao serem submetidas a qualquer campo magnético vão manter um estado de magnetização uniforme (ou seja, todos os momentos magnéticos dentro das partículas apontarão para o mesmo campo magnético). Quando o campo magnético for retirado não haverá magnetização dos grãos com a movimentação aleatória dos momentos magnéticos. Tais descrições são características do superparamagnetismo.

3.3 MOVIMENTO DE NÉEL E MOVIMENTO BROWNIANO

As NPM's ao serem submetidas a um campo magnético em meio líquido, se alinham, quase que imediatamente, sofrendo rotação física, alinhando os seus momentos magnéticos ao campo, devido ao fenômeno conhecido como mecanismo de relaxação Browniano. Ao mesmo tempo, elas sofrem rotação dos seus momentos magnéticos, dentro dos cristais, em uma determinada direção, no mecanismo conhecido como relaxação de Néel. Esses mecanismos estão representados na figura 2 e são responsáveis por aquecer as NPM's quando sujeitas a um campo magnético oscilante.^{20,42}

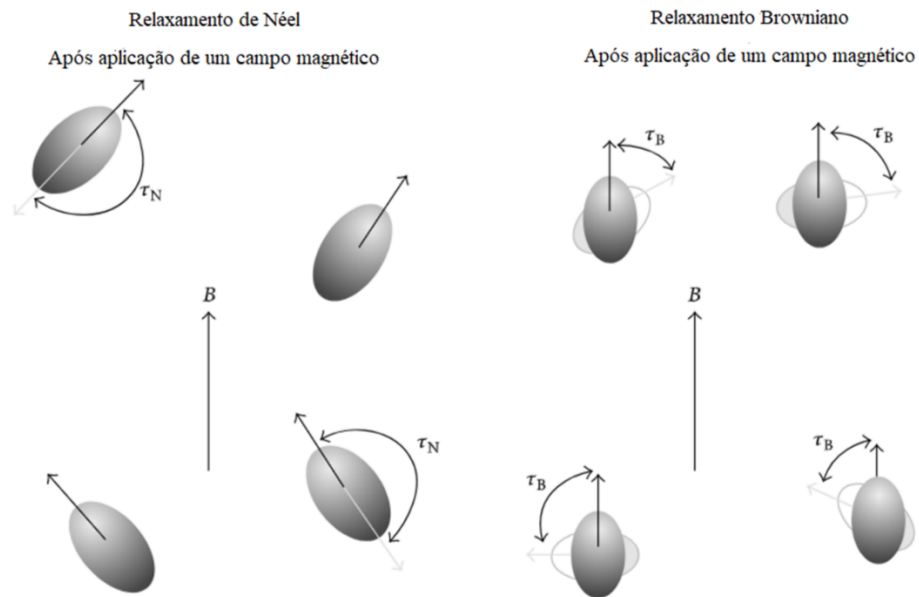


Figura 2: Representação dos mecanismos de relaxamento de Néel e relaxamento Browniano, atuando em nanopartículas superparamagnéticas.

Fonte: Laurent e colaboradores (2008)²⁰

Quando o campo magnético externo é retirado, as nanopartículas superparamagnéticas não apresentam histerese magnética, ou seja, perdem sua magnetização total na forma de calor^{39,40} e passam a se comportar como um material paramagnético^{39,43} o que também é importante para evitar aglomeração, e potencial embolização dos vasos capilares.⁴⁴

3.4 HIPERTERMIA MAGNÉTICA

Kumar e Mohammad (2011),⁴⁵ descrevem o significado etimológico da palavra “hipertermia” como geração de calor e, em relação à terapia do câncer, o termo é usado para indicar o tratamento baseado na geração de calor no local do tumor.

Relatos sobre terapias que mencionavam ou faziam uso do calor no corpo humano para combater enfermidades é antigo. Uma menção ao termo hipertermia foi feita no papiro cirúrgico de Edwin Smith, em 5000 a.C..⁴⁶ Os indianos Charak Samhita e Sushrut Samhita, em 3000 a.C., também mencionaram a hipertermia como método terapêutico.⁴⁷

Hipócrates (460–370 a.C.) cita, em um dos seus aforismos, a importância do calor para a cura das doenças: "*Quae medicamenta non sanat; ferrum sanat. Quae ferrum non sanat; Ignis sanat. Quae vero ignis non sanat; insanabilia reportari oportet.*"⁴⁸ (As doenças que os

medicamentos não curam, a faca cura; aquelas que a faca não pode curar, curas com o fogo; e aquelas que o fogo não pode curar devem ser consideradas totalmente incuráveis).⁴⁸

Os estudos e pesquisas sobre o uso de calor para tratamento de doenças continuaram sendo feitos ao longo dos séculos, como por exemplo no artigo publicado por Gilchrist e colaboradores,⁴⁹ em 1957, que reportava um alerta baseado em estudos com a injeção de corpos metálicos e o aquecimento controlado em tecidos, para pasteurizar nódulos que continham células cancerosas.

Em 1975 foi realizado, em Washington, a primeira conferência internacional sobre oncologia hipertérmica, despertando o interesse mundial pela técnica.⁵⁰ Já nas décadas de 1980 e 1990 houve uma diminuição do interesse devido a resultados não satisfatórios.⁵⁰ Os estudos retornaram no início deste século quando novos equipamentos tornaram a técnica mais segura e eficaz, e a hipertermia retornou promissora para auxiliar na terapia do câncer.⁴⁶

Segundo Datta (2015)⁴⁶, Zee e colaboradores (2008)⁵⁰, a hipertermia é obtida com a exposição dos tecidos a fontes de calor condutor ou radiação não ionizante (por exemplo, campos eletromagnéticos ou ultrassônicos). Spirou e colaboradores (2018)⁵¹ explicam que quando o tecido é aquecido externamente, os vasos se dilatam e o fluxo sanguíneo é aumentado a fim de resfriar a região. Nos tumores, porém, os vasos, morfológica e funcionalmente primitivos, são incapazes de fazer isso, de modo que o tumor seja seletivamente aquecido em relação ao tecido normal.

A temperatura adequada para aplicação da hipertermia é entre de 39° a 45° C. Temperaturas mais altas são usadas para ablação térmica.⁵⁰ A hipertermia magnética ao ser administrada em conjunto com outras terapias afetam a sensibilidade do tumor e potencializam o efeito dos medicamentos da quimioterapia e das radiações na radioterapia.^{50,46,52,53,54}

A temperatura de aquecimento causada pelo método de hipertermia é específica para cada região do corpo. Conforme relatado em estudos experimentais, a maioria dos tecidos normais não são danificados se a temperatura não exceder 43 °C, mesmo se o tratamento durar mais que 1 hora. Apenas os tecidos nervoso e gastrointestinal são mais sensíveis.^{50,55}

A toxicidade da hipertermia no corpo de quem se submete a esse tratamento depende, além da temperatura, da condição geral do paciente, condição dos sistemas de órgãos e das condições fisiológicas durante o tratamento. Durante a aplicação de hipertermia local, por

exemplo, pode ocorrer queimadura de pele em algumas pessoas (25%). Já no tratamento hipertérmico de tumores profundos, apesar da pele ser extensivamente resfriada, pode ocorrer queimadura de gorduras subcutâneas ou tecido muscular. Entretanto, geralmente esses efeitos não são percebidos pelos pacientes.⁵⁰

3.4.1 Tipos de aplicações de hipertermia magnética

A aplicação da hipertermia pode ser dividida em: local, de perfusão e de corpo inteiro.^{50,52}

A hipertermia local tem como objetivo aumentar a temperatura do tecido tumoral sem atingir o tecido saudável, podendo ser aplicada de forma invasiva ou externa.^{47,52} A hipertermia local invasiva é feita por métodos intraluminais ou intersticiais,^{50,52} com aplicadores que são implantados dentro do tumor. Esse método é recomendado para tumores com tamanhos menores que cinco centímetros e em locais que a aplicação seja viável como, cabeça, pescoço e próstata.⁵²

A aplicação local externa pode ser dividida em superficial e profunda. Na aplicação local superficial, os tumores superficiais são aquecidos por meio de antenas ou aplicadores que emitem principalmente micro-ondas ou ondas de rádio colocadas em suas superfícies, com a ajuda de um meio de contato, como uma bolsa de água, por exemplo. Na aplicação externa profunda o aquecimento é feito ao redor da parte do corpo em que o tumor está localizado. A parte que será tratada, do paciente, fica dentro de bobinas de corrente alternada.⁵²

A hipertermia de perfusão é aplicada em membros inferiores isolados do corpo. A técnica de corpo inteiro é usada em carcinomas com metástases. Esse último procedimento é feito com sedação do paciente.⁵²

As NPM's podem ser usadas de forma direta, invasiva, no tecido tumoral, por aplicação endovenosa,⁴⁸ conforme demonstrado na figura 3. Após injeção, as NPM's são guiadas por um campo magnético externo ao tecido tumoral, e aquecidas com campo magnético alternado,^{37,56} aquecendo principalmente as células doentes.⁴⁶

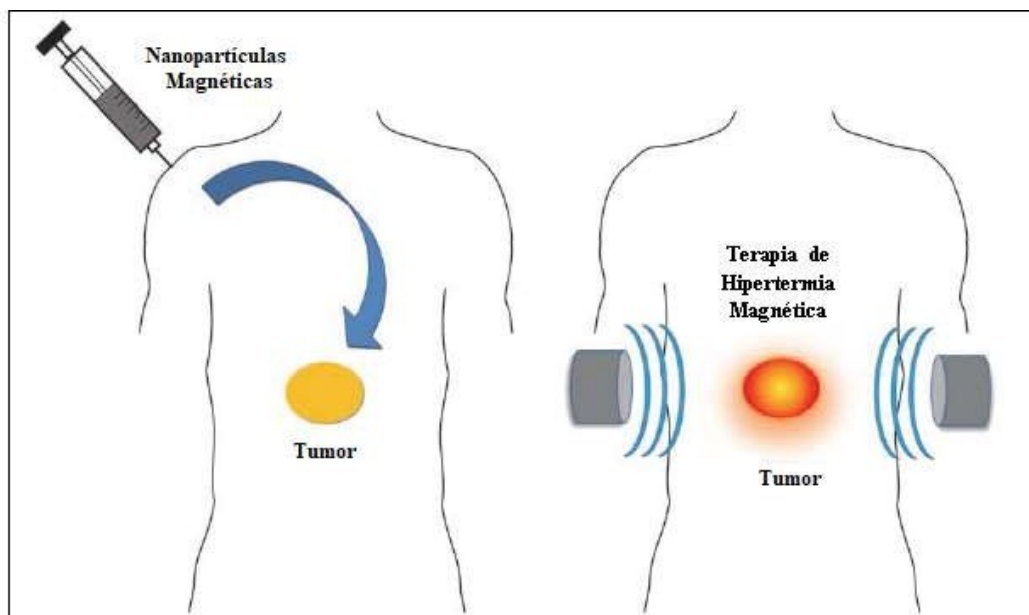


Figura 3: Representação do procedimento geral para a injeção endovenosa das nanopartículas magnéticas em suspensão no corpo humano: (a) as partículas são primeiro injetadas em um tumor e, em seguida, (b) um campo magnético alternado aplicado externamente induz a hipertermia.

Fonte: Andrade e colaboradores 2011.³⁷

A técnica de hipertermia apresenta boas possibilidades de ser usada de forma auxiliar em conjunto com a quimioterapia e a radioterapia no tratamento do câncer, mas ainda são necessários mais estudos para resolução de algumas questões críticas, como uma forma segura de carrear as NPM's na área tumoral e o controle do aquecimento, de modo que não danifiquem as células saudáveis.^{9,50,52}

3.5 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

A síntese das nanopartículas para fins biomédicos é uma etapa muito importante, e para alcançar as propriedades esperadas é preciso controle das características físico-químicas das mesmas, visando a estabilidade, biocompatibilidade, possibilidade de funcionalização da sua superfície com biomoléculas de interesse, e perda da magnetização após a remoção do campo magnético.^{10,44}

As técnicas de síntese de nanopartículas de óxido de ferro podem ser físicas, químicas ou biológicas. Os métodos físicos têm como fator limitante o controle do tamanho das partículas.²⁶ Os métodos químicos são simples, eficientes, e o tamanho, a composição, e a

forma das nanopartículas podem ser modificados, dependendo das condições reacionais.²⁸ Os métodos biológicos são seguros, econômicos e sustentáveis, mas a cultura de micróbios é demorada e é difícil controlar a distribuição de tamanho, forma e cristalinidade das nanopartículas.⁵⁷

Ali e colaboradores (2016)²⁶ descreveram e representaram em gráficos (Figura 4) estudos comparativos de métodos de preparação de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas. Esses estudos mostraram que 90% delas são preparadas por métodos químicos; as rotas dos métodos físicos representam 8%, com os 2% restantes sendo métodos biológicos. Dentre os métodos químicos que apresentam baixo custo e alto rendimento, o de coprecipitação é o mais utilizado por ser simples e eficiente.^{12,17,26}

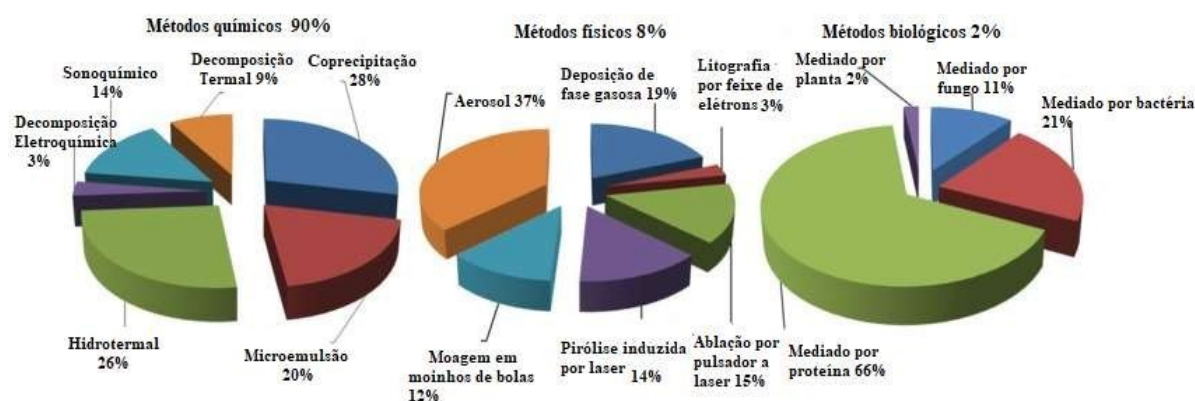


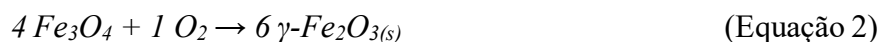
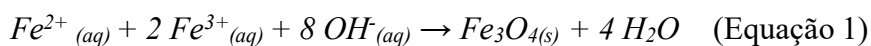
Figura 4: Comparação da síntese de nanopartículas magnéticas por três rotas diferentes.
Fonte: Ali e colaboradores; 2016.²⁶

3.6 MÉTODO DE COPRECIPITAÇÃO

A primeira síntese controlada de NPM's usando precipitação alcalina de FeCl_3 e FeCl_2 foi realizada por Massart, em 1987.^{26,58} As partículas de magnetita (Fe_3O_4) sintetizadas eram aproximadamente esféricas e seu diâmetro, de 8 nm, foi medido pela equação de Scherrer, a partir dos difratogramas de raios X.^{26,57}

As magnetitas são preparadas por uma mistura estequiométrica, 1:2, de sais ferrosos e férricos.²⁰

A reação para precipitação da magnetita (equação 1) ocorre em $\text{pH} > 8$, em um ambiente de preferência anaeróbio, para que não ocorra a oxidação da magnetita em maghemita - $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3(\text{s})$ - (equação 2).²⁰



De acordo com Salabas e colaboradores (2007)¹⁷, e Mello e colaboradores (2019),⁴² as características físicas das NPM's (forma, tamanho e composição) depende dos precursores que serão usados na síntese. Por exemplo: cloretos, sulfatos, nitratos, e a razão Fe^{2+} e Fe^{3+} , além das variáveis tempo de reação, pH, temperatura e outras.

A síntese por coprecipitação se divide em duas etapas, e pode ser melhor visualizada pelo Diagrama de La Mer (Figura 5).

A primeira etapa é a nucleação (fator limitante). Ocorre em um tempo curto, quando a concentração dos íons atinge o valor crítico de supersaturação e os núcleos são todos formados ao mesmo tempo. A segunda etapa, a de crescimento das nanopartículas, ocorre sem nucleação adicional para evitar formação de nanopartículas polidispersas. A diminuição da concentração é devido ao crescimento das partículas por difusão.^{20,26}

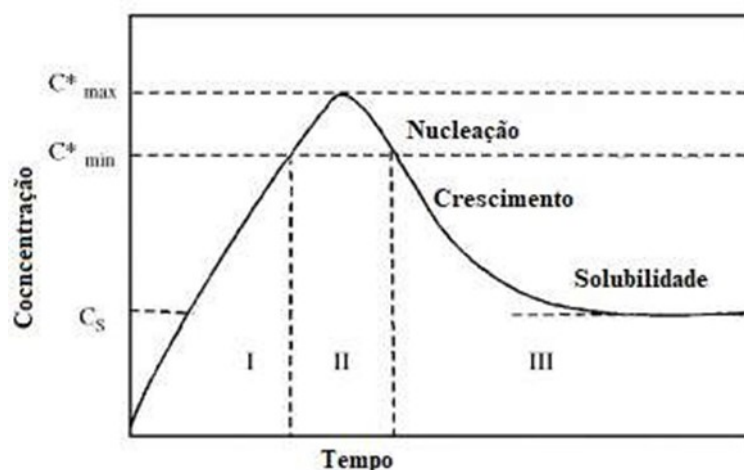


Figura 5: Representação dos processos de nucleação e crescimento de nanocristais em função do tempo de reação e concentração de átomos precursores pelo diagrama de La Mer.

Fonte: Destrée e Nagy; 2007⁵⁹

3.7 FUNCIONALIZAÇÃO COM HIDRÓXIDO DE TETRAMETILAMÔNIO

Após a síntese, as nanopartículas de magnetita formadas tendem a se agregar em grandes aglomerados devido às interações entre as partículas.^{26,28} Os aglomerados formados exibem atração dipolar anisotrópica e, assim, perdem as propriedades específicas (magnetização) associadas ao pequeno tamanho.^{41,60}

Para minimizar a energia superficial da partícula e evitar o processo de aglomeração e a oxidação da magnetita, pode-se estabilizar a suspensão coloidal com um funcionalizante que favoreça sua dispersão, aumentando também a eficiência de encapsulamento e estabilidade coloidal.⁶¹

O hidróxido de tetrametilamônio (TMAOH) é um desses compostos que é usado para funcionalizar as nanopartículas de magnetita, formando um ferrofluido⁶¹ (suspensão coloidal formado por nanopartículas suspensas em um líquido em estado monofásico, ou seja, sem sedimentação ou agregação).⁴¹

As cargas negativas de hidroxila (OH^-), ligadas a superfície da magnetita, em água, atuam como sítios de funcionalização³⁹ atraindo os cátions, $[(\text{CH}_3)_4\text{N}]^+$, do TMAOH. A repulsão entre as partículas ligadas ao TMAOH ocorre por estabilização estérica (Figura 6).⁶²

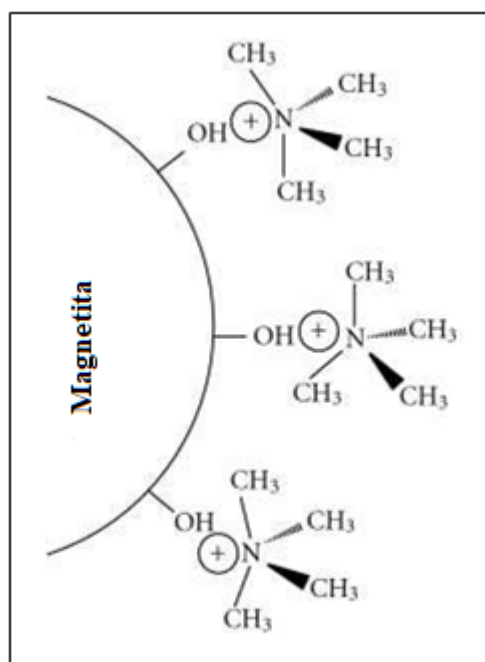


Figura 6: Interação entre hidróxido de tetrametilamônio (TMAOH) e magnetita em solução aquosa: os átomos Fe coordenam-se com água, deixando a superfície do óxido de ferro com grupo hidroxila. Os grupos hidroxila interagem com o grupo $[(\text{CH}_3)_4\text{N}]^+$ do TMAOH.²⁰

Fonte: ANDRADE e colaboradores; 2012.⁴¹

3.8 POLÍMEROS

Nanopartículas de magnetita são extremamente reativas, aglomerando e oxidando facilmente.²⁸ Sendo assim, seu revestimento é necessário para uso biomédico porque, conforme descrito por Andrade e colaboradores (2020):⁶³

- (i) previne alterações químicas em suas superfícies;
- (ii) aumenta sua capacidade de dispersão no meio líquido;
- (iii) previne qualquer eventual toxicidade para o órgão hospedeiro do corpo humano e;
- (iv) permite ancorar princípios farmacológicos, como uma etapa essencial para preparar o composto hipertérmico para ganhar eficiência terapêutica.

O revestimento pode ser orgânico, inorgânico ou uma mistura dos dois. O ideal é que o material usado tenha uma boa afinidade com o núcleo de óxido de ferro, não modifique suas propriedades magnéticas e proporcione um revestimento fino em relação ao tamanho da partícula.¹⁰ Nesse trabalho, nanopartículas de magnetita foram revestidas por um polímero e copolímero orgânicos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA).^{27,64}

3.8.1 PLDLA- co – TMC

O PLDLA-co-TMC é um polímero sintético, láctico e sem fontes petroquímicas.^{24,65} É uma molécula quiral com duas formas opticamente ativas (ácido l -lático e ácido d -lático); a polimerização desses monômeros leva à formação de dois tipos diferentes de PLA: poli(l -ácido lático) e o outro é o poli(l - co - d , l -ácido lático) polímero (PLDLA).⁶⁵

O PLDLA pertence a classe dos poliésteres e possui ligações éster na sua cadeia principal, o que o torna propenso a degradação por hidrólise, conforme descrito por Komatsu e colaboradores (2019).⁶⁵ Sendo assim, para aumentar a tenacidade e flexibilidade do PLDLA, o carbonato de trimetileno (TMC), que é um elastômero alifático, foi incorporado a estrutura desse polímero, formando o PLDLA-co-TMC (Figura 7).⁶⁵

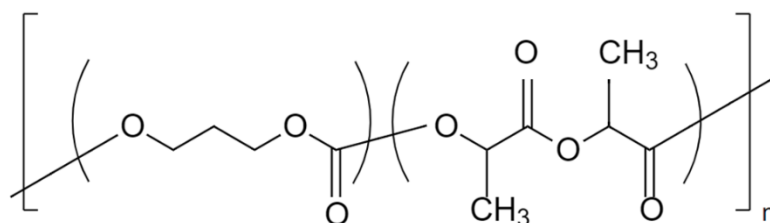


Figura 7: Unidade monomérica do polímero poli(L-co-D,L ácido láctico-co-trimetileno carbonato).

Fonte: Machado, V.O; (2018)⁶²

Motta e colaboradores (2011)²⁴ e Martins e colaboradores (2014)⁶⁶ citam outra característica importante que faz com que o PLDLA-co-TMC seja um material de revestimento ideal para as nanopartículas magnéticas: possuem uma estrutura semicristalina e amorfa. Tais qualidades facilitam a remoção dos fragmentos remanescentes do material do local de implantação impedindo reações inflamatórias, o que faz desse polímero biodegradável e biocompatível.

3.8.2 PEO-PPO-PEO

O poli (óxido de etileno)-poli (óxido de propileno)-poli (óxido de etileno) são copolímeros sintéticos, em triblocos (PEO-PPO-PEO), não iônicos,⁶⁷ também conhecidos como poloxâmeros ou comercialmente como Pluronic (Figura 8).²⁵

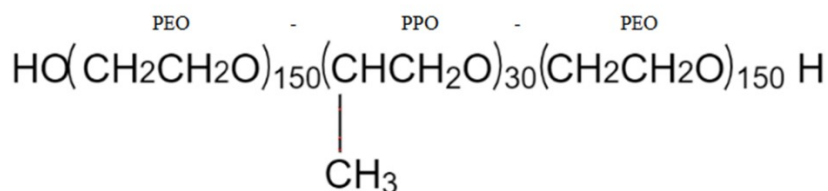


Figura 8: Unidades monoméricas do copolímero PEO-PPO-PEO - Poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno).

Fonte: Machado, V.O; 2018⁶²

O PEO-PPO-PEO tem como característica ser estabilizante²² anfifílico, ou seja, interage com superfícies hidrofóbicas e membranas biológicas e se auto monta em micelas, quando em soluções aquosas. O núcleo hidrofóbico (bloco PPO) encapsula os reagentes terapêuticos e a casca hidrofílica (bloco PEO), garante a dispersividade das micelas diminuindo a interação dos medicamentos com células e proteínas do corpo (Figura 9).²⁵

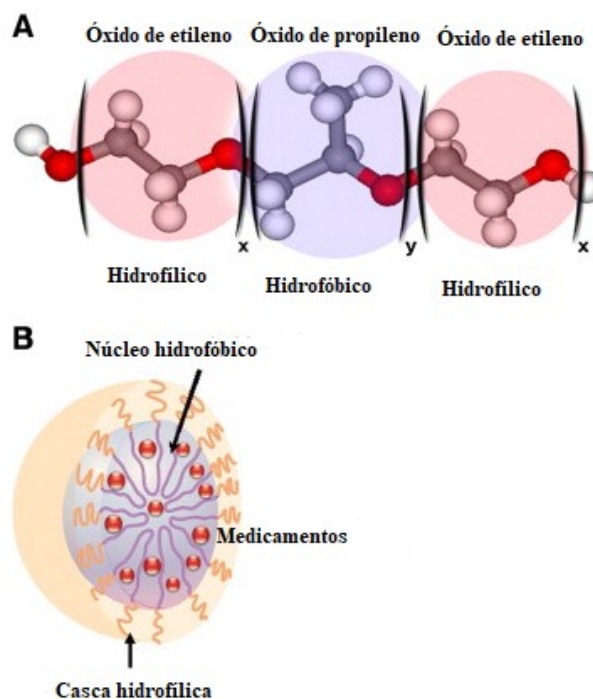


Figura 9 (modificada): Representação das unidades monoméricas do copolímero em bloco Pluronic (A) e representação da micela (B), com núcleo hidrofílico e parte externa hidrofóbica.

Fonte: Batrakov e Kabanov; 2008.²⁵

Outras características do PEO-PPO-PEO são: alteram as funções celulares (respiração mitocondrial, síntese de ATP, atividade de transporte de medicamentos), causam sensibilização em células tumorais e melhoram o transporte de medicamentos.^{25,68}

3.9 NANOPRECIPITAÇÃO OU MÉTODO DE DESLOCAMENTO DE SOLVENTE

O método de nanoprecipitação, ou método de deslocamento de solvente (MDS), foi desenvolvido pela primeira vez por Fessi e colaboradores, no final da década de 1980.⁶⁹ Para o método são preparadas uma fase orgânica e uma fase aquosa. A fase orgânica é composta por polímero e fármaco (se for necessário) dissolvidos em solventes orgânicos voláteis e miscíveis em água. A fase orgânica é emulsionada (gota a gota) na fase aquosa que contém copolímero, água e magnetita diluída.²²

Na escolha dos solventes orgânicos, é importante lembrar que ele deve ser miscível em água, por isso, acetona, tetra-hidrofurano, acetonitrila, metanol, etanol, isopropanol, lactato de etila, dimetilsulfóxido e dimetilformamida têm sido utilizados para a preparação de partículas pelo método de deslocamento de solvente.²²

Para esse trabalho o método de deslocamento de solvente foi escolhido por ser simples, eficiente, ter menor consumo de energia, de tempo e de água. Os solventes utilizados foram acetona e metanol, porque podem ser facilmente removidos por evaporação e são miscíveis em água.²²

3.9.1 Formação de micelas

Franzol e Rezende (2015)⁶⁷ descreveram que ao gotear a fase orgânica na fase aquosa, a gotícula formada por moléculas anfipáticas (possuem características polares e apolares), se organizam em meio disperso aquoso da seguinte forma:

- (i) a fase orgânica é “quebrada” na fase aquosa que está sob agitação e o polímero fica “retido” na fase aquosa;
- (ii) a parte polar do copolímero possui maior afinidade com a água, fica na fase externa;
- (iii) a parte apolar do copolímero fica na fase interna da gotícula se ligando ao polímero por ligação covalente;
- (iv) a fusão da fase aquosa com a fase orgânica acontece com a união de uma ou mais parcelas de uma fase, para a formação de uma única parte;
- (v) o copolímero PEO-PPO-PEO, cadeia longa, atua como estabilizador estérico e que favorece formação de partículas com menores diâmetros.

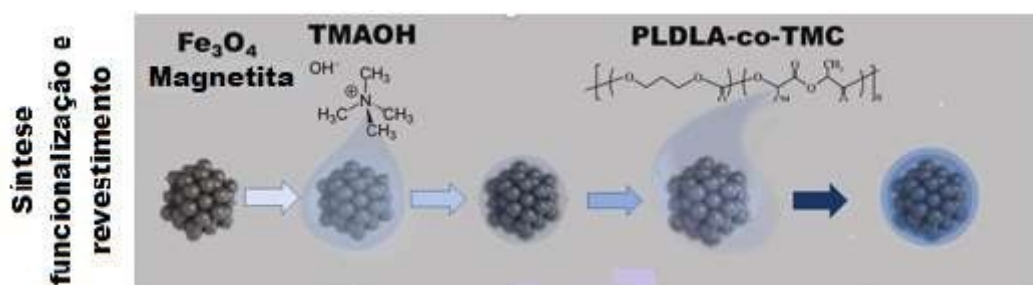


Figura 10 (modificada): Representação da magnetita sintetizada, da magnetita funcionalizada com TMAOH e magnetita revestida com polímero e copolímero, formando o conceito núcleo/casca.

Fonte: de Oliveira e colaboradores; 2021.³²

O método de deslocamento de solvente permite que as magnetitas funcionalizadas sejam encapsuladas por polímeros multifuncionais com eficiência, formando uma casca polimérica (conceito núcleo/casca), conforme demonstrado na figura 10.³²

3.10 CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

A experiência atual indica que um material considerado não tóxico *in vitro*, será um ensaio *in vivo* não tóxico. Por isso, e pela falta de regulamentação em relação à avaliação físico-química e biológica de NPM's, são necessárias análises extensas e cuidadosas de citotoxicidade, em particular para a biomedicina. Uma das questões mais importantes que influenciam a toxicidade das NPM's é a química de superfície. É necessário gerenciar o risco de danos, o efeito terapêutico e os efeitos colaterais desconhecidos em células normais, e em células com câncer, implementando um processo sistemático para identificar possíveis danos relacionados à exposição aos nanomateriais recentemente desenvolvidos.⁷⁰ Neste trabalho, a citotoxicidade foi investigada pelo ensaio de hemólise.

3.10.1 Ensaio de hematocompatibilidade *in vitro* ou ensaio de hemólise

O termo “hemólise” é comumente usado para descrever danos aos glóbulos vermelhos (eritrócitos) que levam ao vazamento da proteína hemoglobina, contendo ferro, na corrente sanguínea, e condições potencialmente fatais, como anemia. Uma nanopartícula ao ser injetada por via intravenosa interage com os glóbulos vermelhos antes do encontro com células imunes. Essa situação pode causar de risco ao paciente, tornando o exame da atividade hemolítica importante para caracterização pré clínica conforme descreveu Dobrovolskaia e colaboradores (2008).⁷¹

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Para a preparação dos nanossistemas foram empregados os reagentes e equipamentos abaixo (Tabelas 1 e 2) relacionados. Água Milli-Q ($18\mu\text{S cm}^{-1}$) foi usada em todos os experimentos.

Tabela 1: Reagentes utilizados e respectivas marcas

REAGENTES	FÓRMULA MOLECULAR	MARCAS
Cloreto de ferro (III) hexahidratado	$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	VETEC
Sulfito de sódio anidro	Na_2SO_3	VETEC
Hidróxido de amônio	NH_4OH	Sigma Aldrich
Hidróxido de tetrametilamônio penta hidratado (TMAOH)	$(\text{CH}_3)_4\text{NOH} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	VETEC
Ácido clorídrico	HCl	Neon
PEO-PPO-PEO	-	Sigma Aldrich
Metanol	CH_3OH	Tedia
Acetona	CH_3COCH_3	Tedia
PLDLA-co-TMC	-	Sigma Aldrich
Graxa de silicone	-	Synth
Filtro PTFE, 22 μm	-	Chromafil
Peneira estéril, 70 μm	-	EASYstrainer
PBS – solução salina	-	Gibco

Tabela 2: Equipamentos utilizados nas sínteses das NPM's

EQUIPAMENTO	MODELO	MARCA
Agitador Magnético	MA 239	Marconi
Balança Analítica	Marte AUW 220	Unibloc
Centrífuga (4000 RPM)	80 – 2B	Centribio
Compressor Aspirador	Diapump	FANEM
Desruptor de Célula	Ultrasônico	Unique
Incubadora	MA 410	Marconi
Lavadora Ultrassônica	Cleanner	Unique
Microscópio Eletrônico de Transmissão	Tecnai G2- 20	FEI SuperTwin 200
Hipertermia	Easy Heat	Ambrell
Espectrofotômetro na região do infravermelho	Frontier	Perkin Elmer
Zetasizer	Nano Series	Malvern

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Planejamento fatorial

O planejamento fatorial fracionário foi feito em dois níveis (valor máximo e valor mínimo), três variáveis e triplicata no ponto central, totalizando 11 sínteses. A validação do modelo matemático foi feito pela ANOVA.

O objetivo do planejamento foi verificar quais são os efeitos que inteferem para obter os menores tamanhos de NPM's.

As variáveis estudadas foram:

- i) tempo de adição da solução de NH_4OH (o tempo foi definido a partir do tempo de escoamento da solução na bureta na sua vazão mínima, intermediária e máxima);^{18,19}
- ii) velocidade de agitação da síntese (foram definidas a agitação mínima, intermediária e máxima do painel do equipamento);^{18,22}
- iii) temperatura após a síntese do óxido de ferro (a temperatura da síntese foi definida com base na literatura).^{9,17,19}

Após a medida das partículas sintetizadas foi feito o tratamento estatístico por meio da ANOVA, e validação do modelo matemático. Gráficos de superfície de resposta foram construídos para melhor visualização da influência das variáveis na síntese das magnetitas.

4.2.2 Síntese e funcionalização da magnetita

As amostras de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) foram obtidas pelo método de coprecipitação, seguindo o procedimento descrito na literatura por Andrade e colaboradores (2012).⁷² Para a síntese das nanopartículas de óxido de ferro, inicialmente foi feita sonicação e vácuo em 400 mL de água em um kitasato (1000 mL) por 20 minutos, para a retirada de oxigênio gasoso, dissolvido na água. A 25,4 mL de NH_4OH foram adicionados um volume da água sem oxigênio suficiente para preparar 400 mL de hidróxido de amônio diluído. Essa solução, tampada, foi reservada.

Em um kitasato (1000 mL) foram colocados 10 mL de solução aquosa de Na_2SO_3 (1 mol.L^{-1}) e 15 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2 mols.L^{-1}), previamente dissolvido em HCl ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$). Logo após a mistura de Fe^{3+} e SO_3^{2-} , a solução ficou vermelho-amarronzada. O kitasato foi tampado, colocado em aparelho de ultrassom, a temperatura ambiente, e sob agitação foi feito vácuo por 30 segundos, para assegurar, tanto quanto possível, uma atmosfera quimicamente inerte. Após esse período, a solução foi agitada por um agitador magnético por aproximadamente 10 minutos, quando a cor da mistura passou para amarelo claro. 400 mL da solução diluída de NH_4OH foram adicionados na solução de ferro, sob agitação, havendo formação de precipitado preto. A velocidade de adição da solução de NH_4OH foi variada, de acordo com o planejamento experimental. Logo após a adição da solução de hidróxido de amônio diluída, o kitasato foi tampado e novamente foi feito vácuo

por 30 segundos, sob agitação. A suspensão ficou sob agitação em sistema fechado por 30 minutos. Durante esse período, a temperatura e a velocidade de agitação também variaram de acordo com o planejamento experimental proposto. Após esse tempo, o sistema de agitação foi desligado para a decantação do precipitado.

Depois do período de decantação, o excesso de sobrenadante foi descartado em um frasco de descarte e o restante da suspensão foi centrifugado a ~3500 rpm durante 3 minutos. Feito isso, o sobrenadante foi descartado e, a cada tubo de centrífuga, foram adicionados 10 mL de água. Foi feita nova centrifugação. Esse procedimento foi repetido por mais três vezes. O precipitado obtido foi identificado como “MAG”.

4.2.3 Funcionalização

Nesta fase, adicionou-se um volume de 2 mL de solução de TMAOH em três, de quatro tubos de magnetita lavada. As massas foram transferidas para um único tubo e foram redispersas, com ajuda de um bastão de vidro, até obter suspensões homogêneas. As amostras foram identificadas como “MAG Funcionalizada”.

4.2.4 Revestimento da MAG funcionalizada com polímero

A amostra MAG Funcionalizada foi diluída, para revestimento com polímero, na proporção de: 2 mL de suspensão de amostra funcionalizada para 18 mL de água. Essa amostra passou a ser denominada de “MAG Funcionalizada Diluída”. O restante das amostras foi liofilizado para caracterização físico-química.

A amostra MAG Funcionalizada diluída foi revestida da seguinte forma: alíquotas de 0,50 mL de amostra MAG Funcionalizada diluída foram pipetadas e transferidas para um béquer de 50 mL contendo, 37,5 mg de PEO-PPO-PEO dissolvidos em 7,00 mL de água. A fase orgânica foi preparada, separadamente, misturando 20 mg de PLDLA-co-TMC a 2,2 mL de acetona e 0,3 mL de metanol. A fase orgânica foi adicionada gota a gota (~ 1 gota por

segundo) na fase aquosa sob sonicação em banho de gelo, em um ultrassom de ponteira a 99% de potência, por 10 minutos. Após esse tempo, a suspensão foi armazenada em banho de gelo.

A suspensão coloidal formada foi roto-evaporada a 55 °C, para retirada dos solventes orgânicos. Uma parte da suspensão foi guardada para as análises biológicas, *in vitro*, e a outra parte foi seca em estufa, a 37 °C, para as caracterizações físico-químicas e para o ensaio de hipertermia. Até a realização dos ensaios, todas as amostras foram mantidas sob refrigeração. Essa amostra foi chamada de “MAG Revestida”.

5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA

A identificação da fase de óxido de ferro presente nas nanopartículas foi feita por: TEM, HRTEM e SAD. A presença dos grupos de revestimento nas MAG revestidas, foi verificada por FTIR. O tamanho hidrodinâmico das partículas não funcionalizadas, funcionalizadas e revestidas foi obtido por DLS. A distribuição de tamanho das partículas foi analisada por PdI. A estabilidade das partículas em suspensão foi analisada pelo potencial zeta e por DLS. A quantidade de calor liberado pelas nanopartículas revestidas em um campo magnético de corrente alternada avaliado por meio do teste de hipertermia.

5.1 TEM

A amostra MAG Funcionalizada foi diluída e encaminhada ao centro de Microscopia da UFMG. O equipamento utilizado para fazer imagens de alta resolução (HRTEM), SAD foi o Tecnai G2- 20 - Modelo: FEI SuperTwin 200 – Marca: FEI, acoplado ao detector EDS - Modelo: TEM Xplore - Fabricante: Oxford Instruments e a um filtro de imagem EELS - Modelo: GIF Quantum SE - Fabricante: Gatan Inc.

Os dados SAD foram analisados utilizando-se software JEMS[®] (v. 3.4922U2U2010). Para efeito de comparação, foram realizadas simulações para os perfis de difração eletrônica para magnetita padrão ($a = 8,3967 \text{ \AA}$) e maghemita ($a = 8,33 \text{ \AA}$), ambas com um grupo espacial de ajuste centrado, *Fd-3 m. Para tais simulações, foram escolhidas uma tensão de aceleração de 200 kV, um cristal tamanho 6 nm e um modelo Lorentzian para forma de linha.

5.2 ENSAIOS DE HIPERTERMIA MAGNÉTICA

Foram preparadas amostras de MAG Revestida nas concentrações de 5; 2,5; 1; 0,5 e 0,25 mg. mL⁻¹ em água e em graxa de silicone.

As amostras dispersas em água foram deixadas no ultrassom por 1 min. Após esse tempo, elas foram mantidas à temperatura ambiente para estabilização térmica. Depois, o béquer, contendo cada uma das suspensões, foi colocado no centro de três bobinas de corrente alternada, sendo submetido a uma corrente de 400 A e frequência de 283 kHz. A temperatura foi medida por um termopar após cada 5 minutos, em um total de 60 minutos.

No total, foram preparadas 10 amostras e as medidas foram feitas em triplicata totalizando 30 medidas. A média das temperaturas e o desvio padrão das leituras foram feitos no *software* Excel (2013) e os gráficos foram gerados no *software* gráfico Origin.

O aparelho utilizado está no Laboratório de Síntese de Nanoestruturas, localizado no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN).

5.3 FTIR

Essa caracterização foi feita nas amostras MAG, MAG Funcionalizada e MAG Revestida. Para isso, as amostras foram misturadas em KBr e prensadas. A composição das pastilhas foi aproximadamente 1 mg de amostra para 100 mg de brometo de potássio. Utilizou-se o espectrofotômetro presente no Laboratório multiusuário da UFMG, no modo transmissão com resolução de 4 cm^{-1} , realizando 24 varreduras na região de comprimento de onda de 2000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .

5.4 DLS, PDI E POTENCIAL ZETA

Para a leitura do DLS, PDI e Potencial zeta foram feitos dois preparos distintos das amostras.

- 1) A MAG Funcionalizada foi transferida para um béquer e agitada no agitador magnético por 5 minutos. Após agitação, 1 mL dessa suspensão foi misturada com 19 mL de água destilada. A mistura foi agitada manualmente por alguns

segundos, a amostra foi filtrada em filtro de 22 μm e encaminhada para leitura do DLS, PDI e Potencial Zeta.

- 2) A suspensão da MAG Revestida foi filtrada duas vezes em peneira de 70 μm , distribuída em placas Petri (pesadas) e colocadas em estufa a temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$ para secagem durante 48 horas. Após secar, as placas Petri foram novamente pesadas para se obter a massa da amostra. Foi adicionado água para obter uma suspensão com aproximadamente 5,0 mg. mL^{-1} . A partir dessa solução as amostras foram diluídas para as concentrações 2,5; 1; 0,5 e 0,25 mg. mL^{-1} . As 5 suspensões preparadas foram encaminhadas para leitura do DLS, PDI e Potencial Zeta.

O equipamento de DLS e de potencial zeta estão no Laboratório de Caracterização de Materiais Nanoestruturados para bioaplicações (LMNB), localizado no Centro de Desenvolvimento e Tecnologia Nuclear (CDTN).

6 TESTES BIOLÓGICOS

6.1 ENSAIO DE HEMÓLISE *IN VITRO*

O teste de hemólise foi realizado seguindo o método de Martínez – Rodríguez e colaboradores (2019)³³, com poucas modificações.

O sangue humano foi coletado em tubo de sangue com EDTA e posteriormente centrifugado a 4.500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante (plasma e leucócitos) foi descartado e o *pellet* (hemácias) foi lavado com solução fisiológica 0,9% por 3 vezes, seguindo de centrifugação a 4.500 rpm por 5 minutos.

Após a lavagem das hemácias foram montados dois lotes de amostras contendo cinco concentrações de MAG Revestida (5; 2,5; 1; 0,5; 0,25 mg/mL), controle positivo (CP) e controle negativo (CN). Como controle de hemólise, as hemácias foram lisadas com água deionizada estéril e, como controle negativo, foi utilizado solução fisiológica.

Posteriormente, um dos lotes preparados foram incubados a 37°C por 3, 6 e 24 horas. Com o segundo lote foi feito o teste de hipertermia, a temperatura foi medida por um termopar após cada 5 minutos, em um total de 30 minutos.

Por último, as amostras dos dois lotes foram centrifugadas a 4.500 rpm por 5 minutos e 100 µL do sobrenadante foram transferidos para microplacas de 96 poços para leitura da absorbância em 550 nm no Espectrofotômetro de Microplacas Multiskan GO, marca Thermo Fisher Scientific, US. A porcentagem de hemólise foi calculada conforme fórmula a seguir (Equação 5) e plotada em gráficos utilizando o *software* Graphpad Prism 6:

$$\text{Hemólise (\%)}: \left(\frac{\text{absorbância da amostra}}{\text{absorbância do controle positivo}} \right) \times 100 \quad (\text{equação 5})$$

7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

7.1 PLANEJAMENTO FATORIAL

Um planejamento fatorial de experimentos foi feito para determinar o conjunto ótimo de variáveis operacionais para sintetizar os menores tamanhos de magnetitas, uma vez que permite realizar uma otimização do processo com um número reduzido de experimentos.

As análises dos resultados foram feitas em planilhas do *software* Excel (2013). Na Tabela 3 pode-se ver os níveis (1 e -1) representando os parâmetros em níveis menores (-1) e os maiores (1), e os valores do ponto central (0). O Y medido [Y (nm)] refere-se aos tamanhos das magnetitas das 11 sínteses, obtidos por meio da medida dos seus diâmetros pelo MET.

Tabela 3: Planejamento fatorial com as onze sínteses em dois níveis e triplicata no ponto central. As variáveis e suas interações, e o tamanho das NPM's sintetizadas estão representadas abaixo.

Experimentos	Média	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ X ₂	X ₁ X ₃	X ₂ X ₃	X ₁ X ₂ X ₃	Y (nm)
1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	4,3
2	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	3,9
3	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	4,8
4	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	3,1
5	1	-1	-1	1	1	1	-1	1	4,8
6	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	9,7
7	1	-1	1	1	-1	1	1	-1	4,7
8	1	1	1	1	1	-1	1	1	9,2
9	1	0	0	0	0	0	0	0	4,2
10	1	0	0	0	0	0	0	0	4,6
11	1	0	0	0	0	0	0	0	4,3

X₁. Tempo NH₄OH: (-) 40s., (0) 3 min. 32 s., (+)6 min. 24 s.

X₂. Velocidade (rpm): (-) 0,5, (0) 1,75, (+) 3.

X₃. Temperatura (°C): (-) 25, (0) 55, (+) 85.

O modelo matemático foi construído com base nos cálculos dos efeitos e a pré-avaliação dos efeitos foi feita por meio do intervalo de confiança (IC) da média e do IC do efeito. O IC foi calculado a partir do erro da média e erro dos efeitos, respectivamente, usando o teste t de *student* com 95% de confiança e dois graus de liberdade. Com esses valores, foi possível considerar como significativos os efeitos da média, do tempo de adição de NH₄OH (X₁), da temperatura de síntese (X₃) e da interação de segunda ordem, tempo de adição de NH₄OH – temperatura de síntese (X₁X₃). Os demais efeitos de primeira e segunda ordem não foram significativos, ou seja, não alteraram significativamente o tamanho das partículas

sintetizadas.

Para o cálculo dos coeficientes foi usado o algoritmo:

$$Y(X_1, X_3) = b_0 + b_{1X_1} + b_{3X_3} + b_{13X_1X_3} + e \text{ (equação 6)}$$

A planilha do modelo permitiu o cálculo dos valores dos coeficientes de contraste X, em conjunto com o vetor de respostas Y, obtido experimentalmente durante as sínteses e que foi usado para os cálculos dos coeficientes do modelo (vetor de regressão).

O modelo procurado, descrito pela equação 6, pode ser representado matricialmente pela equação 7, em que \hat{y} é o vetor das respostas estimadas pelo modelo e \mathbf{b} o vetor de regressão.

$$\hat{y} = Xb \quad \text{(equação 7)}$$

O vetor de regressão \mathbf{b} foi calculado pelo método dos quadrados mínimos, definido pela equação 8, em que X' indica a transposta de X.

$$b = (X'X)^{-1} \cdot X'y \quad \text{(equação 8)}$$

Tabela 4: Matrizes usadas para cálculo dos coeficientes

$X'X$				inv. $(X'X)$				$X'y$
11	0	0	0	0,09091	0	0	0	57,59902
0	8	0	0	0	0,125	0	0	7,385928
0	0	8	0	0	0	0,125	0	12,14258
0	0	0	8	0	0	0	0,125	11,3902

Com as matrizes da Tabela 4 e o uso da equação 8 foi possível calcular os coeficientes b_0 , b_1 , b_3 e b_{13} do modelo matemático.

$$b = (X'X)^{-1} \cdot X'y = \begin{pmatrix} 5,2363 \\ 0,9232 \\ 1,5178 \\ 1,4238 \end{pmatrix}$$

Em seguida foram construídos três gráficos de diagnóstico para uma análise visual dos resíduos (Figura 11). Analisando os gráficos Resíduos x Y previsto pode-se verificar que não foi observada nenhuma tendência nos valores. No gráfico de Y previsto x Y medido observa-se uma correlação adequada entre esses valores. Por último, no gráfico Resíduos x Ordem não é observado nenhuma periodicidade dos resíduos em função da ordem que as sínteses foram feitas.

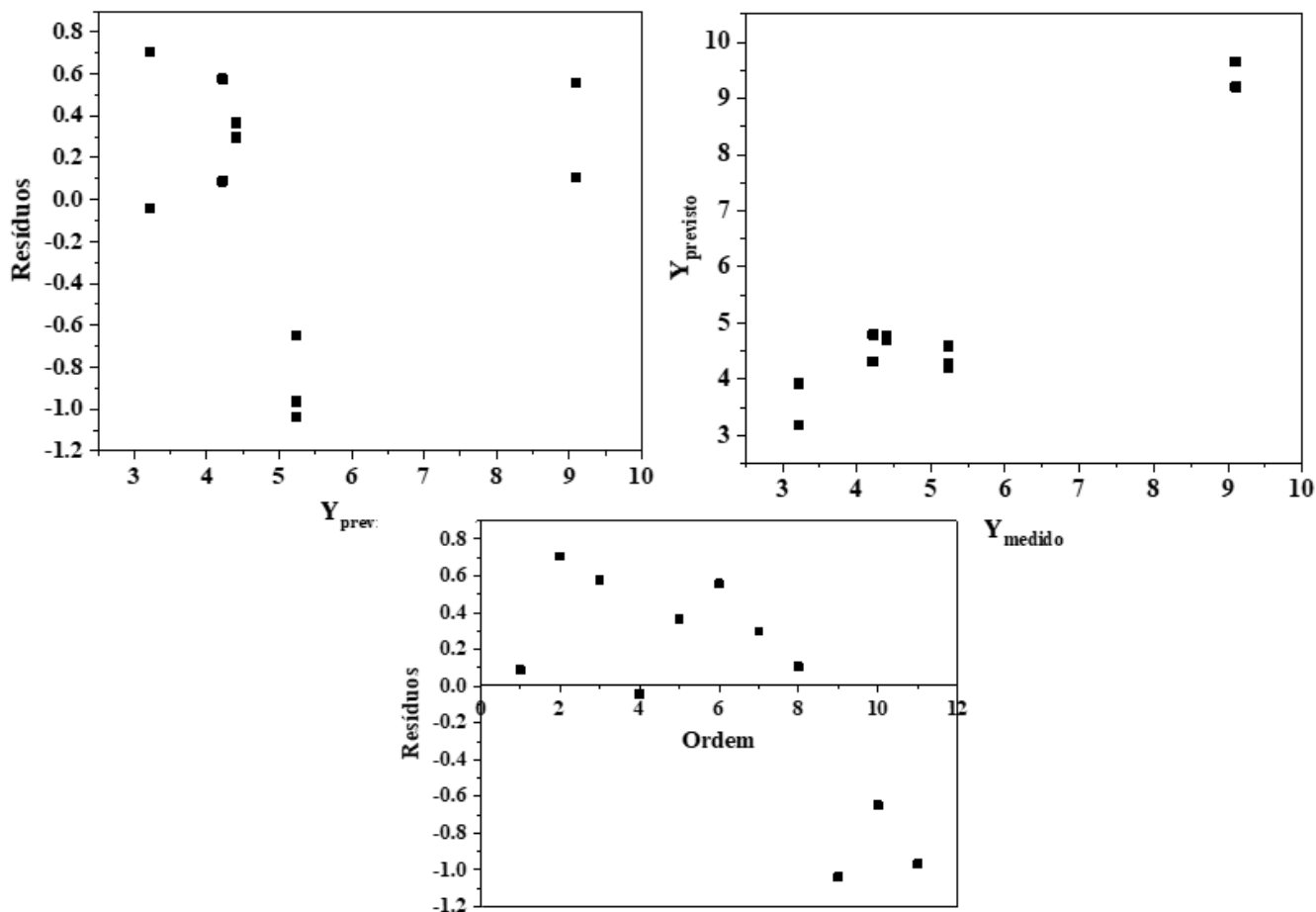


Figura 11: Gráficos de diagnóstico, contendo os resíduos das onze sínteses, para análise visual dos resíduos.

A análise dos gráficos permitiu visualizar que não havia discrepância na distribuição dos valores apresentados. Conforme descrito por Teófilo e Ferreira (2006),⁷³ quando os resíduos estão aleatoriamente distribuídos, pode-se considerar o modelo linear satisfatório.

7.1.1 Validação do modelo matemático por análise de variância (ANOVA)

A qualidade dos ajustes e validação do modelo matemático foram feitos por análise de variância (ANOVA). A soma quadrática da regressão (SQ_{regr}) e a soma quadrática dos resíduos (SQ_{res}), foram calculadas com os valores do Y medido, do Y previsto e do Y médio das triplicatas do ponto central. As equações estão representadas a seguir:

$$SQ_{total} = SQ_{regr} + SQ_{res} \text{ (equação 9)}$$

$SQ_{total} = SQ_{regr} + SQ_{res}$, em que SQ_{regr} e SQ_{res} são:

$$SQ_{regr} = \sum_{i=1}^l m \sum_{j=1}^r ri (\hat{y} - \bar{y})^2 \text{ (equação 10)}$$

$$SQ_{res} = \sum_{i=1}^l m \sum_{j=1}^r ri (y_{ij} - \hat{y}_1)^2 \text{ (equação 11)}$$

Os graus de liberdade foram definidos para cada fonte de variação: regressão (p-1), resíduo (n- p), falta de ajuste (m-p), erro puro (n-m) e total (n-1). A incógnita n é o número total de observações, p é o número de parâmetros para calcular o modelo matemático, e m é o número de experimentos diferentes, incluindo um experimento do ponto central. Após definição dos graus de liberdade, a média quadrática foi calculada dividindo o valor de cada fonte pelo número de graus de liberdade correspondente. Os valores da soma quadrática (SQ), dos graus de liberdade (GL) e da média quadrática (MQ) estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Análise de variância (ANOVA), de acordo com as equações descritas para avaliação do modelo matemático, por meio da definição dos graus de liberdade e valores da SQ e MQ das fontes.

Fonte	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)
Regressão	41,466	3	13.8221
Resíduo	3,8151	7	0.5450
Falta de ajuste	3,7296	5	0.7459
Erro Puro	0,0856	2	0.0428
Total	45,281	10	
% Variância Explicada	0,9158		

Foi possível quantificar, pela razão da soma quadrática da regressão (SQR) e da soma quadrática total (SQT), que 91,58% dos dados experimentais foram explicados pelo modelo matemático. A regressão foi considerada significativa, porque o $F_{calculado}$ foi maior que o $F_{tabelado}$.

$$F_{calc} = MQ_{regr} / MQ_{res} \text{ (equação 12)}$$

$$F_{calc} = 25,3623$$

$$F_{(0,05;3;7)} = 4,3468$$

Já na análise de falta de ajuste, o valor de $F_{calculado}$ foi menor do que o valor de $F_{tabelado}$, evidenciando que não há falta de ajuste do modelo em um nível de 95% de confiança.

$$F_{calc} = MQ_{f.aj.} / MQ_{e.puro} \text{ (equação 13)}$$

$$F_{calc} = 17,4242$$

$$F_{(0,05;5;2)} = 19,2964$$

A validação do modelo foi feita com IC dos coeficientes, obtidos a partir do teste t de *student* com 95% de confiança e 7 graus de liberdade da média quadrática dos resíduos. Com os valores do intervalo de confiança foi possível avaliar que os coeficientes b_0 , b_1 , b_3 e b_{13} são significativos.

Sendo assim, o modelo linear abaixo (equação 14), foi validado e foi observado que os fatores tempo de adição da base e temperatura influenciam na resposta do tamanho das nanopartículas magnéticas.

$$\hat{Y}(x_1, x_3, x_{13}) = 5.2363 + 0,9232 t + 1,5178 T + 1.4238 tT \text{ (equação 14)}$$

$(\pm 0,5) \quad (\pm 0,6) \quad (\pm 0,6) \quad (\pm 0,6)$

7.1.2 Gráficos de superfície de resposta

O modelo linear validado permitiu a construção dos gráficos de superfícies de resposta (Figura 12) do planejamento fatorial linear dentro dos domínios experimental da região estudada.

Dentre os seis gráficos analisados, podemos observar que o gráfico b (velocidade de agitação x velocidade de adição de NH_4OH), gráfico c (temperatura de síntese x velocidade de adição de NH_4OH), e o gráfico f (temperatura de síntese x velocidade de agitação) apresentaram os menores tamanhos de NPM's.

Com os resultados obtidos pode ser identificado que o maior tempo de adição de NH_4OH (6 minutos e 24 segundos) e a menor temperatura de síntese (25°C) produzem os menores tamanhos de NPM's, ou seja, a síntese escolhida para continuação dos trabalhos foi a 4.

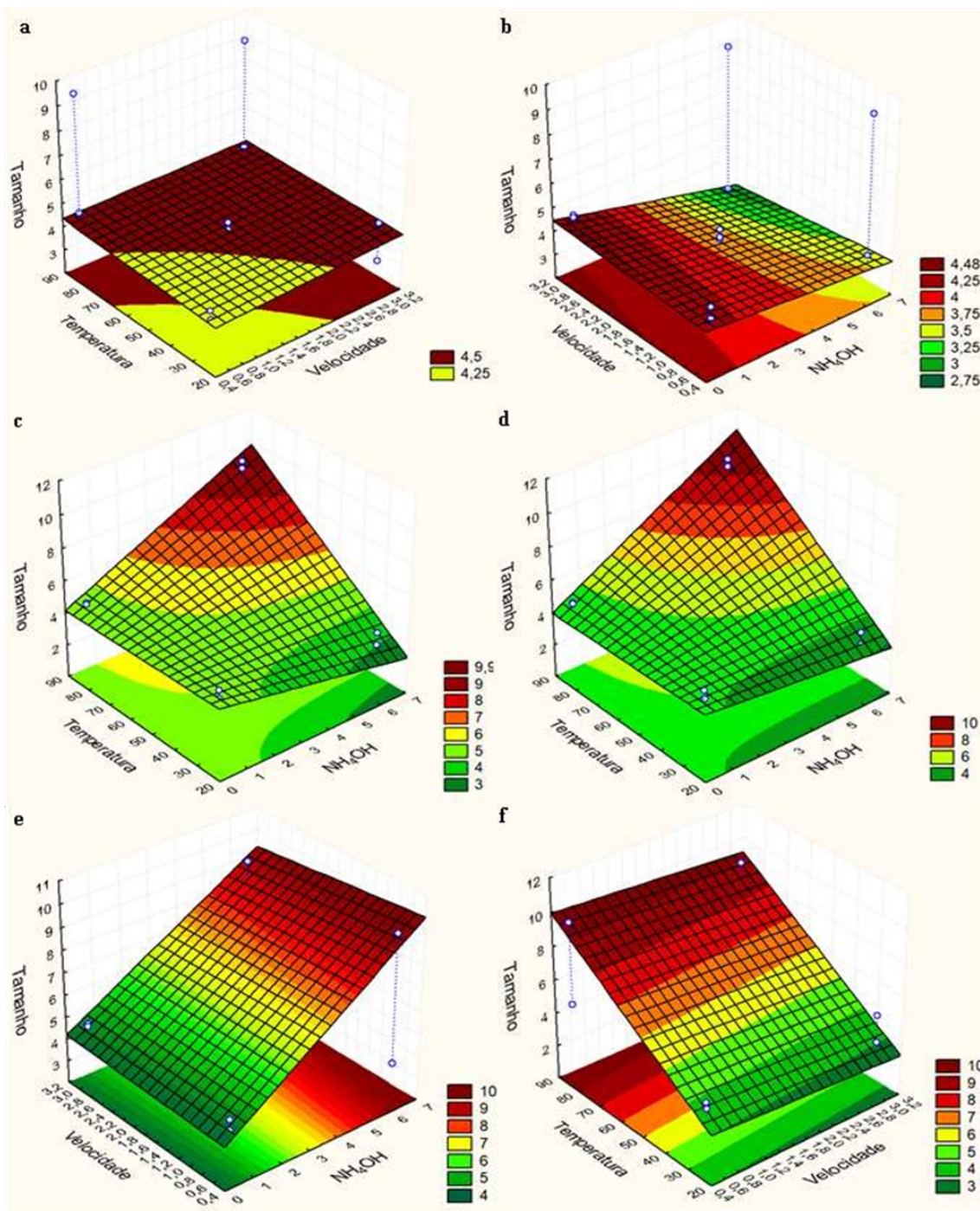


Figura 12: Gráficos superfície resposta das sínteses obtidas do Planejamento Experimental. *software* STATÍSTICA.

Fonte: Própria autora

O efeito da temperatura na Tabela 3 é o mais importante dentre as variáveis e seu aumento interfere no tamanho das nanopartículas. É válido ressaltar que há um efeito de interação muito importante entre as variáveis X_1 (tempo) e X_3 (temperatura).

Nos experimentos de 1 a 4 (onde a temperatura está no nível baixo) é possível notar que o alto nível de X_1 leva a nanopartículas menores (4,3 e 4,8 nm no nível baixo contra 3,9 e 3,1 nm no alto nível de X_1). Por outro lado, nos experimentos de 5 a 8 (onde a temperatura

está no alto nível), ocorre o oposto, ou seja, o alto nível de X_1 leva a partículas quase duas vezes maiores (4.8 e 4.7 nm no nível baixo contra 9.7 e 9.2 nm no alto nível de X_1). Esses resultados mostram claramente a forte influência de interação entre X_1 e X_3 .

Em geral, o tamanho das partículas aumenta com o aumento do tempo de reação, porque mais espécies monoméricas são geradas e, quando há um aumento da temperatura no método de coprecipitação em meio aquoso, resulta no chamado amadurecimento de Ostwald, ou seja, nanopartículas menores se dissolvem na mistura se depositando sobre as partículas presentes, formando partículas maiores.⁷⁴ Essas condições foram encontradas nos experimentos 6 e 8, onde o maior tempo de adição de NH_4OH resultou em um maior tempo de reação e em maiores tamanhos de partículas.

O maior tempo de adição de NH_4OH foi validado como ideal para esse trabalho. Consultando trabalhos publicados, como o de Mascolo e colaboradores (2013)¹⁹, por exemplo, foi determinado a adição rápida da base para formação de nanopartículas de magnetita menores em tamanhos. Mas as publicações avaliaram a variável tempo de forma isolada.

No presente trabalho foram validados pela ANOVA a interação X_1X_3 referente a tempo de adição da base e temperatura respectivamente. Ao consultar a Tabela 3 é possível visualizar que nos experimentos 1 e 3 (menor tempo e menor temperatura) apresentam dimensões maiores de NPM's (4,3 e 4,8 nm), do que nos experimentos 2 e 4 que apresentam menores tamanhos de partículas (3,9 e 3,1 nm). Sendo assim, considerando a interação X_1X_3 o maior tempo para adição da base pode ser justificado.

7.2 TEM

O microscópio eletrônico de transmissão gerou micrografias das amostras de MAG das sínteses 1 a 11, que permitiram visualizar, além do tamanho, as nanopartículas aglomeradas e a morfologia quase esférica e uniforme.

O tamanho médio (diâmetro) dos pontos foi determinado usando *software Image J*, e os valores foram estimadas pela contagem de aproximadamente 100 partículas de imagens de cada síntese, escolhidas aleatoriamente. A figura 13 mostra uma das imagens obtidas. Nesse

caso, foi a imagem das nanopartículas da síntese 4. À direita pode ser visto o histograma dessa imagem.

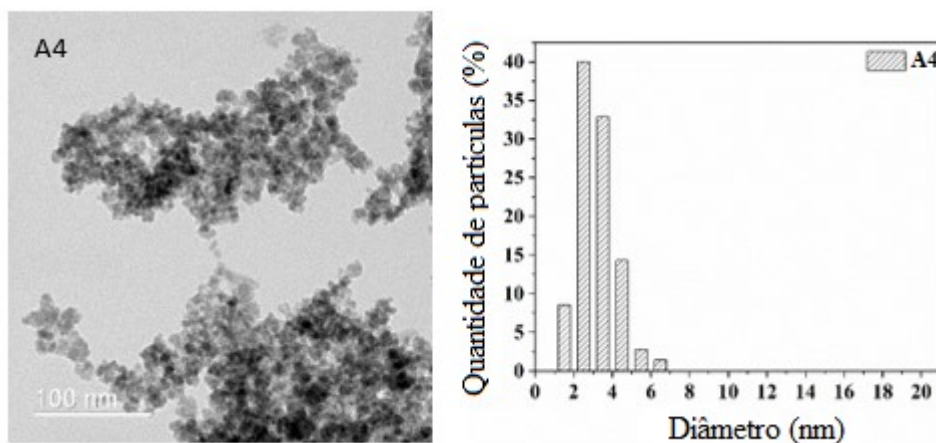


Figura 13: Micrografia (esquerda) e histograma (direita) das NPM's funcionalizadas obtidas com a síntese 4.

Fonte: Laboratório de Microscopia da UFMG e própria autora.

Após a escolha da síntese 4 para a continuação dos estudos, foi feita uma nova síntese de magnetita, mas, dessa vez, as nanopartículas foram funcionalizadas. Essa amostra foi levada novamente ao Centro de Microscopia da UFMG para, desta vez, fazer análise química por HRTEM, SAD.

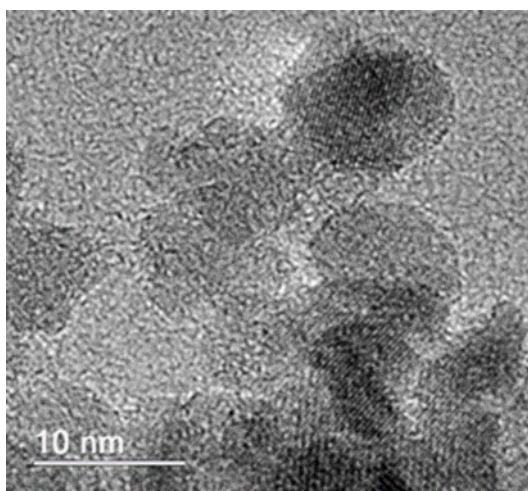


Figura 14: Imagem de HRTEM das NPM's funcionalizadas.

Fonte: Laboratório de Microscopia da UFMG

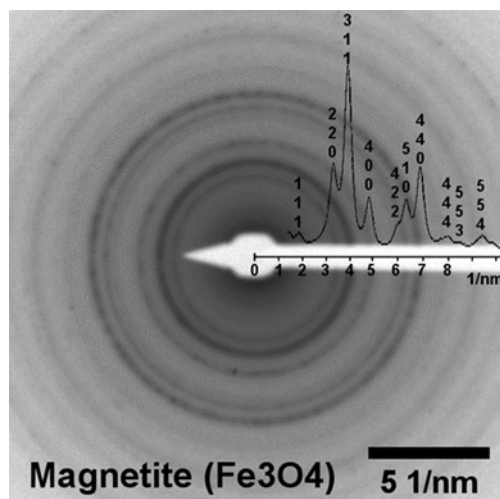


Figura 15: SAD das NPM's

Fonte: Laboratório de Microscopia da UFMG

Os dados do HRTEM (figura 14) e do SAD (Figura 15) confirmam que a magnetita é o único óxido de ferro na amostra. Os dados do SAD foram analisados utilizando-se do software JEMS© (v. 3.4922U2010) o espectro obtido apresentou picos intensos de difração 220, 311 e 440 característicos da magnetita, e indicativo do espinélio Fe_3O_4 . Esse resultado está em consonância com os resultados apresentados nos artigos de Baruah e colaboradores (2020)⁷⁵ e Yee e colaboradores (2021)⁷⁶, que também confirmaram presença de magnetita e espinélio Fe_3O_4 em suas amostras com as mesmas difrações mostradas no presente trabalho.

7.3 TESTE DE HIPERTERMIA

O objetivo do teste de hipertermia foi determinar a eficiência do potencial de aquecimento da amostra MAG Revestida em água e em graxa de silicone para futuros testes em células.

A figura 16 mostra as curvas de aquecimento versus tempo para suspensões de NPM's nas concentrações de amostra, em água, iguais a 5,0; 2,5; 1,0 e 0,5 mg.mL^{-1} .

Para melhor visualizar quais amostras atingiram as temperaturas de 39 a 45 °C, que é a faixa que pode ser usada em terapia de hipertermia *in vivo*,⁵⁰ foram traçadas duas linhas amarelas próximas a essas temperaturas. As concentrações de 5 e 2,5 mg. mL^{-1} atingiram a temperatura limite (45° C) nos tempos de aproximadamente 7 e 20 minutos. O aumento rápido da temperatura durante o tempo inicial pode ser associado ao relaxamento Néel e ao

relaxamento browniano das magnetitas de cada amostra estimuladas pela aplicação do campo magnético alternado.^{41,77}

As amostras de 1,0 e 0,5 mg. mL⁻¹ também tiveram aumento rápido de temperatura, mas não suficiente para atingir a temperatura mínima de aquecimento.

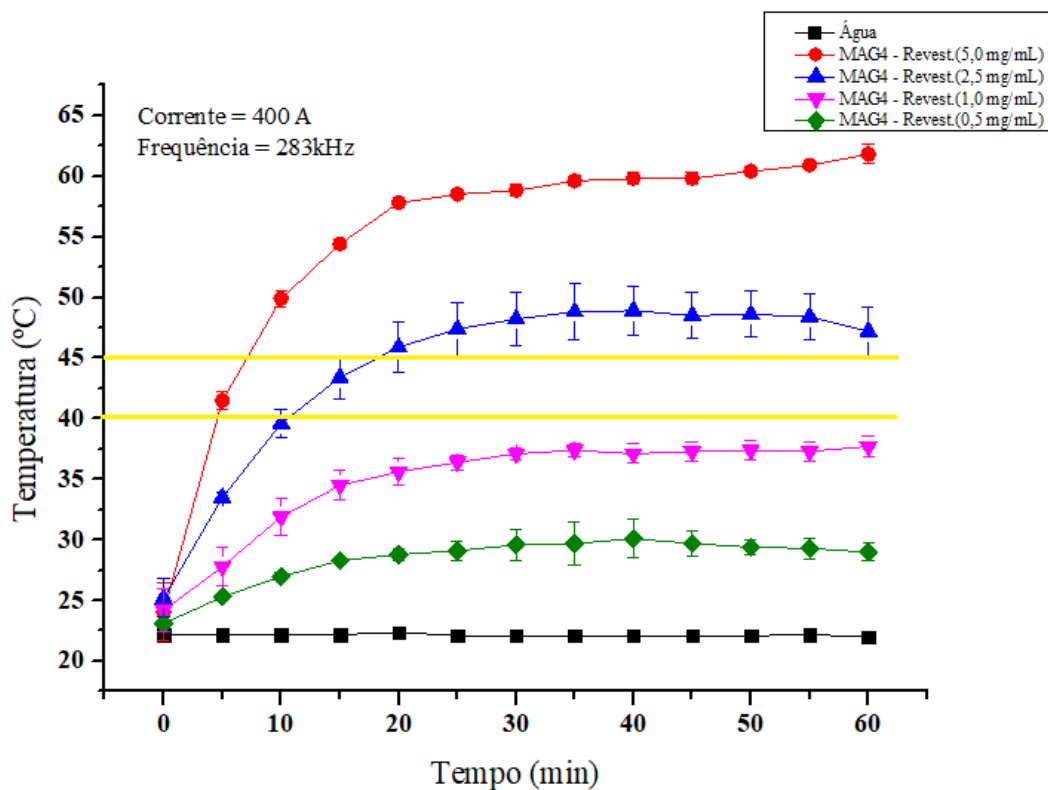


Figura 16: Gráfico de hipertermia de suspensão de NPM's revestidas em água.
Fonte: Própria autora

A figura 17 apresenta o aquecimento da amostra MAG Revestida nas mesmas concentrações das suspensões em água, mas dispersas em graxa de silicone. O objetivo era observar como o relaxamento de Néel e o relaxamento Browniano se comportariam em um meio mais viscoso. Dentre as concentrações de NPM's, a MAG Revestida de 5,0 mg. mL⁻¹ foi a concentração que atingiu a temperatura que pode ser usada para teste de hipertermia em células. As outras amostras em concentrações menores, não liberaram calor suficiente para serem utilizadas em um teste de hipertermia em células.

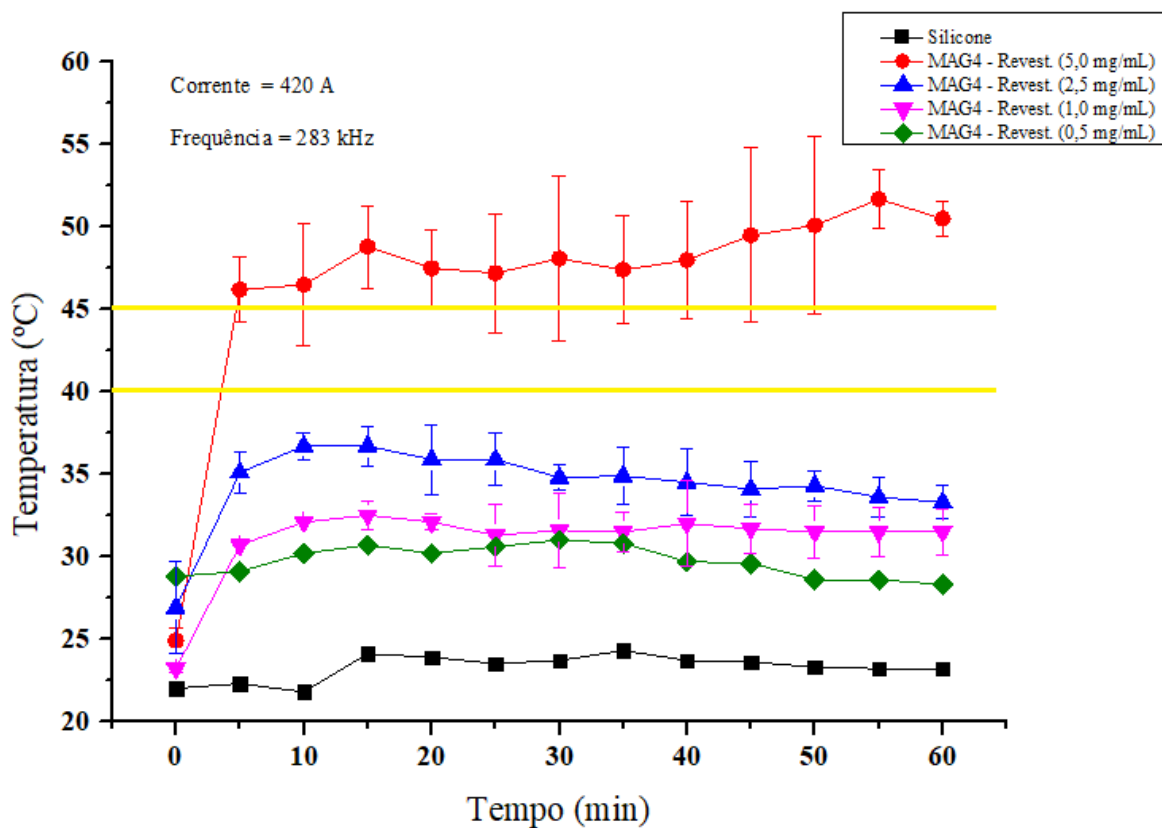


Figura 17: Gráfico de hipertermia de suspensão de NPM's revestidas em graxa de silicone
Fonte: Própria autora

Comparando as figuras 16 e 17 é possível observar que a liberação de calor da magnetita revestida dispersa em água, é maior do que o calor liberado pela magnetita revestida dispersa em graxa de silicone. Logo, a medida realizada em graxa de silicone é, provavelmente, mais realística às condições *in vivo*, porque também há um certo grau de restrição ao movimento browniano das nanopartículas na região do tumor (devido às membranas celulares vizinhas e proteínas que se ligam à camada de revestimento). Para ter valores experimentais *in vitro*, semelhante a valores *in vivo*; é essencial ter partículas que relaxam através do relaxamento Néel.⁷⁸

As amostras com concentrações de 5,0 mg. mL⁻¹ apresentaram o maior aquecimento. Sendo assim, essa concentração poderá ser usada para futuros ensaios biológicos em células por terem uma temperatura de aquecimento satisfatória.

7.4 FTIR

FTIR foi feito com objetivo de investigar se a suspensão contendo a amostra MAG Revestida permanece com o revestimento de TMAOH, após a sonicação em ultrassom de ponteira. Os espectros de infravermelho para as amostras de magnetita, magnetita funcionalizada e magnetita funcionalizada revestida na região de comprimento de onda de 2000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} estão representados na figura 18.

Na figura 18a, observa-se uma banda em torno de 590 cm^{-1} - 570 cm^{-1} , referente à ligação Fe-O, presente na magnetita. Este resultado está em consonância com a resposta obtida por Andrade e colaboradores (2020);⁶³ Namduri e Nasrazadani (2008).⁷⁹

Já as figuras 18b e 18c (amostras de MAG Funcionalizada, e MAG Funcionalizada após 10 min de ultrassom de ponteira, respectivamente), além da banda relacionada à ligação Fe-O é possível visualizar banda de vibração de alongamento C-N, à 950 cm^{-1} , associadas a molécula de TMAOH. Isso, de acordo com a literatura indica que o TMAOH está presente nessas amostras.⁷²

A figura 18d mostra a banda relacionada à ligação Fe-O, mas não é possível identificar a banda relacionada à ligação C-N, observação também descrita por Machado e colaboradores (2021).³² A observação pode ser justificada pelo fato dos polímeros utilizados (PLDLA-co-TMC e PEO-PPO-PEO) terem muitas bandas nessa região, conforme foi visualizado nos espectros publicados no trabalho de Machado e colaboradores (2018).⁸⁰ Isso causa um alargamento da banda, com uma sobreposição dos picos.

O polímero PLDLA-co-TMC possui as bandas atribuídas à presença de TMC em 1745 cm^{-1} (C=O) e 1247 cm^{-1} (OCO), esta última envolvendo alongamento assimétrico, enquanto as bandas correspondentes a PLDLA ocorrem em 1757 cm^{-1} e 1185 cm^{-1} (C=O e COC, respectivamente)^{24,81} e o copolímero PEO-PPO-PEO possui entre 1000 cm^{-1} e 1200 cm^{-1} uma banda atribuído à vibração de estiramento C-O-C da ligação éter, que é uma característica distintiva do copolímero Pluronic.⁶⁸

Portanto, por essa técnica não foi possível saber se o hidróxido de tetrametilamônio permanece na amostra após o tratamento no ultrassom de ponteira.

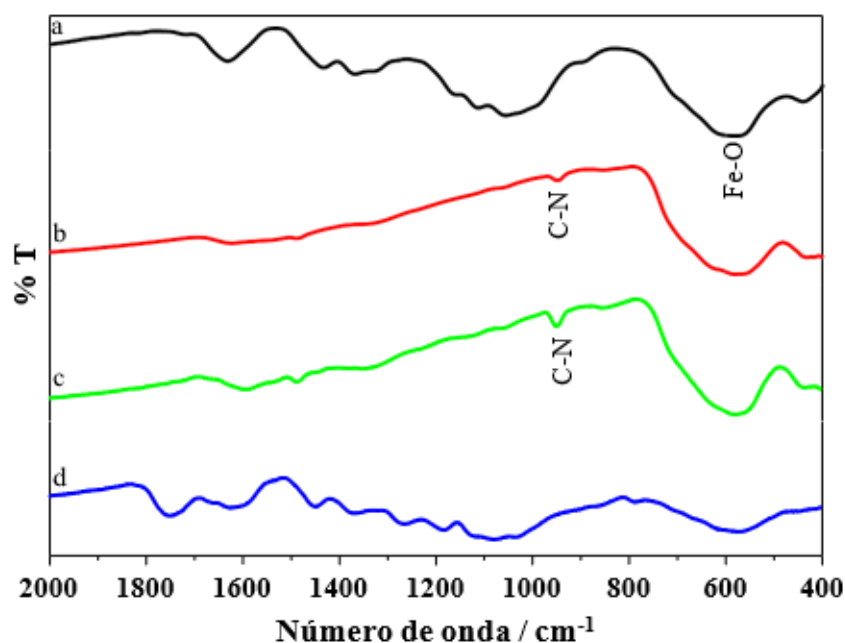


Figura 18: Espectro FTIR das amostras: a) magnetita, b) magnetita funcionalizada c) magnetita funcionalizada depois do ultrassom de ponteira, d) magnetita funcionalizada revestida pelo polímero e depois do ultrassom de ponteira.

Fonte: Laboratório multiusuário da UFMG

7.5 DLS

O objetivo da análise do DLS foi definir se após a secagem em estufa e dispersão em água, as partículas estariam aglomeradas, prejudicando os ensaios biológicos feitos posteriormente.

O objetivo do PdI foi avaliar a dispersidade das partículas em suspensão e o objetivo da análise do potencial Zeta foi verificar a estabilidade das moléculas analisando as cargas de superfície.⁸²

O resultado da média das leituras em triplicata das amostras do DLS, PdI e potencial zeta estão dispostas na Tabela 6. As amostras foram preparadas e diluídas em água nas concentrações usadas para o teste de hipertermia (5,0; 2,5; 1,0; 0,5 e 0,25 mg.mL⁻¹).

Tabela 6: Média do tamanho hidrodinâmico, Pdl e potencial zeta em triplicata das amostras MAG Revestidas

AMOSTRAS	DLS (nm)	Pdl	Potencial zeta (mV)
MAG FUNCIONALIZADA	20,43 ± 2,87	0,56	-24,63 ± 3,05
MAG REVESTIDA 0,25 mg. mL ⁻¹	197,26 ± 8,75	0,28	-24,07 ± 1,72
MAG REVESTIDA 0,5 mg. mL ⁻¹	165,03 ± 6,80	0,24	-25,93 ± 0,80
MAG REVESTIDA 1,0 mg. mL ⁻¹	237,70 ± 3,64	0,24	-16,73 ± 0,21
MAG REVESTIDA 2,5 mg. mL ⁻¹	263,43 ± 23,38	0,41	-14,23 ± 0,40
MAG REVESTIDA 5,0 mg. mL ⁻¹	209,06 ± 11,28	0,36	-12,07 ± 1,00

A literatura classifica a polidispersidade das partículas em monodispersas ($\leq 0,1$), moderada (0,1 a 0,5) e alta ($> 0,5$).⁸³ A dispersidade das NPM's em todas as amostras revestidas é considerada moderada.

O potencial zeta de todas as amostras é negativo. Esse resultado pode ser explicado pelos grupos éter presentes no copolímero (PEO-PPO-PEO) e grupos carboxila presentes no polímero (PLDLA-co-TMC).⁶²

Convencionalmente, valores de potencial zeta maiores que 30 mV, em módulo, conferem estabilidade. Os valores menores que 30 mV, em módulo, obtidos neste estudo sugerem que as repulsões eletrostáticas não apresentam papel dominante na estabilização de partículas, que foi alcançado principalmente por meio de impedimentos estéricos.

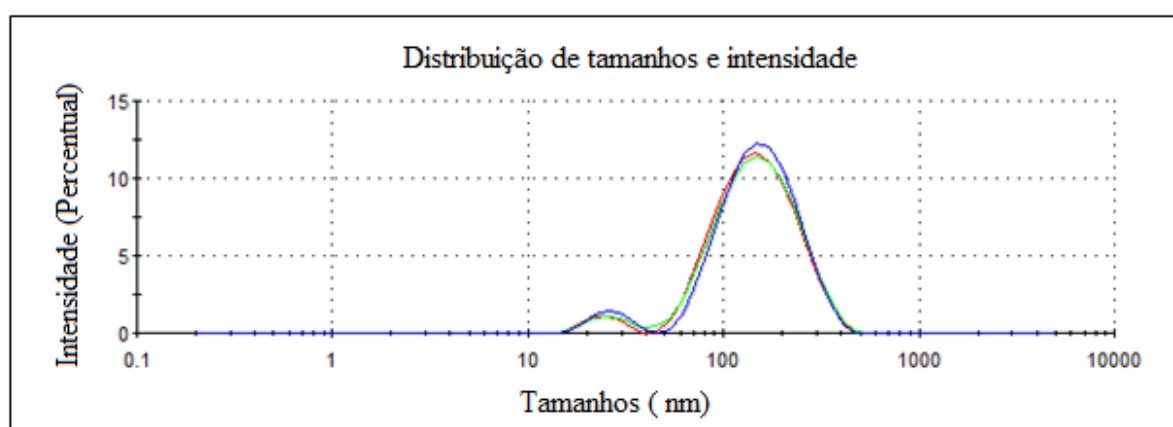


Figura 19: Distribuição de tamanho hidrodinâmico de nanopartículas da amostra MAG Revestida 0,5 mg. mL⁻¹ dispersa em água (realizado por triplicata).

Fonte: Laboratório Multiuso CDTN

O tamanho hidrodinâmico das NPM's medidas em triplicata no DLS (Figura 19) exibe uma faixa de tamanho mais ampla do que as medidas via TEM. Isso porque o TEM

mede o tamanho do núcleo magnético, e o DLS mede o tamanho das nanopartículas com seu revestimento e sua camada de solvatação.⁸⁴

Os resultados das análises indicam que, pode ter havido aglomeração entre as partículas causando aumento de tamanho das mesmas durante a leitura no equipamento. Um dos motivos para essa aglomeração, segundo a literatura, foi o uso de água deionizada para diluir as NPM's. A água deionizada não possui íons e, portanto não protege as interações de longa distância entre as partículas. Assim, o tamanho obtido com uso da água deionizada é sempre maior que o tamanho real.^{82,85}

Outro fato que deve ser levado em consideração, conforme citado por Gaumet e colaboradores (2008)⁸⁶ é que cada técnica de caracterização possui suas vantagens e limitações; portanto seria recomendado pelo menos dois métodos de caracterizações diferentes (DLS e microscópio eletrônico), para caracterizar com precisão o tamanho das NPM's. Neste trabalho, não foi realizada caracterização de medidas e dispersidade com outro equipamento por falta de disponibilidade nos laboratórios durante a pandemia.

8 ENSAIO DE HEMATOCOMPATIBILIDADE

O ensaio de hematocompatibilidade (hemólise) *in vitro* foi feito, porque é uma das técnicas mais utilizadas para avaliar citotoxicidade, pois é possível visualizar os efeitos que os materiais injetados produzem no sangue. A atividade hemolítica foi verificada com a inserção de suspensões de MAG Revestida nas concentrações de 0,25; 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0 mg. mL⁻¹ em seis tubos eppendorf contendo hemácias e solução fisiológica. Os tubos, após os testes, estão apresentados na figura 20.

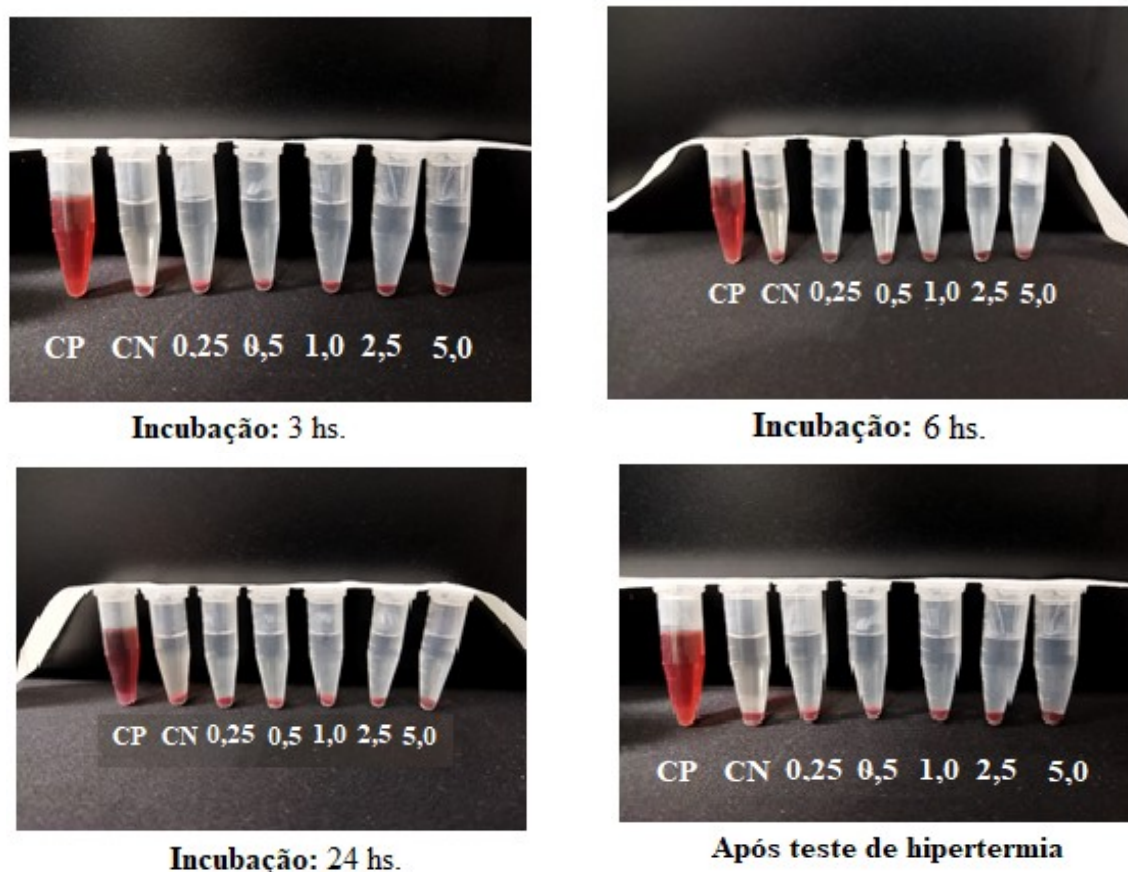


Figura 20: Fotos das amostras de sangue incubadas em três tempos e após o teste de hipertermia.

Fonte: Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica

Após incubação e o teste de hipertermia, as leituras das amostras foram realizadas no espectrofotômetro de microplacas em triplicatas e a porcentagem de hemólise das amostras foram calculadas. A atividade hemolítica nos três tempos sem hipertermia e com hipertermia não teve impacto nas concentrações avaliadas, por permanecer abaixo de 5% conforme demonstrado na Tabela 7 e 8.^{87,88}

Tabela 7: Resultados de hematocompatibilidade em sangue em diferentes tempos de incubação e em diferentes concentrações de NPM's no sangue.

GRUPOS	3 horas (%)	6 horas (%)	24 horas (%)
CP	100 ± 0,24	101,68 ± 0,57	91,04 ± 0,68
CN	2,85 ± 0,1	3,11 ± 0,05	3,41 ± 0,18
0,25 mg. mL ⁻¹	2,58 ± 0,12	2,56 ± 0,1	2,92 ± 0,02
0,5 mg. mL ⁻¹	2,44 ± 0,01	2,51 ± 0,12	2,78 ± 0,03
1,0 mg. mL ⁻¹	2,57 ± 0,1	2,52 ± 0,02	2,88 ± 0,1
2,5 mg. mL ⁻¹	2,77 ± 0,2	2,59 ± 0,04	3,00 ± 0,04
5,0 mg. mL ⁻¹	2,79 ± 0,01	2,92 ± 0,04	3,18 ± 0,02

Tabela 8: Resultados de hematocompatibilidade em sangue em diferentes concentrações de NPM's, após o teste de hipertermia.

GRUPOS	30 minutos
CP	99,12 ± 1,88
CN	2,90 ± 0,00
0,25 mg. mL ⁻¹	2,68 ± 0,04
0,5 mg. mL ⁻¹	3,20 ± 0,02
1,0 mg. mL ⁻¹	2,76 ± 0,01
2,5 mg. mL ⁻¹	3,57 ± 0,05
5,0 mg. mL ⁻¹	3,43 ± 0,03

Os resultados de hemólise para as concentrações testadas foram considerados satisfatórios e todas as amostras testadas são compatíveis com as hemácias (eritrócitos) quando injetadas e transportadas pelos vasos sanguíneos, podendo ser submetidas a um campo magnético externo aplicado.

Essa resposta faz com que essas amostras sejam aptas a serem usadas em futuros ensaios biológicos em células.

9 CONCLUSÃO

Amostras de óxido de ferro, de pequeno tamanho e estreita faixa de variação de tamanhos foram sintetizadas. As melhores condições para se chegar a essa amostra foram conseguidas com a ajuda de um planejamento experimental. Análise por HRTEM e SAD evidenciaram que o óxido de ferro sintetizado foi magnetita. A amostra de Mag Revestida foi capaz de liberar calor em diferentes concentrações, mais em água do que em graxa de silicone. A análise do padrão de aquecimento das amostras de MAG Revestidas na graxa silicone permitiu concluir que o aumento da temperatura do meio, nesse solvente, ocorreu, em sua maior parte, pelo mecanismo de relaxamento de Néel que não sofre interferência da viscosidade do meio, porque a movimentação é feita pelo spin, dentro do átomo de magnetita, quando submetido a um campo magnético. Outra característica importante foi que o tamanho hidrodinâmico, dispersividade e potencial zeta das NPM's foi considerado satisfatório para os testes em células. O ensaio de hematocompatibilidade feito com a amostra MAG Revestida demonstrou inexistir toxicidade nas cinco diferentes concentrações testadas. Esse resultado é importante porque a realização desse trabalho não teria fundamento caso as NPM's sintetizadas provocassem toxicidade. Portanto, por esse trabalho foi possível delinear um perfil de síntese e revestimento com condições adequadas para obtenção de NPM's com características físico-químicas que responderam de forma positiva à avaliação de hematocompatibilidade.

10 PERSPECTIVAS

A pesquisa apresentada foi satisfatória para o objetivo proposto o perfil de síntese e revestimento foi delineado. A partir desse estudo, algumas proposições para investigações futuras podem ser feitas:

- Diluição das NPM's secas em estufa em meio salino para que as interações das moléculas fiquem protegidas a longa distância evitando aglomerações;
- Para determinação do tamanho real das NPM's em solução é aconselhável a caracterização utilizando a técnica de microscópio de força atômica;
- Avaliação da hipertermia no sangue e em células.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional Do Câncer. <https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao>. Acesso: 17 de janeiro de 2022.
2. Instituto Nacional Do Câncer. <https://www.inca.gov.br/institucional>. Acesso: 17 de janeiro de 2022.
3. Rock, K. L. & Kono, H. The inflammatory response to cell death. *Annu. Rev. Pathol.* **2008**, 3, 99–126.
4. Alexiou, C., Tietze, R., Schreiber, E., Jurgons, R., Richter, H., Trahms, L., Rahn, H., Odenbach, S., Lyer, S. Cancer therapy with drug loaded magnetic nanoparticles—magnetic drug targeting. *J. Magn. Magn. Mater.* **2011**, 323, 1404–1407.
5. Yu, X. *et al.* Design of Nanoparticle-Based Carriers for Targeted Drug Delivery. *J. Nanomater.* **2016**, 1–15.
6. Instituto Nacional Do Câncer. <https://www.inca.gov.br/tratamento/quimioterapia>. Acesso: 17 de janeiro de 2022.
7. Wu, K., Su, D., Saha, R., Liu, J. & Wang, J. P. Investigating the effect of magnetic dipole-dipole interaction on magnetic particle spectroscopy: Implications for magnetic nanoparticle-based bioassays and magnetic particle imaging. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **2019**, 52, 1-13.
8. Rajan, A. & Sahu, N. K. Review on magnetic nanoparticle-mediated hyperthermia for cancer therapy. *Journal of Nanoparticle Research* vol. 22 (2020).
9. Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C. & Kim, W.-S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2015**, 16, 023501.
10. De Matteis, L. *et al.* Ultrathin MgO Coating of Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles by Combined Coprecipitation and Sol–Gel Synthesis. *Chem. Mater.* **2012**, **24**, 451–456 (2012).
11. Eguía-Eguía, S. I. *et al.* Magnetic domains orientation in (Fe₃O₄/γ-Fe₂O₃) nanoparticles coated by Gadolinium-diethylenetriaminepentaacetic acid (Gd³⁺-DTPA). *Nano express* 2, 20019.
12. Hayashi, K., Tomonaga, H., Matsuyama, T. & Ida, J. Facile synthesis, characterization of various polymer immobilized on magnetite nanoparticles applying the coprecipitation method. *J. Appl. Polym. Sci.* **2022**, 139, 51581--n/a.
13. Mahdavi, M. *et al.* Synthesis, surface modification and characterisation of biocompatible magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Molecules.* **2013**, 18 (7), 7533-7548.
14. Nidhin, M., Indumathy, R., Sreeram, K. J. & Nair, B. U. Synthesis of iron oxide nanoparticles of narrow size distribution on polysaccharide templates. *Bull. Mater. Sci.* **2008**, 31, 93–96.
15. Ramos, I. R. O., Braga, J. P. M., Ataíde, J. V. A., Lima, A. P. & Holanda, L. Eletrostática em sistemas coloidais carregados. *Rev. Bras. Ensino Física.* **2018**, 40, e5408-3 - e5408-7.
16. Gomes, J. de A. *et al.* Synthesis of Core–Shell Ferrite Nanoparticles for Ferrofluids: Chemical and Magnetic Analysis. *J. Phys. Chem. C.* **2008**, 112, 6220–6227.
17. Lu, A.-H., Salabas, E. L. & Schüth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, 46, 1222–1244.
18. Cushing, B. L., Kolesnichenko, V. L. & O'Connor, C. J. Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 3893–3946.

19. Mascolo, M. C., Pei, Y. & Ring, T. A. Room Temperature Co-Precipitation Synthesis of Magnetite Nanoparticles in a Large pH Window with Different Bases. *Materials (Basel)*. **2013**, 6, 5549–5567.
20. Laurent, S. *et al.* Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chem. Rev.* **2010**, 110, 2574.
21. Maier-Hauff, K. *et al.* Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* **2010**, 103, 317–324.
22. Mora-Huertas, C. E., Fessi, H. & Elaissari, A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods: Critical comparison. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, 163, 90–122.
23. Kudr, J., Haddad, Y., Richtera, L., Heger, Z., Cernak, M., Adam, V., & Zitka, O. Magnetic Nanoparticles: From Design and Synthesis to Real World Applications. *Nanomater. (Basel, Switzerland)*. **2017**, 7, 243.
24. Motta, A.C., Martins, K. S., Messias, A.D., Duek, A. E. R. Síntese e caracterização de Poli(L-CO-D,L ácido láctico co-trimetileno carbonato). in *11º Congresso Brasileiro de Polímeros*. **2011**, 2449–2455.
25. Batrakova, E. V & Kabanov, A. V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J. Control. Release.* **2008**, 130, 98–106.
26. Ali, A. *et al.* Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **2016**, 9, 49+.
27. Lin, P.-C., Lin, S., Wang, P. C. & Sridhar, R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnol. Adv.* **2014**, 32, 711–726.
28. Gupta, A. K. & Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials.* **2005**, 26, 3995–4021.
29. Caldorera-Moore, M., Guimard, N., Shi, L. & Roy, K. Designer nanoparticles: incorporating size, shape and triggered release into nanoscale drug carriers. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2010**, 7, 479–495.
30. Arabi, M., Ostovan, A., Ghaedi, M. & Purkait, M. K. Novel strategy for synthesis of magnetic dummy molecularly imprinted nanoparticles based on functionalized silica as an efficient sorbent for the determination of acrylamide in potato chips: Optimization by experimental design methodology. *Talanta.* **2016**, 154, 526–532.
31. Zhao, H., Huang, M., Wu, J., Wang, L. & He, H. Preparation of Fe₃O₄@PPy magnetic nanoparticles as solid-phase extraction sorbents for preconcentration and separation of phthalic acid esters in water by gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr.* **2016**, B 1011, 33–44.
32. de Oliveira Machado, V. *et al.* Preparation of hybrid nanocomposite particles for medical practices. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2021**, 624, 126706.
33. Martínez-Rodríguez, N. L., Tavárez, S. & González-Sánchez, Z. I. In vitro toxicity assessment of zinc and nickel ferrite nanoparticles in human erythrocytes and peripheral blood mononuclear cell. *Toxicol. Vitr.* **2019**, 57, 54–61.
34. Leal, R. Estudo da magnetita como material adsorvedor de íons urânio. **2006**, 73p. Dissertação Mestrado, São Pulo, Instituto de pesquisas Energéticas e Nucleares - USP.
35. Magalhães, F. Síntese e Caracterização de Óxidos de Ferro e Compósitos para Aplicações no Tratamento Redox de Efluentes Aquosos. **2008**, 215 p. Tese de Doutorado, Belo Horizonte, Programa de Pós Graduação em Química - UFMG.
36. Andrade, Â. L., Souza, D. M., Pereira, M. C., Fabris, J. D. & Domingues, R. Z. pH effect on the synthesis of magnetite nanoparticles by the chemical reduction-precipitation method. *Química Nova.* **2010**, 33, 524–527.

37. Andrade, Â., Ferreira, R., Fabris, J. & Domingues, R. Coating Nanomagnetic Particles for Biomedical Applications. *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*. **2011**. doi: 10.5772/19519. Acesso: 22 de novembro de 2021.
38. Fernández-Afonso, Y. *et al.* Propiedades magneticas y distribucion de tamanos de nanopartículas de magnetita recubiertas con ácido oleico. *Revista Cuba. Física*. **2017**, 34, 3+.
39. Galvao, W., Andrade Neto, D., Freire, R. & Fechine, P. Super-Paramagnetic Nanoparticles with Spinel Structure: A Review of Synthesis and Biomedical Applications. *Solid State Phenom.* **2016**, 241, 139–176.
40. Faraudo, J., Andreu, J. S., Calero, C. & Camacho, J. Predicting the Self-Assembly of Superparamagnetic Colloids under Magnetic Fields. *Adv. Funct. Mater.* **2016**, 26, 3837–3858.
41. Périgo, E. A. *et al.* Fundamentals and advances in magnetic hyperthermia, *Applied Physics Reviews*. **2015**. doi: 10.1063/1.4935688. Acesso: 22 de novembro de 2021.
42. de Mello, L. B., Varanda, L. C., Sigoli, F. A. & Mazali, I. O. Co-precipitation synthesis of (Zn-Mn)-co-doped magnetite nanoparticles and their application in magnetic hyperthermia. *J. Alloys Compd.* **2019**, 779, 698–705.
43. Martins, M. A. & Trindade, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. *Química Nova*. **2012**, 35, 1434–1446.
44. Reddy, L. H., Arias, J. L., Nicolas, J. & Couvreur, P. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Chem. Rev.* **2012**, 112, 5818–5878.
45. Kumar, C. S. S. R. & Mohammad, F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2011**, 63, 789–808.
46. Datta, N. R. *et al.* Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: Recent advances and promises for the future. *Cancer Treat. Rev.* **2015**, 41, 742–753.
47. Singh, B. B. Hyperthermia: An ancient science in India. *Int. J. Hyperth.* **1991**, 7, 1–6.
48. Ito, A., Shinkai, M., Honda, H. & Kobayashi, T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.* **2005**, 100, 1–11.
49. GILCHRIST, R. K. *et al.* Selective inductive heating of lymph nodes. *Ann. Surg.* **1957**, 146, 596–606.
50. van der Zee, J., Vujaskovic, Z., Kondo, M. & Sugahara, T. The Kadota Fund International Forum 2004-Clinical group consensus. *Int. J. Hyperth.* **2008**, 24, 111–122.
51. Spirou, S. V, Basini, M., Lascialfari, A., Sangregorio, C. & Innocenti, C. Magnetic Hyperthermia and Radiation Therapy: Radiobiological Principles and Current Practice@. *Nanomaterials*. **2018**, 8, 401.
52. Wust, P. *et al.* Hyperthermia in combined treatment of cancer. *Lancet Oncol.* **2002**, 3, 487–497.
53. Horsman, M. R. & Overgaard, J. Hyperthermia: a Potent Enhancer of Radiotherapy. *Clin. Oncol.* **2007**, 19, 418–426.
54. Lindner, L. H. & Issels, R. D. Hyperthermia in soft tissue sarcoma. *Curr. Treat. Options Oncol.* **2011**, 12, 12–20.
55. Fajardo, L. F. Pathological effects of hyperthermia in normal tissues. *Cancer Res. (Chicago, Ill.)* **1984**, 44, 4826s--4835s.
56. Estelrich, J., Escribano, E., Queralt, J. & Busquets, M. A. Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, 16, 8070–8101.
57. Narayanan, K. B. & Sakthivel, N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2010**, 156, 1–13.
58. Massart, R.; Cabuil, V. Effect of some parameters on the formation of colloidal

- magnetite in alkaline-medium-yield and particle-size control. *J de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique*. **1987**, 967–973.
59. Destrée, C., Ghijsen, J. & B.Nagy, J. Preparation of Organic Nanoparticles Using Microemulsions: Their Potential Use in Transdermal Delivery. *Langmuir*. **2007**, 23, 1965–1973.
 60. Andrade, A. L., Souza, D. M., Pereira, M. C., Fabris, J. D. & Domingues, R. Z. Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles coated with silica through a sol-gel approach. *Cerâmica (São Paulo)*. **2009**, 55, 420–424.
 61. Alves, M. N., Nesterenko, P. N., Paull, B., Haddad, P. R. & Macka, M. Separation of superparamagnetic magnetite nanoparticles by capillary zone electrophoresis using non-complexing and complexing electrolyte anions and tetramethylammonium as dispersing additive. *Electrophoresis*. **2018**, 39, 1429–1436.
 62. Machado, V. d. O. Desenvolvimento De Nanopartículas Para Aplicações Biomédicas. **2018**, 74p. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro, Instituto Militar De Engenharia.
 63. Andrade, Â. L. *et al.* Magnetically induced heating by iron oxide nanoparticles dispersed in liquids of different viscosities. *Ceram. Int*. **2020**, 46, 21496–21504.
 64. Palacio, J., Orozco, V. H. & López, B. L. Effect of the molecular weight on the physicochemical properties of poly(lactic acid) nanoparticles and on the amount of ovalbumin adsorption. *J. Braz. Chem. Soc*. **2011**, 22, 2304–2311.
 65. Komatsu, D. *et al.* Development of a membrane of poly (L-co-D,L lactic acid-co-trimethylene carbonate) with aloe vera: An alternative biomaterial designed to improve skin healing. *J. Biomater. Appl*. **2017**, 32, 311–320.
 66. Martins, K. F., Messias, A. D., Leite, F. L. & Duek, E. A. R. Preparation and characterization of paclitaxel-loaded PLDLA microspheres. *Mater. Res. (São Carlos, São Paulo, Brazil)*. **2014**, 17, 650–656.
 67. Franzol, A. & Rezende, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. *Polímeros*. **2015**, 25, 1–9.
 68. Wang, N. *et al.* Magnetic nanoparticles (MNPs) covalently coated by PEO–PPO–PEO block copolymer for drug delivery. *J. Colloid Interface Sci*. **2013**, 395, 50–57.
 69. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N. & Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm*. **1989**, 55, R1–R4.
 70. Múzquiz-Ramos, E. M., Guerrero-Chávez, V., Macías-Martínez, B. I., López-Badillo, C. M. & García-Cerda, L. A. Synthesis and characterization of maghemite nanoparticles for hyperthermia applications. *Ceram. Int*. **2015**, 41, 397–402.
 71. Dobrovolskaia, M. A., Aggarwal, P., Hall, J. B. & McNeil, S. E. Preclinical Studies To Understand Nanoparticle Interaction with the Immune System and Its Potential Effects on Nanoparticle Biodistribution. *Mol. Pharm*. **2008**, 5, 487–495.
 72. Andrade, Â. L., Fabris, J. D., Ardisson, J. D., Valente, M. A. & Ferreira, J. M. F. Effect of Tetramethylammonium Hydroxide on Nucleation, Surface Modification and Growth of Magnetic Nanoparticles. *J. Nanomater*. **2012**, 1–10.
 73. Teófilo, R. F. & Ferreira, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Quim. Nova*. 2006, 29, 338–350.
 74. Hyeon, T. Chemical synthesis of magnetic nanoparticles. *Chem. Commun*. **2003**, 8, 927–934.
 75. Baruah, J. *et al.* Modelling and optimization of factors influencing adsorptive performance of agrowaste-derived Nanocellulose Iron Oxide Nanobiocomposites during remediation of Arsenic contaminated groundwater. *Int. J. Biol. Macromol*. **2020**, 164, 53–65.
 76. Yee, O. S. *et al.* Green Synthesis of [Fe.sub.3][O.sub.4] Nanoparticles Stabilized by a Garcinia mangostana Fruit Peel Extract for Hyperthermia and Anticancer Activities. *Int. J. Nanomedicine*. **2021**, 16, 2515.

77. Jamir, M., Islam, R., Pandey, L. M. & Borah, J. P. Effect of surface functionalization on the heating efficiency of magnetite nanoclusters for hyperthermia application. *J. Alloys Compd.* **2021**, 854, 157248.
78. Dutz, S. & Hergt, R. Magnetic nanoparticle heating and heat transfer on a microscale: Basic principles, realities and physical limitations of hyperthermia for tumour therapy. *Int. J. Hyperth.* **2013**, 29, 790–800.
79. Namduri, H. & Nasrazadani, S. Quantitative analysis of iron oxides using Fourier transform infrared spectrophotometry. *Corros. Sci.* **2008**, 50, 2493–2497.
80. Machado, V. de O. *et al.* Development of a novel nano-biomaterial for biomedical applications. *Mater. Res. Express.* **2018**, 5, 125014.
81. Ruckenstein, E. & Yuan, Y. Molten ring-open copolymerization of L-lactide and cyclic trimethylene carbonate. *J. Appl. Polym. Sci.* **1998**, 69, 1429–1434.
82. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J. Control. release.* **2016**, 235, 337–351.
83. SCHWARZ, C. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery II. drug incorporation and physicochemical characterization. *J. Microencapsul.* **1999**, 16, 205–213.
84. Belaïd, S. *et al.* A new approach to follow the formation of iron oxide nanoparticles synthesized by thermal decomposition. *Nanotechnology.* **2013**, 24, 055705.
85. Farrell, E. & Brousseau, J.-L. Guide for DLS sample preparation. *Brookhaven Instrum.* **2014**, 1, 1–3.
86. Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R. & Delie, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, 69, 1–9.
87. Yan, L. *et al.* Biocompatibility evaluation of magnetosomes formed by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Mater. Sci. Eng.* **2012**, C 32, 1802–1807.
88. Dey, R. K. & Ray, A. R. Synthesis, characterization, and blood compatibility of polyamidoamines copolymers. *Biomaterials.* **2003**, 24, 2985–2993.

