CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS



Dissertação de Mestrado

MARIELA ALVES E SILVA

Processamento e Caracterização de Magnetita Sintética

BELO HORIZONTE
OUTUBRO DE 2017

Mariela Alves e Silva

Processamento e Caracterização de Magnetita Sintética

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais do CEFET-MG, na área de concentração de Ciência e Desenvolvimento de Materiais, na Linha de Pesquisa em Biomateriais, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva

Belo Horizonte
Outubro de 2017

Silva, Mariela Alves e.
S586p Processamento e caracterização de magnetita sintética / Mariela Alves e Silva. – 2017.
96 f. : il., fotos, grafs., tabs.
Orientador: Sidney Nicodemos da Silva

Dissertação (mestrado) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais, Belo Horizonte, 2017.
Bibliografia.

1. Magnetita - Síntese. 2. Precipitação (Química). 3. Nanopartículas. 4. Biomateriais - Testes. I. Silva, Sidney Nicodemos da. II. Título.

CDD: 620.11299

Ficha elaborada pela Biblioteca - Campus I – CEFET-MG
Bibliotecário: Wagner Oliveira Braga CRB6 - 3261

CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

CEFET-MG

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE MATERIAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO "PROCESSAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MAGNETITA SINTÉTICA"

Autora: Mariela Alves e Silva

Orientador: Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:

Prof. Dr. Sidney Nicodemos da Silva (ORIENTADOR)
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG

Profª. Drª. Ivete Peixoto Pinheiro
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG

Profª. Drª. Daniele Marra de Freitas Silva Azevedo
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFET/MG

Belo Horizonte, 09 de Outubro de 2017.

´´As palavras de amizade e conforto podem ser curtas e sucintas,
mas o seu eco é infindável. ``

(Madre Teresa de Calcutá)

AGRADECIMENTOS

Em especial a meu pai (*in memorian*), e à minha querida Victória (*in memorian*), que mesmo na distância física, e apesar da imensa saudade, estão sempre norteando e iluminando meus pensamentos.

À minha mãe, exemplo forte de luta, que sempre foi meu esteio em todos os momentos. Ao Marcelo, irmão querido, pela cumplicidade, força e carinho, mesmo que distante.

Ao meu marido, Gutenberg, que suportou juntamente comigo momentos muito difíceis, e que para mim é exemplo de persistência, dedicação, objetividade, retidão e caráter. Você é meu maior exemplo!

À Maria Victória, pelo olhar de amor, e por muitos... muitos abraços quentinhos que me fizeram continuar. Você não tem a dimensão do que provoca em mim!

Ao Professor Sidney, pela orientação, pelas ideias ao longo do caminho, e por sua paciência.

À Funed, através da Dra. Luciana Maria Silva, que colaborou com a pesquisa.

À Cristhiane, a qual não tenho como mensurar minha gratidão, por tudo que me ensinou, pela paciência, pelas vezes que me confortou (e foram muitas), por me ensinar persistência, e pelos momentos de grande, grande crescimento que passamos juntas. A sua amizade é para a vida toda, Flor!

À Gilvânia, minha eterna diretora, pelo apoio e humanidade!

À Vitória, e a todos do laboratório que me auxiliaram com boa vontade e me ensinaram durante este tempo o quanto um colega pode ser importante.
Aos professores do POSMAT, pelo conhecimento adquirido ao longo da jornada.

RESUMO

As magnetitas sintéticas despertam atualmente interesse científico e tecnológico devido ao grande potencial de aplicação nos campos industrial (dessulfurização de combustíveis, catálise, química analítica na extração de fases sólidas), no meio ambiente (remediação de águas, armazenamento de energia térmica, decomposição térmica de efluentes gasosos), e sobretudo na área da saúde (biossensor, liberação controlada de drogas, hipertemia, teranósticas e/ou nanobiotecnologia). Na literatura a magnetita sintética tem papel de destaque na área biomédica, tanto no diagnóstico, quanto no tratamento de várias doenças. No presente trabalho, buscou-se sintetizar a magnetita na forma de nanopartículas magnéticas (NPMs) de óxidos de ferro (magnetita e maghemita) por meio do método de coprecipitação de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em meio alcalino. O objetivo do trabalho foi realizar a síntese e a funcionalização da magnetita com ácido cítrico (dispersão dos agregados de NPM), posteriormente a caracterização físico química e avaliação da viabilidade celular *in vitro*. A viabilidade celular por contato direto com as partículas foi avaliada por meio da diferenciação de células vivas ou mortas (ensaio de Azul de Tripan), com plaqueamento de $2x10^4$ células por mL. Após a síntese e tentativa de funcionalização das NPMs, procedeu-se a caracterização da magnetita sintética através das técnicas de difração de raios X (DRX), Fluorescência de raios X (FRX), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), medição de potencial zeta, análise de área superficial e porosidade por adsorção de N_2 (BET), espectroscopia Mössbauer e ensaio de magnetização. Observou-se através do MEV uma distribuição de tamanhos de aglomerados formada por clusters micrométricos (maior que $10\mu m$), possivelmente constituídos de nanopartículas. Estes aglomerados possuem características superparamagnéticas identificadas pelo ensaio de magnetização. A composição química e de fases são compatíveis com as magnetitas sintetizadas encontradas na literatura. A tentativa de funcionalização com ácido cítrico não se mostrou efetiva na concentração estudada neste trabalho. À priori, o ácido cítrico deveria fica adsorvido à superfície das nanopartículas impedindo a aglomeração por impedimento estérico e eletrostático. A resposta biológica através do teste de azul de tripan das amostras, funcionalizadas ou não, apresentaram na concentração de 0,75mg/mL e 0,375mg/mL maior viabilidade celular. Diante dos ensaios realizados, conclui-se que as amostras não são citotóxicas e apresentam propriedade superparamagnética, portanto, apresentam potencial para uso em terapia de tratamento de câncer.

Palavras-chave: magnetitas sintéticas, síntese, coprecipitação, citotoxicidade.

ABSTRACT

The synthetic magnetite arouse scientific and technological interest currently due to the large potential for application in industrial fields (desulphurization of fuels, catalysis, analytical chemistry in the extraction of solid phases), in the environment (water remediation, thermal energy storage, decomposition of thermal effluent gases) and especially in the health area (biosensor, controlled release of drugs, hypertemia, theranostics and/or nanobiotechnology). The synthetic magnetite have leading role in biomedical area, both in the diagnosis, and treatment of various diseases. In the present work were synthesized magnetic nanoparticles (NPMs) iron oxides (magnetite and maghmite) through the coprecipitation method of Fe^{2+} and Fe^{3+} ions in alkaline medium. The objective of the work was to perform the synthesis and functionalization of magnetite with citric acid (dispersion of NPM aggregates), after physical chemical characterization and evaluation of cell viability in vitro (in the following concentrations of particles: 1.50; and 0.375mg / mL). Cell viability by direct contact with the particles was evaluated by differentiation of living or dead cells (Tripan Blue assay), with palliation of $2x10^4$ cells per mL. After the synthesis, we proceeded to the characterization of synthetic magnetite by X-ray diffraction (XRD), X-ray fluorescence (FRX), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), zeta potential measurement, surface area and porosity analysis by N_2 adsorption (BET), Mössbauer spectroscopy and magnetization assay. A distribution of agglomerate sizes formed by micrometer clusters (greater than 10 μm), possibly consisting of nanoparticles, was observed through the SEM. These clusters have the paramagnetic characteristics identified by the magnetization assay. The chemical and phase composition are compatible with the synthesized magnetite found in the literature. The attempt of functionalization with citric acid was not effective in the concentration studied in this work. A priori, the citric acid should be adsorbed to the surface of the nanoparticles preventing the agglomeration by steric and electrostatic impediment. The biological response by test tripan blue of the samples, functionalized or not, presented in the concentration of 0.75mg / mL and 0,375mg / mL greater cell viability. Considering the tests carried out, it is concluded that the non-cytotoxic samples and present superparagnetic properties, therefore, present potential for use in cancer treatment therapy.

Keywords: synthetic magnetite, synthesis, coprecipitation, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema da funcionalização de NPAg com o PVA após a mistura de ambos. 19
Figura 2 (A e B): Representação da estrutura cristalina da magnetita 21
Figura 3 - Esquema representativo dos estágios de sinterização em fase sólida. 25
Figura 4 - Estimativa de incidência de câncer no Estado de Minas Gerais e na capital Belo Horizonte 27
Figura 5 - Dedução da lei de Bragg 35
Figura 6 - Representação esquemática do ângulo de orientações cristalográficas 36
Figura 7 - Espectros de FTIR de amostras de óxidos de ferro 37
Figura 8 - Representação ideal do processo de fluorescência nuclear 39
Figura 9 - Níveis de energia no efeito Mössbauer. 39
Figura 10 - Parâmetros da curva de histerese 41
Figura 11 - Curvas de magnetização e histerese 43
Figura 12 - Tipos de isoterma, de acordo com a IUPAC 45
Figura 13 - Classificação de histerese de adsorção e dessorção 46
Figura 14 - Representação de distribuição de cargas de uma partícula carregada 47
Figura 15 - Curva do potencial zeta da magnetita em função do pH. 48
Figura 16 - Representação esquemática de câmara de Neubauer 52
Figura 17 - Detalhamento da câmara de Neubauer 52
Figura 18 - Fluxograma das etapas da pesquisa. 54
Figura 19 - Esquema da rota de Sistema utilizado na síntese da magnetita e a montagem experimental. 55
Figura 20 - Amostra de magnetita sintetizada 64
Figura 21 - Microscopia eletrônica de varredura de magnetita após a síntese. 65
Figura 22 - Microscopia eletrônica de varredura de magnetita após funcionalização. 66
Figura 23 - Difratograma raio X da amostra de magnetita sintetizada na UFMG. 67
Figura 24 - Espectro de FTIR da amostra sintética. 68
Figura 25 - Espectro Mössbauer de magnetita sintetizada à temperatura ambiente utilizando a geometria de transmissão. 69
Figura 26 - Comparação das magnitudes de magnetização entre magnetita sintética (produzida na dissertação) e uma magnetita natural obtido do laboratório da Phosther. 71
Figura 27 – Isotermas da amostra de magnetita sintética 73
Figura 28 - Resultado de potencial zeta da amostra de magnetita sintética 75
Figura 29 - Monocamada das células WI-26 VA4 cultivadas em frascos tratados para adesão (poliestireno) em aumento de 20x. 76
Figura 30 - Placas de 6 poços contendo amostras magnetita sintética e natural (1 e 2), magnetita não funcionalizada e funcionalizada (3 e 4), e poços utilizados para controle positivo e negativo (5 e 6). 81

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Diluição seriada após 24 horas de incubação. 77
Gráfico 2 - Diluição seriada após 48 horas de incubação. 77
Gráfico 3 - Média das absorbâncias óticas em função da concentração de nanopartículas 79
Gráfico 4 - Análise da viabilidade celular em função da concentração de nanopartículas 79
Gráfico 5 - Média da viabilidade celular de amostra funcionalizada pós 48 h. 83
Gráfico 6 - Média da viabilidade celular de amostra funcionalizada pós 72 h 83
Gráfico 7 - Média da viabilidade celular de amostra não funcionalizada pós 48 h 84
Gráfico 8 - Média da viabilidade celular de amostra não funcionalizada pós 72 h 84
Gráfico 9 - Comparação da viabilidade celular entre amostras funcionalizadas e não funcionalizadas 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Bandas de IR de diferentes óxidos de ferro. 37
Tabela 2 - Resultado de EDX da magnetita sintética 64
Tabela 3 - Parâmetros hiperfinos dos espectros Mössbauer de Fe^{57} obtidos a temperatura ambiente 70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMSO - Dimetilsulfóxido

DRX - Difração de raios X

DSC - Calorimetria diferencial de varredura

FTIR - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Kg= quilograma

M= molar

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

mg= miligrama

mL= mililitro

MTT = brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio

nm = nanômetro

NPMs= nanopartículas magnéticas

pH - potencial hidrogeniônico

TGA - Análise termogravimétrica

µg – Micrograma (10^{-6} grama)

µL= microlitro (10^{-6} litro)

µM - Micromolar (10^{-6} Molar)

PBS = phosphate buffered saline (tampão fosfato-salino)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
2. JUSTIFICATIVA 13
3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS 14
3.1 Objetivo Geral 14
3.2 Objetivos Específicos 14
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15
4.1 Nanotecnologia 15
4.2. Nanopartículas Magnéticas 16
4.2.1 Aplicações biomédicas de Nanopartículas Magnéticas 17
5. MAGNETITA (Fe_3O_4) 20
5.1. Rotas de Síntese da magnetita 22
5.1.1. Co-precipitação 23
5.1.2. Método hidrotermal 23
5.1.3. Método sol-gel 23
5.1.4. Moagem de altas energias 24
6. CÂNCER 27
6.1. Tratamentos - Terapias utilizadas 28
6.2. Efeitos colaterais da quimioterapia 29
7. HIPERTERMIA 31
8. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO 34
8.1. Espectroscopia de fluorescência de raio X 34
8.2. Microscopia eletrônica de varredura 34
8.3. Difração de raios X (DRX) 35
8.4. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourrier (FTIR) 36
8.5. Espectroscopia Mössbauer 38
8.6. Magnetização 40
8.7. Análise de área superficial e porosidade por adsorção de N_2 (BET) 44
8.8. Potencial Zeta 47
9. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA 50
9.1. Testes de Citotoxicidade 50
9.1.1 Teste de viabilidade celular pelo método de MTT 50
9.1.2 Teste de Difusão em Ágar 51
9.1.3 Teste de Azul de Tripan (tripsinização) 51
10. MATERIAIS E MÉTODOS 54

10.1. Síntese das nanopartículas 54
10.2. Funcionalização das nanopartículas 56
10.3. Caracterização química estrutural 56
10.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 57
10.3.2 Difração de Raio X (DRX) 57
10.3.3 Espectroscopia Mössbauer 57
10.3.4 Ensaio de Magnetização 58
10.3.5 Análise de área superficial e porosidade por adsorção de N2 (BET) 58
10.3.6 Medição do Potencial Zeta 58
10.4. Testes Biológicos 58
10.4.1 Viabilidade celular pelo método de MTT 59
10.4.1.1 Cultivo celular de células fibroblastos Wi-26 VA4 59
10.4.1.2 Manutenção das culturas celulares 59
10.4.1.3 Preparo das amostras para ensaios de citotocixidade 59
10.4.1.4 Diluicão Seriada 60
10.4.1.5 Viabilidade celular pelo método de MTT com exposição das amostras 60
10.4.2 Avaliação de citotoxicidade pelo método de difusão em ágar 61
10.4.3 Viabilidade celular pelo método de Azul de Tripan 62
10.4.3.1 Cultivo celular de células RKO-AS45-1 (ATCC®CRL-2579™) 62
10.4.3.2 Manutenção das culturas celulares 62
10.4.3.3 Preparo das amostras para ensaio de citotocixidade 63
10.4.3.4 Viabilidade celular pelo método de Azul de Tripan com exposição das amostras 63
11. RESULTADOS E DISCUSSÃO 64
11.1. Caracterização química estrutural de amostra após a síntese 64
11.1.1 Espectroscopia de fluorescência de raios X (EDX) 64
11.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) 65
11.1.3. Difração de raio X - DRX 67
11.1.4. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) 68
11.1.5. Espectroscopia Mössbauer 69
11.1.6. Magnetização 71
11.1.7 Análise de área superficial e porosidade por adsorção de N_2 (BET) 73
11.1.8 Potencial Zeta 74
11.2. Caracterização biológica 76
11.2.1 Cultivo Celular 76
11.2.2 Diluição Seriada 76

11.2.3 Ensaio de citotoxicidade pelo método de MTT 78
11.2.4 Ensaio de citotoxicidade por difusão em ágar 80
11.2.5 Teste de Azul de Tripan 82
12. CONCLUSÃO 87
13. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS 89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 90

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2012 o câncer foi responsável por uma das maiores taxas de mortalidade em todo o mundo, aproximadamente 8,2 milhões de pessoas foram vitimadas pela doença. Estima-se que 70% de todas as mortes por câncer, em 2012, ocorreram na África, Ásia, América Central e América do Sul, e que haverá aumento dos casos da doença de 8,2 milhões em 2012 para 22 milhões nas próximas duas décadas.

Os tratamentos de escolha englobam cirurgia, radioterapia e a quimioterapia. Há limitações e desvantagens nestes tratamentos, visto que a doença se apresenta de forma particular em cada paciente. O tipo de câncer, tamanho e localização do tumor, e a presença de metástase podem limitar o tratamento determinando assim seu sucesso ou fracasso. A cirurgia não é válida para todo tipo de tumor e os tratamentos de radioterapia e quimioterapia não tratam somente células doentes, atingindo também as células saudáveis e provocando vários efeitos colaterais como: fadiga, vômitos, diarreias, queda de cabelo e a longo prazo a infertilidade, anemia e até mesmo leucemia (GUBIN, 2005). Mediante as desvantagens e limitações dos tratamentos utilizados justifica-se a procura por tratamentos mais específicos e com menos efeitos colaterais.

Na área da nanotecnologia, as nanopartículas magnéticas são utilizadas no diagnóstico de câncer como agente de contraste para ressonância magnética por imagem (RMI). O Lumirem e o Feridex são os agentes de contraste aprovados para uso clínico. Através da RMI é possível detectar lesões pequenas e iniciais da doença aumentando assim a possibilidade de cura da mesma (GUPTA, 2005; SUN et al, 2004; SALABAS, 2007).

Atualmente, as pesquisas objetivam estudar o uso de nanopartículas no tratamento de câncer para atuar tanto como sistemas magnéticos para carreamento e liberação controlada de fármacos, quanto para agentes promotores de hipertermia magnética (FERREIRA, 2013).

2. JUSTIFICATIVA

A utilização de nanopartículas magnéticas têm se mostrado método bastante promissor como possibilidade de tratamento para câncer, pois reduz a citotoxicidade e direciona, com auxílio de um campo magnético, a partícula com o fármaco diretamente ao alvo de escolha.

Dados do Instituto Nacional de Câncer - José Alencar Gomes da Silva (INCA, 2017) apontam no Brasil a ocorrência de 420 mil novos casos de câncer, no biênio de 2016-2017, excetuando-se desta estatística os cânceres de pele não melanoma (aproximadamente 180 mil de novos casos). Dentre os casos de câncer com maior magnitude para o ano de 2016, no Brasil, o câncer colorretal é um dos tipos que pode ser prevenido através da detecção precoce. O sucesso do tratamento depende diretamente de um diagnóstico precoce. Dentro deste contexto, o desenvolvimento de nanopartículas para tratamento de câncer colorretal busca contribuir para o conhecimento do uso deste material como possibilidade de tratamento deste tipo de câncer que apresenta elevada magnitude, no qual o primeiro tratamento de escolha é cirúrgico.

Aumento do número de casos de câncer no mundo (e.g. brasileiro 600 mil novos casos no biênio 2016-2017), alertam para necessidade de desenvolvimento de novas formas de diagnósticos ou terapias. Destaca-se entre as novas terapêuticas para tratamento de cânceres muito agressivos vem sendo aprimoradas, o emprego da hipertemia através da utilização de magnetitas sintéticas na forma de nanopartículas magnéticas (NPMs). Essas NPMs apresentam um comportamento superparamagnético a 300K (temperatura ambiente), com coercividade magnética insignificante (no entanto, o tamanho de cristalito pode alterar essas propriedades magnéticas e biológicas de excreção). Alguns exemplos destas aplicações de NPMs no diagnóstico e/ou tratamento de câncer de colorretal e do colo do útero. Em ambos os casos o sucesso do tratamento está relacionado ao diagnóstico precoce. Atualmente de forma canônica, o primeiro tratamento de escolha é cirúrgico, seguido da quimioterapia e radioterapia. Infelizmente sem muito sucesso com uma taxa de sobrevida menor do que 5 anos após o diagnóstico da doença.

3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

3.1 Objetivo Geral

Sintetizar magnetita, funcionalizá-las com ácido cítrico e caracterizá-las através das técnicas de caracterizações físico química e biológica.

3.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar nanopartículas magnéticas por coprecipitação.
- Funcionalizar nanopartículas com ácido cítrico.
- Caracterizar físico-quimicamente a magnetita não funcionalizada mediante as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV/EDS), espectroscopia fluorescência de raios X (FRX); difração de raios X (DRX); espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR); Análise de área superficial e porosidade por adsorção de N_2 (BET); medição do Potencial zeta; espectroscopia Mössbauer e magnetização.
- Caracterizar fisicamente a magnetita funcionalizada através de microscopia eletrônica de varredura.
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* das amostras, através do teste de azul de tripan, teste de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio) e teste de Difusão em Ágar.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia é o ramo da ciência aplicado à preparação e manipulação de materiais com propriedades desenhadas para uso prático em uma determinada aplicação (GUBIN et al. 2005).

> "É uma plataforma tecnológica que utiliza as propriedades únicas da matéria em nanoescala, ou em forma compacta, em nanodispersões nas quais os fenômenos físicos estão dominados por forças como: Van der Walls, pontes de hidrogênio, carga eletrônica, hidrofobicidade e o efeito túnel da mecânica quântica" (ORTEGA, 2014, p. 12).

Nas últimas décadas, houve um grande desenvolvimento da pesquisa acerca de materiais nanométricos. Estudos de conhecimento e desenvolvimento destes materiais tiveram progresso e favoreceram o aparecimento de materiais com grande potencial tecnológico (GUBIN et al, 2005).

Um material ou partícula é considerado nanométrico se possuir no máximo 100 nanômetros (100 nm) e sua origem pode ser orgânica, inorgânica ou biológica. Para aplicações farmacêuticas ou biomédicas, a faixa de tamanho adotada é de 5 –1000 nm (FARAJI,2009; HAMIDI et al, 2008, BÊDE, 2010).

Um material nanométrico pode apresentar propriedades diferentes do mesmo composto em sua forma macroscópica (GUBIN et al, 2005; ORTEGA, 2014). Pode-se classificar os nanomateriais em compactos e nanodispersões. Dentro da classificação de materiais compactos se encontram os nanoestruturados que são compostos de unidades nanométricas de mesma composição, estas unidades se repetem criando assim uma estrutura macroscópica ordenada. Já as nanodispersões as unidades são homogêneas e dispersas em um meio vazio, líquido, sólido ou gasoso, e se encontram separadas umas das outras variando de acordo com o meio de dispersão e as características do material (FREITAS, 2005; GUBIN et al, 2005).

4.2. Nanopartículas Magnéticas

As nanopartículas magnéticas (NPMs) são materiais nanoestruturados entre 1 e 100nm de diâmetro que direcionam sua movimentação na presença de campo magnético (BATLLE, 2002; GUBIN, 2005).

Geralmente as NPMs são compostas por um metal ligado diretamente a um óxido de ferro, desta forma os sistemas magnéticos nanoparticulados podem fazer ligação com metais de transição (Mn, Co, Ti) e também podem formar as nanopartículas de óxidos metálicos ($FeO.Fe_2O_3$, NiO, FeO). A magnetita é a principal representante da classe de NPMs de óxidos metálicos por apresentar muitas aplicações no ramo tecnológico (SUN, 2004).

As NPMs apresentam peculiaridades quanto às suas propriedades físico-químicas. Propriedades como estrutura cristalina, morfologia, e tamanho das partículas estão correlacionadas com o método de síntese das NPMs e o controle de seus parâmetros como pH, temperatura, concentração de reagentes (SALABAS, 2007).

O tamanho e a superfície das NPMs têm grande influência nas propriedades dos sistemas magnéticos. As nanopartículas com diâmetro menor do que 20 nm formam um domínio magnético, porém quando o diâmetro é maior as NPMs tendem a se dividir em vários domínios para que a energia magnetostática diminua. Domínios são regiões de magnetização uniformes e separadas por uma região de transição (parede de domínio) que minimiza a energia magnética interna livre. Nanopartículas com dimensões reduzidas possuem também o tamanho do domínio reduzido, assim alterando a estrutura e a largura das paredes dos mesmos. Desta forma as NPMs com tamanho inferior a 20 nm (diâmetro crítico) apresentam os seus momentos magnéticos alinhados na mesma direção como se fossem um monodomínio magnético promovendo a configuração mais favorável e com características de superparamagnetismo (GUPTA, 2005).

A magnetização ocorre através do deslocamento das paredes de domínio ou pelo movimento de rotação dentro de cada domínio. Outras características são influenciadas pelo diâmetro das NPMs como, por exemplo: o tempo de permanência

no organismo, a velocidade com a qual ultrapassam a barreira endotelial e o reconhecimento pelo sistema fagocitário quando administrada a um ser vivo (via endovenosa, intraperitoneal ou diretamente injetada na área neoplásica). Quando estão em tamanho diminuto (menor que 20 nm) na grande maioria de átomos do material se concentram na superfície. Em sua superfície a nanopartícula apresenta efeito de superfície concentrando grande parte dos momentos magnéticos devido à quebra de simetria de sua rede cristalina. Assim, a razão superfície/volume das NPMs aumenta afetando propriedades químicas e magnéticas tornando-as de fácil funcionalização com os mais diversos compostos (LACAVA, 2004). A uniformização de parâmetros físicos envolvidos na síntese é de extrema importância para o controle do tamanho, morfologia, distribuição, cristalinidade, propriedades magnéticas, e desempenho das NPMs em sistemas complexos (SOUZA, 2011).

4.2.1 Aplicações biomédicas de Nanopartículas Magnéticas

A nanotecnologia tem como interesse a utilização de materiais magnéticos nanoestruturados em aplicações terapêuticas e diagnósticas. Os sistemas formados por materiais magnéticos podem ser distribuídos de duas formas: em meio sólido, como nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) ou maghemita (γ-Fe_2O_3) ou em meio líquido (ferrofluido). A escolha do sistema a ser utilizado depende das propriedades desejadas, tipo de tratamento e sistema biológico no qual será aplicado (SALABAS, 2007; HUBER, 2005).

O tamanho das NPMs vem despertando interesse da área biotecnológica, pois seu tamanho médio é menor ou comparável com o de vírus (20 a 450 nm), proteínas (5 a 50 nm) e genes (2 nm de largura e de 10 a 100 nm de comprimento) (PANKHURST, 2003).

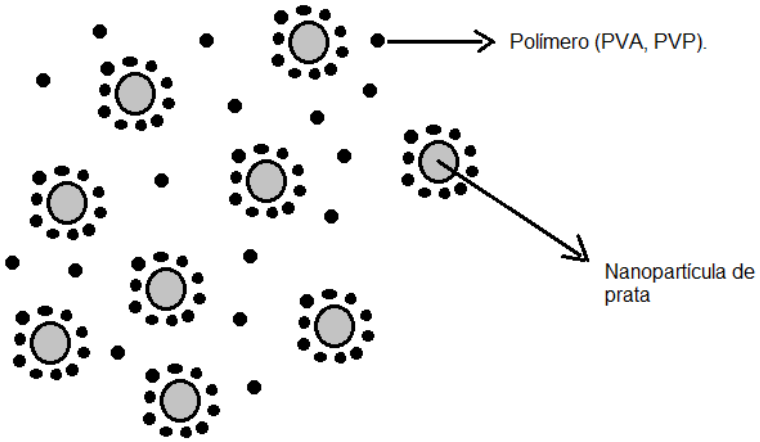
Além disso, a possibilidade de manipulação das NPMs utilizando um campo magnético externo para transporte e aplicação *in vivo* de modo não invasivo as tornam promessa de sucesso nos tratamentos quimioterápicos (PANKHURST, 2003).

A variabilidade de aplicações (hipertermia, melhoria de imagens de ressonância nuclear magnética, liberação controlada de drogas, biossensores, dentre outras na área da saúde) se deve a funcionalização das NPMs. Quando funcionalizadas apresentam um núcleo magnético envolto por uma camada polimérica que pode conter sítios ativos ancorando compostos orgânicos seletivos ou metais (PANKHURST, 2003; RINALDI, 2009; SALABAS, 2007).

O uso *in vivo* exige a estabilidade das NPMs. Esta estabilidade é alcançada utilizando um recobrimento que impedirá a aglomeração que é comum quando as nanopartículas estão em solução. Podem formar pequenos agregados (floculação) ou agregados mais densos (coagulação) dependendo do tempo de repouso da solução. O recobrimento também pode melhorar as características das NPMs tornando-as solúveis em água, com baixa toxicidade, com boa biocompatibilidade e ainda pode agregar grupos funcionais à superfície das nanopartículas que poderão evitar a captação imediata do sistema retículo endotelial, e finalmente evitar a ligação do ferro com elementos do sangue (GAOA, 2009). Para facilitar a procura do alvo específico (célula, tecido ou órgão) é necessário o recobrimento das NPMs com agentes biologicamente ativos como íons específicos, anticorpos, nucleotídeos, peptídeos, vitaminas, hormônios, antibióticos e outras moléculas (SILVA, 1997; SUN, 2008; SOUZA, 2011).

As nanopartículas tendem a se aglomerar, aumentar de tamanho e/ou precipitar, diminuindo sua vida útil. Os estabilizantes químicos impedem a aglomeração destas partículas, e em geral, são polímeros como PVP (polivinilpirrolidona), PVA (poliacetato de vinila), citrato de sódio ou ácido cítrico. Nesse caso, ocorre um tipo de estabilização chamada estérica, ou seja, estes estabilizantes envolvem a partícula impedindo a aproximação por atração eletroestática e a consequente a coalescência dos materiais coloidais (Figura 1).

Figura 1- Esquema da funcionalização de NPAg com o PVA após a mistura de ambos.



Fonte: Notas de Aula (Disciplina: Biomateriais e Engenharia de Tecidos)

Tanto o PVA (Acetato de Polivinila) e o ácido cítrico têm átomos de oxigênio na sua estrutura molecular, esses oxigênios atuam como centros básicos de Lewis na dispersão, favorecendo a interação ácido-base entre o agente funcionalizador das desaglomeração e as nanopartículas. Assim o agente da funcionalização fica adsorvido à superfície das nanopartículas impedindo a aglomeração por impedimento estérico e eletrostático.

5. MAGNETITA (Fe_3O_4)

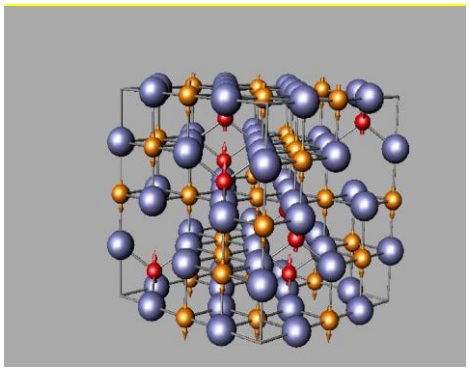
A magnetita é um mineral magnético formado pelos óxidos de ferro II e III, cuja fórmula química é Fe_3O_4. De forma geral a magnetita apresenta na sua composição, aproximadamente, 69% de FeO e 31% de Fe_2O_3 ou seja, 72,4% de ferro e 26,7% de oxigênio. O significado do seu nome tem a ver com a região onde foi encontrada pela primeira vez, ou seja, a região da "Magnésia" e quer dizer simplesmente a região das pedras mágicas. Na forma natural a magnetita possui colorações muito variadas, sendo por vezes até de difícil identificação. Contudo, na forma sintética é mais frequente nas colorações em tons de escuros (MARTINS, 2011; FÉLIX, 2017; RODRIGUES, 2017).

> "A magnetita é o óxido magnético mais abundante em rochas ígneas, metamórficas e sedimentares, sendo rara a sua ocorrência na forma pura, a qual possui magnetização de saturação teórica (σ) de 100 J T^{-1} kg^{-1} a 20ºC. Suas propriedades magnéticas e elétricas são funções não apenas de seus raios iônicos e de valência, mas também, das propriedades químicas e morfológicas, estequiométricas e tamanhos de partícula" (KARUNAKARAN, 2006; LIU, 2006).

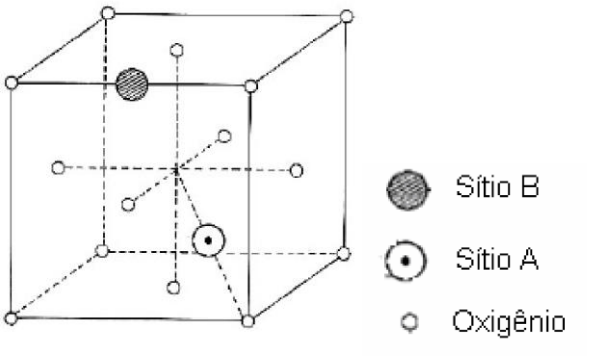
A magnetita, Fe_3O_4 ($Fe^{2+}Fe^{3+}O^{4-}$) é um óxido de ferro constituído pela presença de íons Fe^{2+} e íons Fe^{3+}, que se cristaliza em uma estrutura tipo espinélio invertido (do tipo AB_2O_4), onde os íons O^{2-} formam um arranjo cúbico denso de face centrada (CFC) e cátions do ferro ocupando sítios intersticiais tetraédricos e sítios octaédricos. Este arranjo acarreta uma estrutura ferro bivalente e trivalente que a torna diferente de outros óxidos, apresentando uma célula unitária com oito íons Fe^{3+} localizados no sítio tetraédrico (ou sítio A) e no sítio octaédrico (ou sítio B) 8 íons Fe^{3+} e 8 íons Fe^{2+}. Sua fórmula pode ser escrita da seguinte forma [Fe^{3+}8] {Fe^{3+} 8 Fe^{2+} 8} O 32, onde [ ] representa o sítio tetraédrico e { } o sítio octaédrico (MAGALHÃES, 2008; MARTINS, 2011) (Figura 2).

Figura 2 (A e B): Representação da estrutura cristalina da magnetita

A



B



Fonte: A – MAGALHÃES (2008),
B – CALLISTER (2002)

Em função da distribuição dos íons de Fe^{2+} e Fe^{3+} na rede cristalina (espinélio invertido) é que o torna um material com características magnéticas altamente relevantes para aplicações nas áreas de meio ambiente (remediação de águas, estocagem de energia térmica, qualidade de solos e alimentos), indústria (catalises, dessulfurizarão de combustíveis, análises químicas), e sobretudo na área da saúde por causa baixa toxicidade, biocompatibilidade e alta magnetização desta fase (MARTINS, 2011).

A energia de estabilidade preferencial para os íons de Fe^{3+} favorece a ocupação nos sítios tetraédricos enquanto que os íons de Fe^{2+} tendem a ocupar preferencialmente os sítios octaédricos. Entretanto, a magnetita por ser constituída por esses dois tipos de íons de ferro torna-se uma fase muito susceptível às condições ambientais, sofrendo com facilidade oxidação do Fe^{2+} para Fe^{3+}, o que leva a segregação de uma fase (metaestável) a maghemita (γ-Fe_2O_3), e está se transforma em hematita (α-Fe_2O_3) em temperaturas compreendidas entre 370ºC e 600 ºC (MAGALHÃES, 2008; MARTINS, 2011).

A magnetita é um óxido de cor escura e a maghemita em geral apresenta uma coloração marrom. Indicativo visual de qualidade do processamento pode ser adquirido quando se obtém um pó de cor preta, indicando um óxido mais puro em magnetita. Portanto, a síntese da magnetita conduzida na presença de atmosfera oxidante (ar atmosférico) é muito complexa e exige na maioria das técnicas de processamento que se trabalhe sob atmosfera inerte, em geral contendo nitrogênio.

Mesmo nestas condições a literatura reporta que a maioria dos produtos a base de magnetita, contém em pequenas quantidades a presença da fase antiferromagnética da hematita (Fe_2O_3), sem causar grandes prejuízos a sua propriedade magnética (MAGALHÃES, 2008; MARTINS, 2011; FERREIRA,2013; SOUZA, 2011).

O comportamento magnético da Fe_3O_4 leva a estudos nas mais diversas áreas de pesquisas tecnológicas com propriedades eletromagnéticas peculiares e várias aplicações promissoras como, por exemplo, em ferrofluidos, bioseparação, tratamento de hipertermia, ressonância magnética, catálise, dispositivos magnéticos, carreador de fármacos, entre outros (SOUZA, 2011; FERREIRA, 2013).

Estas propriedades e aplicações potenciais criaram uma tendência em todo o mundo para desenvolver estratégias relacionadas ao melhoramento dos métodos de processamento já existentes ou desenvolvimento de novos métodos de processamento para a fabricação desse material de forma a se obter um produto monofásico e com partículas de tamanho nanométrico. Recentemente, várias técnicas têm sido utilizadas para preparar nanoestruturas de Fe_3O_4, incluindo o método da co-precipitação, precipitação hidrotérmica, e síntese sol-gel. No entanto, todos esses métodos de síntese muitas vezes requerem um longo tempo de reação, necessitam de equipamento dispendioso, manipulação de grandes quantidades de sal ou de solventes orgânicos, e surfactantes, o que leva a necessidade urgente de desenvolver novas técnicas para a síntese rápida e eficiente de obtenção de nanoestruturas de Fe_3O_4 (SOUZA, 2011; FERREIRA, 2013).

5.1. Rotas de Síntese da magnetita

Na natureza a magnetita é naturalmente encontrada em rochas e solos, também em algumas bactérias e no cérebro de certos seres vivos, tais como abelhas e pássaros. Esse mineral também pode ser obtido no laboratório através de diversos processos de síntese, tanto por rotas físicas como químicas, entretanto o grande desafio é a produção de materiais com elevada estequiometria, uniformidade e diâmetro controlado através de técnicas que não poluam o meio ambiente e tenham custo relativamente baixo (MARTINS, 2011).

5.1.1. Co-precipitação

Essa é uma das rotas químicas mais simples para obtenção de magnetita. Nesse processo uma mistura estequiométrica de sais de ferro dupla e triplamente ionizados é preparada, e em seguida uma base é acrescida a mistura, para que a mesma fique com pH entre 8 e 14, e as partículas de magnetita possam ser precipitadas. Para controle do tamanho e da forma, fatores como pH, força iônica, temperatura e natureza dos sais podem ser variáveis. Com esse método é possível se obter partículas com diâmetro na faixe 5 a 100nm (FERREIRA, 2013).

5.1.2. Método hidrotermal

A síntese de magnetita pelo método hidrotermal tem sido comumente reportada na literatura. Esse processo é realizado em meio aquoso em autoclaves ou reatores com alta pressão de até $2000psi$ e temperatura de 200°C. Existem duas rotas para formação de magnetita via condições hidrotermais: hidrólise e oxidação ou neutralização de hidróxidos de metais mistos. Essas duas reações são muito similares, a diferença é que no primeiro método apenas de Fe^{+3} são utilizados. As variáveis que podem ser determinantes para obtenção do produto final são: escolha do solvente, temperatura e tempo de síntese. O tamanho da partícula é controlado mediante a taxa de nucleação (SOUZA, 2011).

5.1.3. Método sol-gel

O processo sol-gel tem se mostrado uma rota poderosa para síntese química de materiais nanoestruturados. Nesse método ocorre a transição sistema sol (dispersão de partículas coloidais estáveis em um fluido) para um sistema gel (formado pela estrutura rígida de partículas coloidais, gel coloidal, ou de cadeias poliméricas, gel polimérico) que imobiliza a fase líquida nos seus intersítios. Os géis coloidais resultam da agregação linear de partículas primárias, que ocorrem pela alteração das condições físico-químicas da suspensão. No caso de géis poliméricos, estes são geralmente preparados a partir de soluções onde se promovem reações de

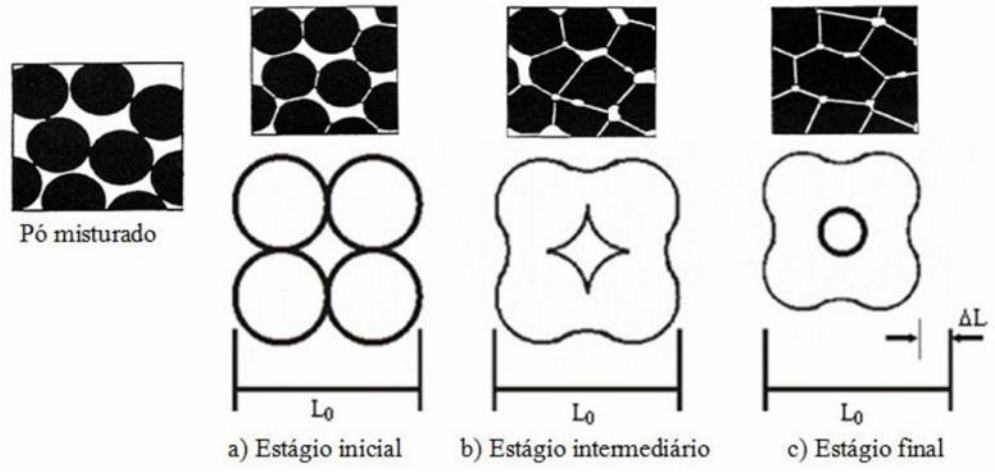
polimerização, portanto a gelatinização ocorre pela interação entre as longas cadeias poliméricas lineares (SOUZA, 2011).

5.1.4. Moagem de altas energias

Mechanical alloying (MA) é uma técnica de estado sólido para processamento de pós que envolve repetidas soldagens, fraturas e re-soldagem do pó em um moinho de alta energia. Devido às várias possibilidades de processamento dessa técnica esta pode ser aplicada à metais, cerâmicas, polímeros entre outros compostos materiais (MARTINS, 2011).

Durante o processo de moagem, as esferas que estão em movimento dentro do vaso colidem entre si e com as paredes do vaso, o pó que está presente entre os objetos em colisão sofre fraturas e soldagem a frio, o que leva a formação de compactos de pó, essas colisões durante a moagem podem ser representadas pela figura 3, onde estão ilustrados os três estágios do processo, o estágio inicial (a) ocorre a formação de contorno de grãos na área de contato entre as partículas, em seguida o estágio intermediário (b) caracterizado por uma lisa estrutura de cilindros interconectados e por fim o estágio final caracterizado pelo isolamento dos poros nas regiões de contorno de grãos e eliminação gradual da porosidade por difusão de vacâncias dos poros (MARTINS, 2011).

Figura 3 - Esquema representativo dos estágios de sinterização em fase sólida.



Fonte: CALLISTER (2002)

O processo de moagem de altas energias depende de fatores tais como: material precursor, o tipo de moinho, variáveis mecânicas e do tempo de processo. Os materiais precursores, são geralmente, pós puros, disponíveis comercialmente, que estão na escala micrométrica, mistura de partículas sólidas e líquidos também tem sido precursores de uma diversidade de materiais, nesse caso moagem recebe o nome de moagem úmida, se nenhum líquido está envolvido, então o processo é chamado de moagem a seco. Diferentes tipos de equipamentos são usados para moagem de alta energia para síntese de pós mecanicamente moídos. Entre esses equipamentos podemos citar:

- Moinhos vibratórios: Moinhos vibratórios (shakers), possuem uma capacidade de aproximadamente 10-20 g de pó. A variedade mais comum possui apenas um vaso ou recipiente de moagem, onde vão a amostra e as esferas de moagem. O vaso é fixado em uma braçadeira, e é balançado vigorosamente para frente e para trás centenas de vezes em um minuto, esse movimento é combinado com movimentos laterais, o que garante alta velocidade das esferas, já que possui uma velocidade de rotação em torno de 1200 RPM consequentemente, a força de impacto entre elas é grande.

- Moinhos planetários: Nesse tipo de moinho, apenas algumas centenas de gramas podem ser moídas, dependendo do volume do vaso e do tamanho do moinho. O moinho planetário recebeu esse nome devido ao movimento descrito

pelos vasos de moagem, que se parece com o movimento dos planetas. Eles são arranjados em um suporte rotativo e um mecanismo especial causa a rotação deles ao redor de seu eixo. Como o vaso e o suporte rotacionam em direções opostas, as forças centrífugas atuam alternadamente em direções opostas, fazendo com que as bolas de moagem causem o efeito de impacto devido ao seu movimento pelas paredes do vaso. Um único moinho pode ter duas ou quatro estações (vasos) de moagem

- Moinho Atritor: Os moinhos atritores podem moer grandes quantidades de pó, entre 0,5 à 40 Kg de uma única vez. Esse moinho consiste em um tambor horizontal giratório com pequenas bolas de aço. Assim que o tambor gira, as bolas caem no pó metálico, que fica retido na base. A taxa de moagem aumenta com o aumento da velocidade de rotação. Um atritor é um moinho de bolas capaz de gerar grandes energias, nesse moinho o tambor vertical possui um serie de rotores dentro de sua estrutura, que são distribuídos progressivamente em ângulos retos, os rotores aumentam a energia das bolas, causando redução no tamanho do pó. Esses equipamentos possuem uma rotação de aproximadamente 250 rpm (SOUZA, 2011).

O processo de síntese pode ser dividido em três estágios:

- Estágio inicial: caracterizado pela formação de contornos de grãos na área de contato entre as partículas ou formação e crescimento de interligações entre as partículas, a partir dos contatos estabelecidos durante o processo de compactação, conduzindo até o instante onde estes começam a se unirem.

- Estágio intermediário: onde há uma grande densificação do compacto, caracterizado por uma estrutura lisa na forma de cilindros interconectados, grande densificação remanescente, iniciando com 70 a 92% de porosidade e terminando com cerca de 8% de porosidade remanescente.

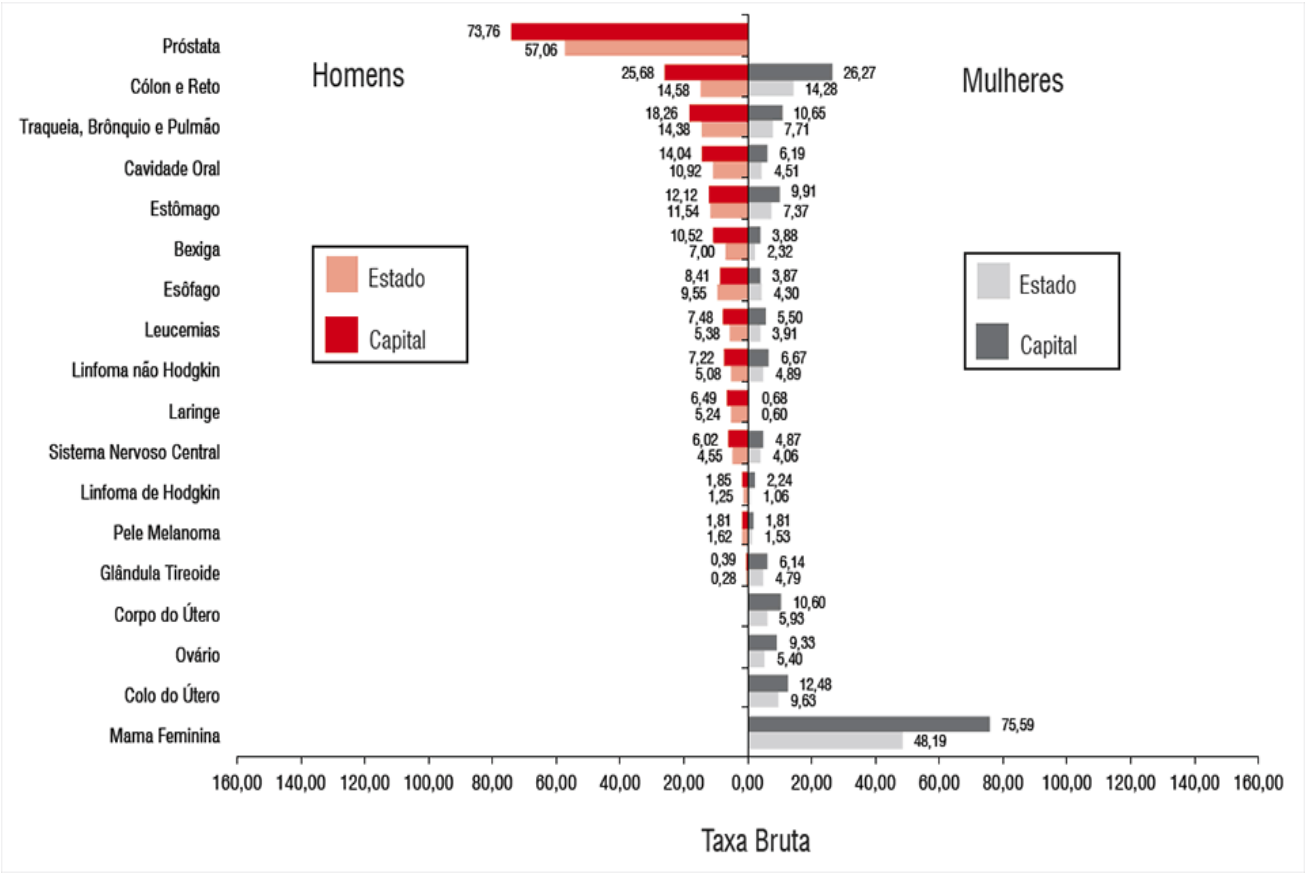
- Terceiro estágio: nesse terceiro e último estágio há um isolamento dos poros na região dos contornos de grão e eliminação gradual da porosidade por difusão de vacâncias dos poros ao longo dos contornos de grão com somente uma pequena densificação da estrutura (SOUZA, 2011).

6. CÂNCER

A homeostase e a funcionalidade dos tecidos são reguladas por diversos eventos fisiológicos responsáveis pela proliferação, apoptose, diferenciação e estágio celular. Um erro na sequência destes eventos promove alteração no mecanismo de morte, diferenciação, e proliferação celular conduzindo assim a um aumento de células desreguladas (CHADHA et al. 2008). O câncer é o conjunto de enfermidades que tem por característica a alteração do equilíbrio entre a proliferação e os mecanismos usuais de morte celular (GALINDO et al. 2010; ORTEGA, 2014).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (2016), o câncer de mama possui a maior incidência tanto no estado de Minas Gerais quanto em Belo Horizonte, em segundo lugar o câncer de próstata apresenta maior incidência (Figura 4).

Figura 4 - Estimativa de incidência de câncer no Estado de Minas Gerais e na capital Belo Horizonte



Fonte: INCA (2017)

A região sudeste apresenta o segundo maior índice de mortalidade por 100.000 mulheres, no Brasil, entre 1979 e 2013, para o câncer de mama, colo do útero, útero e ovário. A alta taxa de incidência e de mortalidade da doença mobiliza a classe científica na busca de tratamentos menos nocivos, mais específicos e mais eficazes, para que haja redução considerável no índice de mortalidade da doença.

6.1. Tratamentos - Terapias utilizadas

Os tratamentos quimioterápicos variam de acordo com o tipo de câncer e com a etapa na qual a doença se encontra. O tratamento é multidisciplinar para que a doença seja melhor controlada. O tratamento quimioterápico pode ser administrado da seguinte forma (CERVANTES, 2002; ANDRADE et al, 2013):

A) Quimioterapia de indução: é utilizada no tratamento de câncer avançado com objetivo de alcançar a remissão da doença, pode ter intenção de cura ou como paliativo.

B) Quimioterapia adjuvante: é realizada após o tratamento loco- regional cirúrgico ou radiológico, de um tumor. O objetivo é eliminar micrometástases residuais da doença.

C) Quimioterapia neo - adjuvante: é utilizada no tratamento primário do tumor no estágio clínico loco- regional antes da cirurgia, associado ou não a radioterapia.

Quanto as diferentes formas de aplicar a quimioterapia, elas podem ser por:

- via oral, por meio de comprimidos;
- intravenosa, com injeções na veia;
- intramuscular com injeções no músculo;
- subcutânea, no qual a injeção é aplicada por baixo da pele;
- Intracraneal – é a menos frequente e a aplicação do liquor acontece na espinha dorsal.

Há, também, a forma tópica em que o medicamento é aplicado na pele ou na mucosa, por meio líquido ou pomada.

A quimioterapia tem efeito sistêmico e pode ser combinada com a cirurgia ou a radioterapia, que atuam de forma local no organismo. A quimioterapia adjuvante complementa o tratamento local de tumores como o de mama, cólon e reto. É

importante ressaltar que cada indivíduo responde de maneira diferente ao tratamento e por isso a terapia individualizada se baseia em três pilares básicos: a histologia do tumor, a extensão da doença e a situação do paciente. De forma geral o tratamento de primeira escolha é aquele que tem maior efeito sobre a doença e promove a sobrevivência e a qualidade de vida do paciente (GALINDO et al, 2010; CALABRESI; CHABNER, 2003; ORTEGA, 2014).

A quimioterapia é feita com medicamentos que destroem as células doentes que compõem o tumor. Os efeitos colaterais da quimioterapia são resultado do uso de variadas drogas para cada tipo de tratamento. Esses medicamentos se misturam na corrente sanguínea, sendo levados para todo o corpo, destruindo, assim, as células do tumor, impedindo que elas se reproduzam e se espalhem. Vale ressaltar que a quimioterapia sozinha nem sempre é suficiente. Há alguns casos em que a radioterapia e as cirurgias eventualmente também se tornam necessárias (GALINDO et al, 2010; CALABRESI; CHABNER, 2003; ORTEGA, 2014).

6.2. Efeitos colaterais da quimioterapia

Os fármacos quimioterápicos agem na célula tumoral produzindo um efeito citotóxico e nos tecidos sadios um efeito tóxico. Estes efeitos tóxicos deveriam promover a erradicação total de um tumor, porém existem diferenças entre células normais e neoplásicas que não são suficientes para promover uma citotoxicidade seletiva que evitaria a toxicidade dos tecidos sadios (BARNETO et al., 2000).

A toxicidade pode aparecer desde a administração do fármaco, em diferentes níveis do tratamento, ocasionando reações sistêmicas que em casos mais graves podem se tornar crônicas, principalmente em caso de tratamento prolongado (OSORIO et al. 2008; ORTEGA, 2014).

Como reação, a quimioterapia pode acabar gerando queda de cabelo, feridas na boca, náusea, dores, vômito. A longo prazo pode ocasionar infertilidade, anemia e até mesmo leucemia. Quem realiza a quimioterapia pode passar por muitos efeitos colaterais, alguns ou nenhum – tudo depende da quantidade de quimioterápicos,

tempo de tratamento, e como seu corpo reage ao tratamento (NAGAHARA et al., 2009).

Raramente acontecem efeitos colaterais durante a aplicação da quimioterapia, no entanto, alguns efeitos indesejáveis podem ocorrer, dependendo do tipo de tratamento, nos dias seguintes. Estes eventos adversos são, em sua absoluta maioria, bem tolerados pelos pacientes e podem ser aliviados com algumas medicações e mudança em alguns hábitos. Os principais eventos sintomáticos são (NAGAHARA et al., 2009; ANDRADE et al., 2013):

- **Fraqueza:** as horas de descanso devem ser aumentadas e os esforços físicos precisam ser diminuídos consideravelmente. Familiares e amigos devem ajudar nas atividades pesadas de casa.
- **Diarreia:** uma alimentação equilibrada ajuda a diminuir esse efeito colateral. A recomendação é ingerir alimentos como arroz, queijo, ovos cozidos, purês e banana, que ajudam a “segurar” o intestino.
- **Aumento/Perda de peso:** é importante manter um acompanhamento com nutricionista, pois a redução ou o aumento de peso são comuns. Uma alimentação equilibrada é parte fundamental do sucesso do tratamento e grande aliada do bem-estar do paciente.
- **Feridas na boca (aftas):** manter a boca sempre limpa fazendo enxágues de água filtrada com uma colher de chá de bicarbonato de sódio. Alimentos gelados ajudam a anestesiar a boca, em caso de dores.
- **Queda de cabelos e outros pelos do corpo:** sem dúvida, esse é um dos efeitos mais polêmicos, mas essa situação é temporária. O paciente pode optar por perucas e lenços para melhorar o visual e usar a criatividade para não deixar de lado a vaidade.
- **Enjoos e vômitos:** evitar alimentos muito gordurosos ou com temperos fortes. Comer em pequenas quantidades e com mais frequência. Ressalta-se que o aconselhamento de um nutricionista é importante.
- **Tonturas:** podem ocorrer após as sessões. Por isso, é importante o paciente estar sempre acompanhado.

7. HIPERTERMIA

O câncer é tratado, atualmente, como uma epidemia global e apesar dessa grande expressividade epidemiológica a base terapêutica utilizada no combate ao câncer limita-se a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia. Esses tratamentos apresentam uma série de limitações e efeitos adversos. Várias pesquisas ao redor do mundo têm buscado o desenvolvimento de novas tecnologias que sejam mais efetivas e que causem menos efeitos adversos, entretanto, poucas novidades são adicionadas à terapêutica convencional. A hipertermia é uma proposta de tratamento do câncer onde as células do tumor são afetadas pela elevação da temperatura local (ANDRA et al., 1999; HERGT et al., 2007)

A hipertermia utilizada no tratamento do câncer consiste no aumento da temperatura acima do nível fisiológico com o objetivo de atingir uma melhor terapêutica. Está definida como o aumento da temperatura a um alcance entre 39ºC e 45ºC. O objetivo da hipertermia local é alcançar uma dose térmica ótima no tumor, seja superficial ou profunda, sem exceder os limites de tolerância dos tecidos normais circundantes. A hipertermia local é aplicada de forma externa e não evasiva dirigida ao local de tratamento conduzindo à destruição das células cancerígenas. Este tratamento pode utilizar-se isoladamente, ou em combinação com a quimioterapia e/ou radioterapia, com a finalidade de conseguir um tratamento mais efetivo em doentes com câncer, seja em etapas iniciais ou avançadas da doença. Ao terminar a sessão de hipertermia, os doentes referem sentirem-se bem pela influência do calor, não obstante a possibilidade de apresentarem cansaço. Em casos isolados, a destruição de células cancerígenas pode resultar numa febre ligeira para o doente. Ambos os efeitos são considerados como uma boa resposta ao tratamento. É, portanto, uma técnica não evasiva, bem tolerada e que potencializa o efeito da radioterapia e quimioterapia sobre o tumor (ANDRA et al., 1999; HERGT et al., 2006).

É considerada uma hipertermia grave se a temperatura corporal for muito acima de 40°C. Em oposição a hipotermia, que é inferior à temperatura média fisiológica (normal do corpo de 37 °C). A hipertermia é uma terapia em rápida evolução em várias partes do mundo com significativos resultados clínicos, utilizada para

promover aumento de temperatura em uma região do corpo que esteja afetada por uma neoplasia, com a finalidade de provocar a lise das células tumorais. Esta terapia tem como base a sensibilidade da célula tumoral à temperatura de 41 a 42°C, durante um período de tempo cuidadosamente estabelecido. Nesta temperatura as células tumorais sofrem lise, pois não suportam aumento brusco de temperatura, fato que não ocorre com as células normais circunvizinhas. A hipertermia pode ser utilizada como tratamento coadjuvante da quimioterapia e radioterapia. O aumento da temperatura exigido na terapia de hipertermia pode ser alcançado por meio do uso de nanopartículas magnéticas, processo conhecido como magneto – hipertermia ou magnetotermocitólise. Sob a ação de um campo magnético externo de frequência alternada, as nanopartículas são aquecidas. As nanopartículas magnéticas respondem de forma mais efetiva a campos externos do que as micropartículas, pois possuem monodomínios magnéticos o que permite maior absorção de energia (HERGT et al, 2006; HERGT et al, 2007).

As nanopartículas magnéticas têm se destacado, devido ao fato de poderem ser guiadas ou localizadas em um alvo específico quando são utilizadas na magneto-hipertermia. A possibilidade de direcionamento da nanopartícula promoveu o desenvolvimento de várias técnicas de encapsulamento de partículas magnéticas de forma que os sistemas obtidos se tornassem efetivos carreadores de drogas com especificidade tumoral para a liberação controlada de agentes quimioterápicos. Para o tratamento do câncer através de magneto – hipertermia é necessário que as nanopartículas apresentem baixos níveis de toxicidade e um elevado momento de saturação para que sejam poucas as doses requeridas. É necessário o desenvolvimento de técnicas de encapsulamento, que promovam às nanopartículas ferromagnéticas a biocompatibilidade exigida para a utilização da terapia de magneto-hipertermia de forma segura para o paciente (CASTRO et al, 2010; KIM, 2008, CIOFANI et al, 2009; ARRUEBO et al 2007; FÉLIX, 2017).

O poder do calor na cura de diversas enfermidades é conhecido desde a antiguidade. O´Brien e Mekkaou, em seus trabalhos notaram que células cancerígenas podem ter o seu crescimento desacelerado, quando submetidas a temperaturas em torno de 42°C, ao passo que as células normais podem tolerar

temperaturas ainda mais elevadas. Nesse sentido há duas modalidades de tratamento para câncer usando o aquecimento nas células:

- Hipertermia: Células submetidas a temperaturas entre 42-45°C por algumas horas, geralmente essa técnica é combinada a outros tratamentos, como radioterapia e ou quimioterapia.
- Termoablação: É uma modalidade terapêutica que visa a morte térmica de todas as células tumorais. A área afetada é submetida a temperaturas em torno de 50 °C por intervalos de tempo de alguns minutos (KIM et al., 2008)

A técnica de hipertermia tem enfrentado algumas dificuldades, entre elas as mais relevantes são: promover o aquecimento apenas na região alvo, sem afetar as células saudáveis circundantes e controlar a temperatura na região alvo. Diante dessas dificuldades, pesquisadores tem voltado sua atenção para utilização de materiais magnéticos que possam promover esse aquecimento, já que a energia magnética absorvida pode ser convertida em energia térmica. Os ferrofluidos têm se mostrado bons candidatos para hipertermia magnética, pois podem ser direcionados através de um campo magnético a região do tumor, tornando a terapia mais localizada (KIM et al., 2008; EFFENBERGER, 2012).

A hipertermia pode ser realizada de forma concomitante com a quimioterapia, tornado o tratamento mais eficaz. As partículas magnéticas usadas como fontes para geração do calor podem também vetorizar fármacos até a região afetada. Outro ponto crucial que garante a eficiência da terapia é o controle da temperatura durante o tratamento. Para isso alguns equipamentos que monitoram a temperatura durante o processo têm sido desenvolvidos (KIM et al., 2008; EFFENBERGER, 2012; FÉLIX, 2017).

8. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

8.1. Espectroscopia de fluorescência de raio X

A fluorescência é um fenômeno de emissão de luz, não necessariamente visível a olho nu, por um objeto excitado por alguma fonte de energia. Na fluorescência de raios X, é usada uma fonte de raios X com energia suficiente para ionizar os níveis internos dos átomos por efeito fotoelétrico, e no regresso ao estado fundamental é liberada uma radiação característica de cada elemento. A radiação emitida pela amostra fornece informações sobre sua constituição atômica elementar para elementos de número atômico acima de 13 (sódio). Informações de fótons e energia são captadas por detectores. Assim, os dados são analisados qualitativamente com base no banco de dados do equipamento, ou quantitativamente com base em curvas de calibração feitas pelo operador (SANTOS et al, 2013).

A espectroscopia de fluorescência de raios X (FRX), é uma técnica não destrutiva que permite identificar os elementos químicos e a proporção deles na amostra de modo rápido e a baixo custo (SANTOS et al, 2013).

8.2. Microscopia eletrônica de varredura

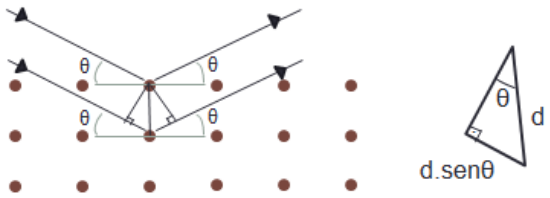
Esta técnica é baseada na emissão de elétrons por um filamento em alto vácuo, varrendo a superfície da amostra. A interação da superfície da amostra com o feixe de elétrons provoca modificações no sinal destes elétrons de acordo com as modificações da superfície da amostra assim, são emitidos elétrons secundários, elétrons retroespalhados, fótons, raios X característicos, elétrons Auger, etc. A formação da imagem detalhada da topografia da amostra é detectada através dos elétrons secundários, enquanto para determinar a composição, são detectados os retroespalhados. Quando amostras condutoras são analisadas não é requerido nenhum tipo de preparação ou tratamento prévio. No caso de amostras isolantes, é necessária à cobertura da superfície da amostra com uma fina camada de ouro ou outros metais (SCHARDOSIM, 2014; ORÉFICE, 2012).

8.3. Difração de raios X (DRX)

Esta técnica baseia-se na emissão de raios X na superfície da amostra, seguido da detecção dos fótons difratados. A estrutura cristalina é uma distribuição regular de átomos no espaço. Estes são dispostas de modo a formarem uma série de planos paralelos. Esta técnica é versátil, não destrutiva, e fornece informações referentes à composição química e estrutura cristalina de materiais naturais e sintéticos (SCHARDOSIM, 2014).

A difração de raios X (DRX) é uma técnica de caracterização importante para se estudar a estrutura cristalina do material. O ensaio baseia-se na presença de uma rede cristalina no material, e determina espectros característicos a cada fase presente. Consiste na emissão de raios X sobre a amostra variando-se o ângulo de incidência e medindo-se a reflexão de acordo com a lei de Bragg. A figura 5 mostra a dedução da lei de Bragg, sendo “d” a distância interplanar da estrutura cristalina do material, λ é o comprimento de onda da radiação incidente (Raios X) e θ é o ângulo de incidência, variável do ensaio. A partir disso, o equipamento é capaz de detectar ângulos de reflexão onde há interferência construtiva (nλ), identificando fases cristalinas (WASEDA et al, 2011).

Figura 5 - Dedução da lei de Bragg

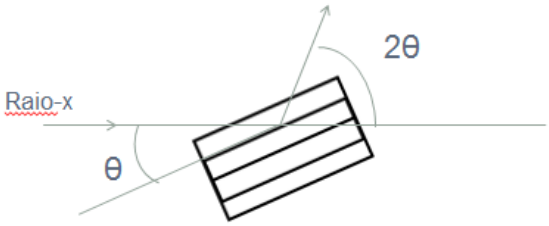


$n\lambda = 2d\,sen\theta$

Fonte: do próprio autor

Essa varredura permite que o detector identifique os ângulos das orientações cristalográficas de cada fase (2θ), como representada de forma simplificada na figura 6. Cada ângulo detectado corresponde a uma família de planos cristalográficos, e o conjunto de picos equivale a uma fase presente no material.

Figura 6 - Representação esquemática do ângulo de orientações cristalográficas



Fonte: do próprio autor

A forma como os planos cristalográficos são identificados pela técnica de DRX são representados na Figura 6. Cada plano cristalográfico é representado no difratograma por um valor de 2θ no eixo x.

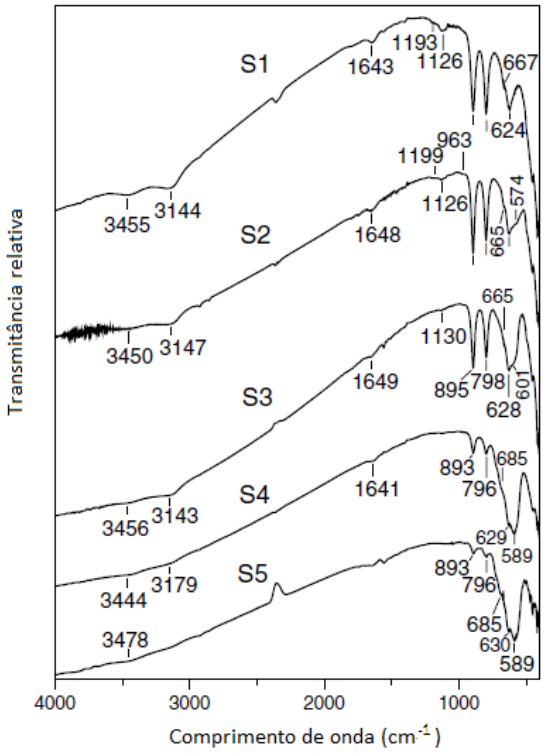
8.4. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourrier (FTIR)

A espectroscopia por infravermelho é uma técnica de caracterização que permite a obtenção de informações sobre as ligações químicas do material e pode ser feita a análise de sólidos, filmes finos ou líquidos. O objetivo é determinar a intensidade do feixe de infravermelho em função do comprimento de onda ou frequência após a interação do feixe com a amostra. Isto é, determina-se a razão I/I_0 (sendo I_0 a intensidade do feixe incidente e I a intensidade do feixe após interação com a amostra) em função da frequência do feixe. O resultado é dado em forma de um espectro de infravermelho, em função da transmitância, refletância ou absorvância (BRUNDLE, 1992).

Os métodos de caracterização de óxidos de ferro tradicionais são a difração de raios X e a espectroscopia Mössbauer. Entretanto, a utilização de fonte radioativa na espectroscopia Mössbauer e a limitação do DRX de diferenciar magnetita e maghemita são fatores limitantes dessas técnicas. Dessa forma, o FTIR tem mostrado potencial devido à facilidade de realização da análise, simplicidade da técnica e por dispensar fontes radioativas ou que apresentem potencial risco ao operador (NAMDURI, 2008).

No trabalho de Gotic e Music (2007), são apresentados espectros de infravermelho para diferentes amostras de óxidos de ferro sintetizadas pelos autores. Alguns desses espectros são apresentados na figura 7.

Figura 7 - Espectros de FTIR de amostras de óxidos de ferro



Fonte: GOTIC (2007)

Para as diferentes fases de óxidos de ferro, as principais bandas de infravermelho são apresentadas na tabela 1, segundo Namduri (2008).

Tabela 1 - Bandas de IR de diferentes óxidos de ferro.

Óxido de ferro / Hidróxido	Números de onda da banda (cm^{-1})
Magnetita (Fe_3O_4)	Bandas largas a 570 e 400 cm^{-1}
Maghemita (γ-Fe_2O_3)	700,630-660,620 (faixa F-O)
Hematita (α- Fe_2O_3)	540,470 e 352 cm^{-1}
Goetita (α-FeOOH)	1124,890 e 810 cm^{-1} para estiramento OH
Lepidocrocita (γ-FeOOH)	1018 cm^{-1}(no plano de vibração) e 750 cm^{-1} (fora do plano de vibração)

Fonte: NAMDURI (2008) - Adaptado

A curvatura da linha de base dos espectros (queda do lado esquerdo, a elevados comprimentos de onda) é resultados de efeitos de espalhamento do infravermelho, segundo dados da Shimadzu, isso pode ocorrer em caso de superfícies muito rugosas ou presença de compostos inorgânicos. O efeito é observado com maior clareza em maiores comprimentos de onda.

8.5. Espectroscopia Mössbauer

Esta técnica é utilizada para identificar as formas químicas do ferro contidas nas amostras, assim como o percentual de cada fase ferruginosa, a cristalinidade das fases, o comportamento magnético (superparamagnetismo), e o estado de oxidação do ferro (SOUZA, 2011).

A espectroscopia Mössbauer analisa a estrutura cristalina da amostra e permite diferenciar a maghemita (γ–Fe_2O_3) da magnetita, uma vez que a análise de DRX não consegue distinguir tal diferença por apresentarem mesma estrutura de espinélio (Fe_3O_4) (KIM, 2012).

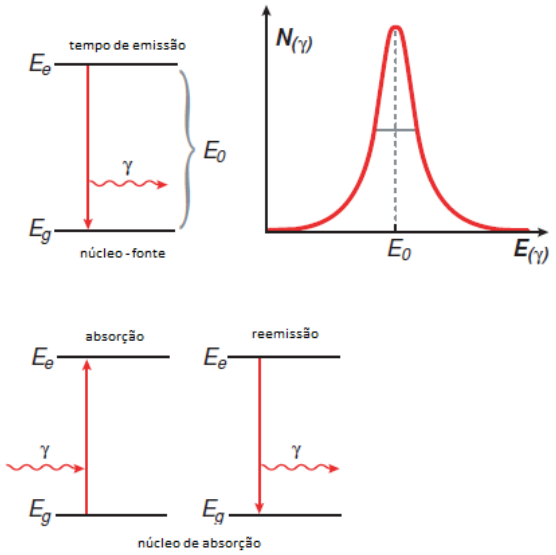
A espectroscopia Mössbauer é uma ferramenta poderosa para o estudo da estrutura de partículas magnéticas (SINGH et al, 2016). O efeito Mössbauer foi descoberto em 1957, baseado no princípio de absorção ressonante de raios gama no núcleo de materiais sólidos. Em 1965 foi aplicada como fundamento teórico em uma técnica de espectroscopia (DYAR, 2016)

Para a caracterização de diferentes óxidos de ferro, a espectroscopia Mössbauer apresenta vantagens por possibilitar a distinção de diferentes parâmetros magnéticos hiperfinos. A magnetita e a maghemita, por exemplo, apresentam estrutura espinélio a temperatura ambiente. Com a técnica de Mössbauer, entretanto, é possível identificar os sítios de Fe (II) e Fe (III) na magnetita (JOOS et al., 2015).

Na espectroscopia Mössbauer utilizando-se o isótopo Fe^{57}, o tempo da medida experimental é representada pela meia vida do isômero correspondente a 3/2 da absorção do Fe^{57} (aproximadamente 10 ns). Dessa forma, a técnica é utilizada para

estudar o comportamento de relaxação do spin magnético de partículas (SINGH et al, 2016). O processo de excitação nuclear ocorre como apresentado na figura 8.

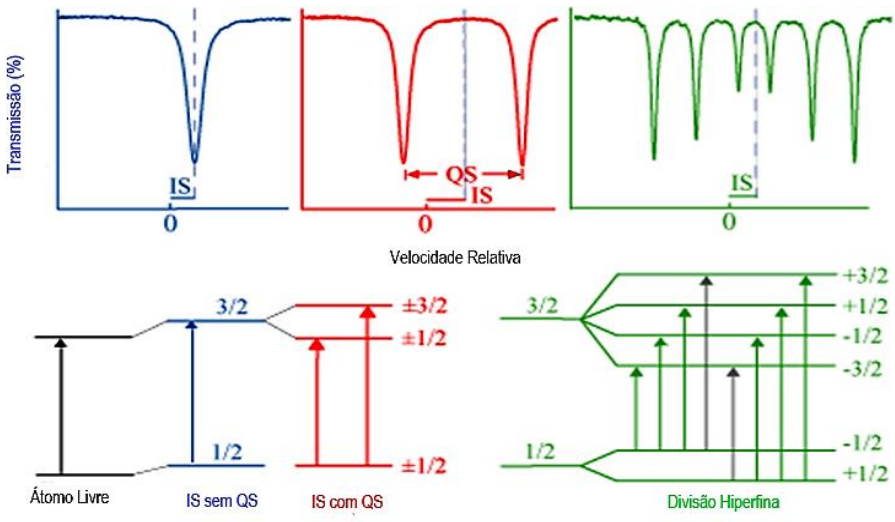
Figura 8 - Representação ideal do processo de fluorescência nuclear



Fonte: DYAR et al. (2016) - Adaptado

Um átomo isolado é excitado do seu estado estável (E_e) e decai gerando raios gama, transferindo assim, energia para um elétron de outro átomo. Essa radiação carrega uma energia, E_0, que é capturada pelo elétron ressonante em mesmo valor de energia (DYAR et al., 2016), vide Figura 9.

Figura 9 - Níveis de energia no efeito Mössbauer.



Fonte: DYAR et al. (2016) - Adaptado

A Figura 9, mostra como as diferentes formas de absorção dos átomos gera o espectro de transmissão (DYAR et al., 2016). O primeiro gráfico, em azul, mostra uma mínima variação do valor de velocidade zero, geralmente chamado deslocamento ou desvio isomérico. As variações indicadas por ½ e 3/2, em vermelho, representam spins nucleares ou momentos angulares intrínsecos, gerados pela interação do momento quadrupolo com o campo elétrico nuclear do átomo. A interação com o Fe^{57} faz com que o pico apareça duplicado no espectro, como apresentado no segundo gráfico em vermelho. Finalmente, o gráfico apresentado em verde mostra um padrão de sexteto em um caso simples.

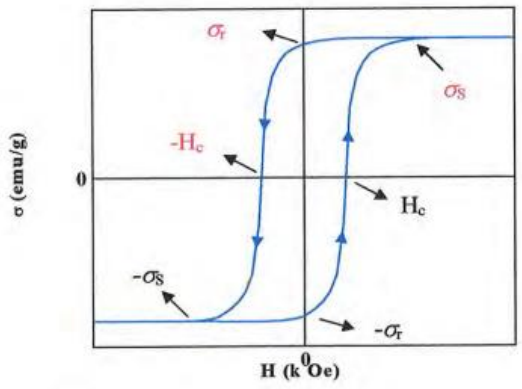
A principal desvantagem da técnica é a utilização de fonte radioativa, tornando-a insegura para o operador. Além disso, a espectroscopia Mössbauer exige um elevado nível de especialização do operador, devido à complexidade do espectro e sua interpretação (NAMDURI, 2008).

8.6. Magnetização

Medidas de magnetização por histerese dinâmica indicam a eficiência de aquecimento das partículas, propriedade de maior interesse na aplicação em hipertermia. Dados experimentais apresentados por Guibert et al. (2016) mostram a relação entre o poder calorífico de partículas magnéticas e medidas de magnetização utilizando baixos valores de campo magnético.

A curva de magnetização, ou curva de histerese, é obtida por um magnetômetro de amostra vibrante, cuja sigla em inglês é VSM (Vibrating Sample Magnetometer). O material é colocado sob ação de um campo magnético uniforme H, fazendo com que o momento magnético M se alinhe na direção do campo. A curva de magnetização é obtida fazendo-se uma varredura de H crescente em função da magnetização σ. Quando o campo atinge o valor constante, obtém-se o valor de magnetização de saturação, σ_s, ou seja, todos os momentos estão apontados na direção do campo. Invertendo-se o valor do campo magnético, a magnetização é reduzida até o valor de magnetização remanente, σ_r. As curvas de magnetização dependem do tamanho de partícula (DUARTE, 2005), vide Figura 10.

Figura 10 - Parâmetros da curva de histerese



Fonte: DUARTE (2005)

Obs.: Os parâmetros da curva de histerese descritos são apresentados na Figura 10.

As propriedades magnéticas de nanopartículas de magnetita e maghemita podem ser determinadas pela curva de magnetização ou, curva de histerese. Essa curva é uma somatória de todos os processos reversíveis e irreversíveis de magnetização total (M) da amostra fruto das variações positivas e negativas dos valores do campo magnético aplicado (H).

A caracterização do ciclo da histerese de partículas magnéticas é usada para definição de seu magnetismo (ferrimagnetismo, ferromagnetismo, superparamagnetismo) e resposta magnética, isto é, magnetização intrínseca (os momentos dipolares magnéticos atômicos) e remanescência (YANG et al., 2008). Além disso, as curvas da magnetização podem ser utilizadas para investigação do tamanho de cristal do óxido do ferro e a largura da distribuição de tamanho de cristal (ZOTTIS,2015).

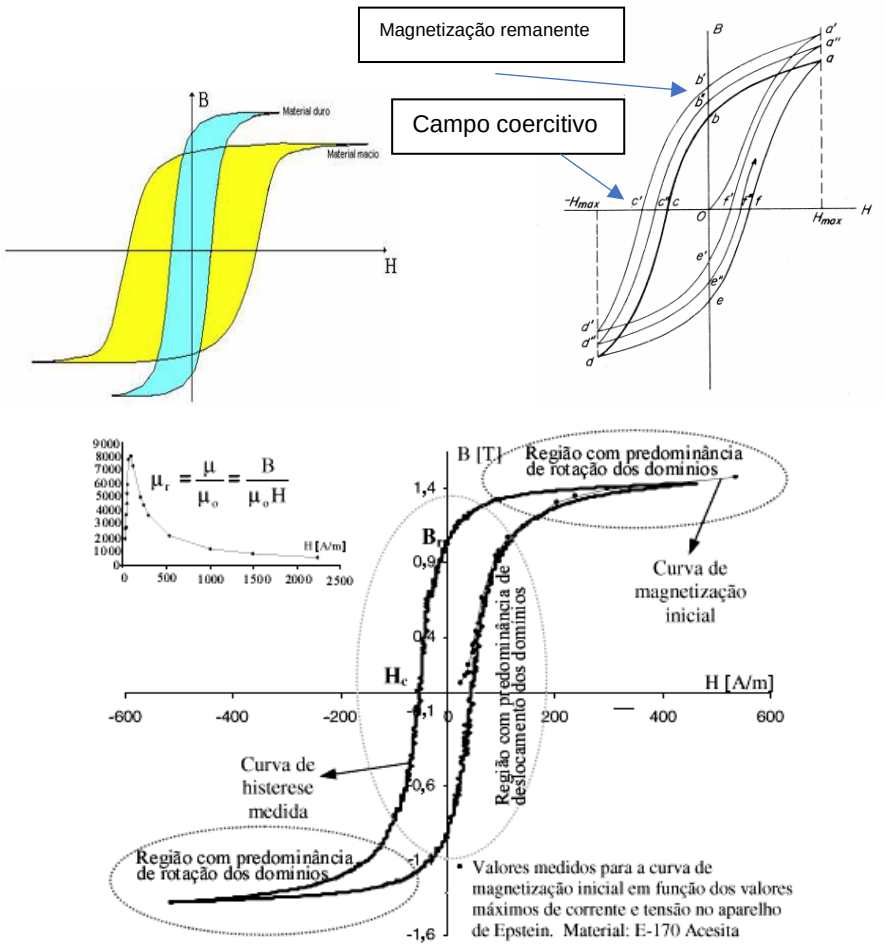
Aplicando-se um campo magnético (H) no sentido direto (valor positivo de H), na amostra inicialmente desmagnetizada, em que se tem a primeira resposta, denominada de curva virgem (linha pontilhada), este seguirá a curva até atingir um patamar constante chamado magnetização de saturação (Ms), quando todos os spins dos íons de ferro se encontram alinhados com o campo externo, então, Ms constitui um parâmetro importante a respeito do comportamento magnético do material (LEE, N.; HYEON, 2012). Essa grandeza geralmente é medida em unidades eletromagnéticas por grama de material (emu g^{-1}) de ferro. A fase magnetita

apresenta maior interesse para aplicações biomédicas, por possuir um valor de Ms superior a maghemita (γ–Fe_2O_3) (ZOTTIS,2015).

Com relação à curva no sentido inverso (valores negativos de campo H), se a amostra apresentar um valor de magnetização residual, e não conseguir recuperar o seu estado de desmagnetização após a retirada do campo H, ela apresentará uma magnetização remanescente ou remanescência (Mr). Dessa forma, o material permanece magnetizado quando a curva atinge H=0 (quando a curva de magnetização passa pela ordenada). Seguindo a curva no sentido inverso (valores negativos de H), até passar pelo eixo das abscissas, onde se tem o estado de desmagnetização do material (M = 0) em que se tem um valor de campo H que deve ser aplicado, denominado de campo coercivo ($-H_c$). Ainda com a continuação da variação do módulo do campo, obtêm-se novamente uma região de saturação. A repeticão do ciclo no sentido inverso gera uma curva fechada que é chamada ciclo de histerese (RIFFLE et al., 2002; RIBEIRO, 2008).

A curva de histerese de fato representa perdas energéticas durante o processo de magnetização após a aplicação de um campo magnético H, e a área da curva de histerese está associada com essas perdas. Materiais com “pouca ou nenhuma histerese” apresentarão menores valores de campo coercivo (Hc), e de remanescência (Mr), o que representa perdas mínimas na magnetização. É nesta categoria que se encontram as partículas superparamagnéticas de Fe_3O_4, pois elas representam perdas mínimas da M associadas aos processos reversíveis, indicando curva de magnetização com histerese nula (Figura 11).

Figura 11 - Curvas de magnetização e histerese



Fonte: DUARTE (2005)

As principais perdas magnéticas são:

- ❖ Correntes parasitas:

Induzidas no núcleo, devido ao mesmo ser, normalmente, de material ferromagnético.

- ❖ Perdas por histerese:

Trabalho realizado pelo campo (H) para obter o fluxo (B);

Expressa a dificuldade que o campo (H) terá para orientar os domínios de um material ferromagnético.

- ❖ Efeito de proximidade:

Relaciona um aumento na resistência em função dos campos magnéticos produzido pelos demais condutores colocados nas adjacências.

- Efeito pelicular (efeito *top skin*):

Restringe a secção do condutor para frequências elevadas.

Em altas frequências, a tensão oposta induzida se concentra no centro do condutor, resultando em uma corrente maior próxima à superfície do condutor e uma rápida redução próxima do centro (DUARTE, 2005).

8.7. Análise de área superficial e porosidade por adsorção de N_2 (BET)

A teoria de BET (*Brunauer, Emmet e Teller*) diz que a área superficial pode ser determinada pela adsorção física de gás na superfície de um sólido, pelo cálculo de gás adsorvido por várias camadas monomoleculares. A análise de pós em microscopia fornece informações de superfície, imperfeições e porosidade. Entretanto, é necessária uma técnica mais completa para obtenção de informações de poros internos e área superficial (LOWEL, 1998).

A adsorção de gases pode ser de dois tipos: física ou química. A adsorção física é um tipo de adsorção fraca, normalmente por interações de van der Walls e reversível por aumento de temperatura. É a utilizada na técnica de BET. A adsorção química consiste em uma interação forte resultante de interação química do gás na superfície e é tipicamente irreversível. A dinâmica de adsorção depende da temperatura (T), pressão (P) e potencial de interação (E), como indicado na equação 1:

$$W = F(P, T, E) \quad (1)$$

A adsorção é medida a temperatura constante na análise, logo, faz-se válida a equação 2 apresentada:

$$W = F(P, E) \quad (2)$$

Os dados obtidos por adsorção de gás são tratados pela equação da isoterma para análise multi-point (acima de 3 pontos) de acordo com a equação 3:

$$\frac{1}{\left[V_a\left(\frac{P_0}{P}-1\right)\right]} = \frac{C-1}{V_m C} \times \frac{P}{P_0} + \frac{1}{V_m C} \quad (3)$$

Onde P é a pressão parcial do adsorvente em equilíbrio com a superfície, Po é pressão saturada do adsorvente, Va é o volume de gás a temperatura e pressão ambiente, Vm é o volume de gás adsorvido na monocamada e C é a constante de entalpia de adsorção.

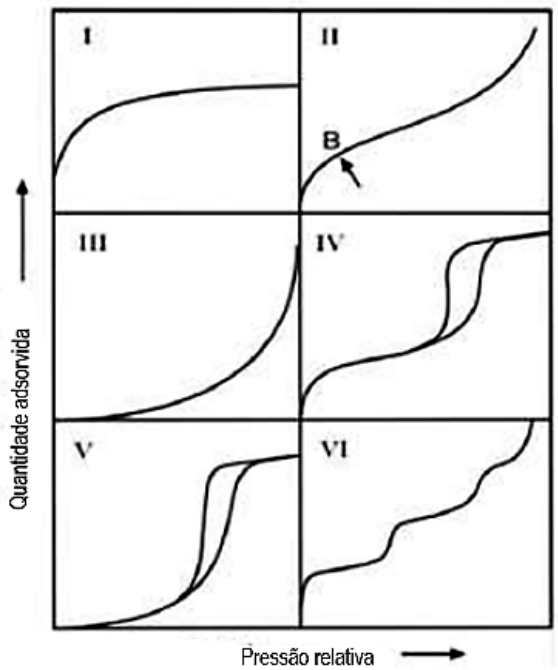
Utilizando-se a medida *single point* (único ponto) para materiais cujo valor da constante C é muito alto. Dessa forma, a equação para se determinar área superficial (S) é expressa pela equação 4:

$$S = \frac{V_m N_a}{m \times 22400} \tag{4}$$

Onde S é a área superficial, V_m é o volume de gás adsorvido na monocamada, N_a é o número de Avogrado (6.022 x 10^{23} mol^{-1}), m é a massa de pó utilizada no ensaio e 22400 é o volume ocupado por um mol de gás adsorbato, em mililitros.

As isotermas obtidas são classificadas pela IUPAC em 6 tipos, apresentadas na figura 12.

Figura 12 - Tipos de isoterma, de acordo com a IUPAC

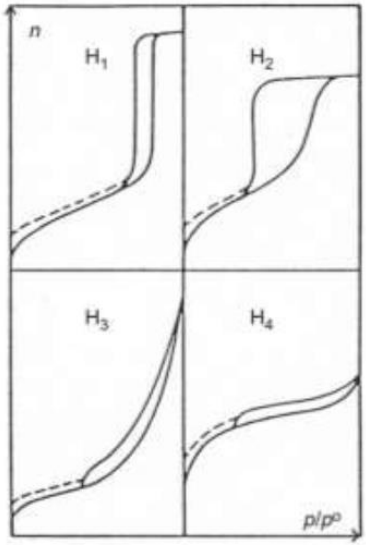


Fonte: MONTORO (2015) - Adaptado

- Tipo I : Langmuir saturada
- Tipo II : C>2 (macroporosa ou não-porosa)
- Tipo III : C<2 interações fracas
- Tipo IV: C>2 mesoporosa saturada
- Tipo V : C<2 interações fracas,saturado
- Tipo VI : Adsorção camada a camada

As isotermas obtidas por BET apresentam histerese, ou seja, um *loop* formado pela diferença entre adsorção e dessorção. A histerese varia de acordo com tamanho e formato de poros (THOMMES et al., 2005), e é classificada em 4 tipos, segundo Montoro (2015), apresentados na figura 13.

Figura 13 - Classificação de histerese de adsorção e dessorção



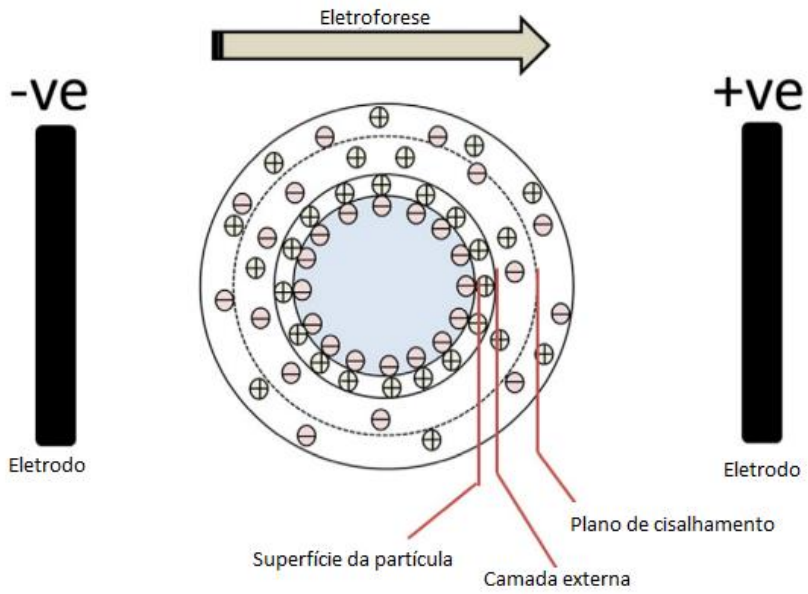
Fonte: MONTORO (2015)

- H1: distribuição estreita e uniforme de poros, de forma cilíndrica.
- H2: Estrutura porosa complexa e ausência de efeitos de rede.
- H3: Agregados não-rígidos em formato achatado. Ausência de saturação
- H4: Materiais complexos contendo tanto microporos quanto mesoporos.

8.8. Potencial Zeta

A medida de potencial zeta é uma técnica simples, fácil e altamente reprodutível de determinação de carga superficial e tamanho de partículas. Basicamente, é o potencial do plano de cisalhamento que recobre partículas em uma solução coloidal se movimentando sob ação de um campo elétrico. O potencial elétrico na superfície é o trabalho necessário para que uma carga positiva localizada no infinito se aproxime da superfície sem aceleração. Dessa forma, pode-se afirmar que o potencial zeta reflete a diferença de potencial entre a dupla camada elétrica da partícula e a camada de dispersante ao redor do plano de cisalhamento (BHATTACHARJEE, 2016). As camadas são representadas na figura 14.

Figura 14 - Representação de distribuição de cargas de uma partícula carregada



Fonte: BHATTACHARJEE (2016) - Adaptado

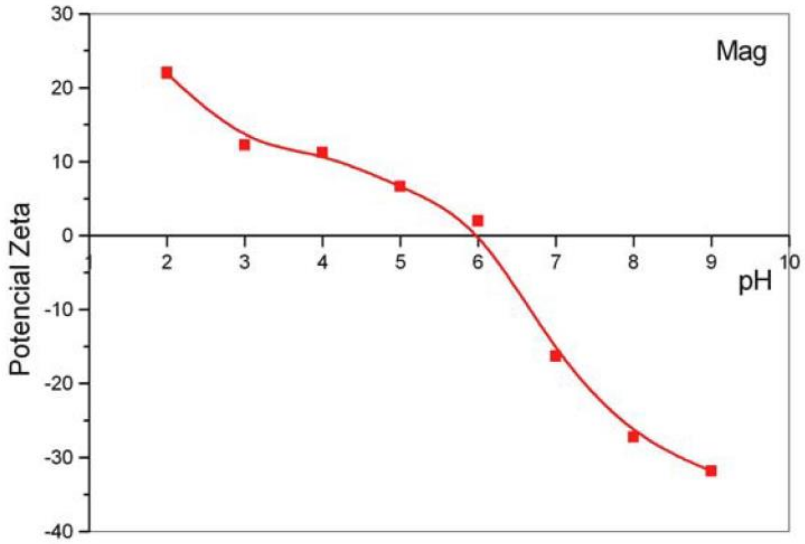
A técnica consiste na aplicação de um campo elétrico na suspensão com mobilidade eletroforética, e a medida é realizada por espalhamento de luz ou fenômeno eletroacústico. O potencial zeta é influenciado pelo pH, força iônica e concentração de partículas. A magnitude do potencial zeta dá uma indicação da potencial estabilidade do sistema coloidal. Se todas as partículas em suspensão têm um potencial zeta grande e negativo ou positivo, então elas tendem a se repelir, nesse caso não há formação de aglomerados e a suspensão coloidal é estável.

Entretando, se as partículas têm baixos valores de potencial zeta então não existem forças que inibem a atração entre as partículas, sendo assim grandes aglomerados são formados. O fator que mais afeta o potencial zeta é o pH. Geralmente, em pH's ácidos a partícula assume carga positiva, e o potencial zeta será positivo, em pH's básicos o potencial zeta tende a ser negativo. Em meio aquoso, as partículas de magnetita estão hidratadas e sua superfície encontra-se completamente coberta por grupos FeOH. Estes sítios hidroxilados podem dissociar liberando H^+ ou OH^-, deixando a superfície carregada negativa ou positivamente (FERREIRA, 2013).

$$FeOH = FeO^- + H^+$$
$$FeOH = Fe^+ + OH^-$$

A curva de potencial zeta (Figura 15) em função do pH mostra que em pH neutro (7) a superfície da magnetita apresenta carga negativa e que a reversão potencial zeta, ou seja, o ponto isoeletronico (IEP) tem pH_{IEP} igual a 6. Este resultado está de acordo com aqueles obtidos por alguns autores para a magnetita (FERREIRA, 2013).

Figura 15 - Curva do potencial zeta da magnetita em função do pH.



Fonte: FERREIRA (2013)

Porém na literatura foram obtidos diversos valores de pH_{IEP} por vários autores para cada tipo de magnetita. As variações ocorrem porque este pH depende de vários fatores como a composição da amostra, a preparação do material para a medida, o tipo de modelo utilizado para interpretar os dados e a origem da magnetita: sintética ou natural. O estudo da curva do potencial zeta da magnetita permite a

caracterização desta partícula, além de fornecer informações sobre a estabilidade da suspensão em água. Altos valores de potencial zeta indicam uma maior estabilidade da suspensão. Quando as partículas têm altos valores (positivo ou negativo) de potencial zeta elas tendem a repelir umas às outras e neste sistema reduzindo a tendência de aglomeração. Normalmente suspensões com valores de potencial zeta maiores que 30 mV ou menores que -30mV são consideradas estáveis. A observação da curva da magnetita sugere que a suspensão da magnetita em água será estável em soluções de pH > 8, o que não é um bom resultado para o propósito deste trabalho, pois buscamos aplicações biológicas que exigem suspensões estáveis em pH próximo de 7 (FERREIRA, 2013).

9. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA

9.1. Testes de Citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade *in vitro são* os primeiros testes para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos e depois de comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório (ORÉFICE, 2012).

Vários métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de biomateriais, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em inserir o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, observando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, dentre eles a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares. O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais como o vermelho neutro, solúvel em água e que passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular (ORÉFICE, 2012).

9.1.1 Teste de viabilidade celular pelo método de MTT

A análise da viabilidade celular, realizada através da redução do sal de brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (ou seja, ensaio de MTT), proporciona um modelo simples e eficaz para detectar células vivas sem o uso de elementos radioativos (MOURA, 2014).

O método é baseado na capacidade das enzimas desidrogenases localizadas nas mitocôndrias de células viáveis em converter o reagente de coloração amarela solúvel em água, o sal de tetrazólio 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio bromide (MTT) num produto de coloração escura, o formazan, insolúvel em água,

mas solúvel em DMSO. A quantidade de formazan produzido é diretamente proporcional ao número de células viáveis presentes no experimento (ORÉFICE, 2012).

9.1.2 Teste de Difusão em Ágar

O teste de difusão em ágar é realizado pela incorporação de concentrações seriadas e logarítmicas de um antimicrobiano, ou biomaterial em meio de cultura na forma de ágar e distribuído em placas de Petri individuais, ou em placas contendo 6 poços. Cada placa ou poço, representa uma única concentração de amostra teste. Portanto, se for necessário testar mais de uma concentração, múltiplas placas devem ser confeccionadas para cada amostra. As amostras são inoculadas sobre a superfície do ágar com auxílio de cilindro de clonagem e incubadas por 18 a 24 horas, a 37°C. Após este período, observa-se ou não, formação de halo ao redor da amostra. O teste de difusão de ágar possui baixo custo, fácil reprodutibilidade, e boa confiabilidade, quando padronizado. (ANVISA, 2008; SCHMALZ, 1988).

9.1.3 Teste de Azul de Tripan (tripsinização)

A análise da viabilidade celular pode ser realizada através da coloração de células com o corante Azul de tripan. O corante não atravessa membranas íntegras, assim células vivas não permitem a passagem do corante, portanto, não adquirem coloração. Já as células mortas, por terem membranas danificadas, adquirem a coloração azul (ALVES; GUIMARÃES; 2010).

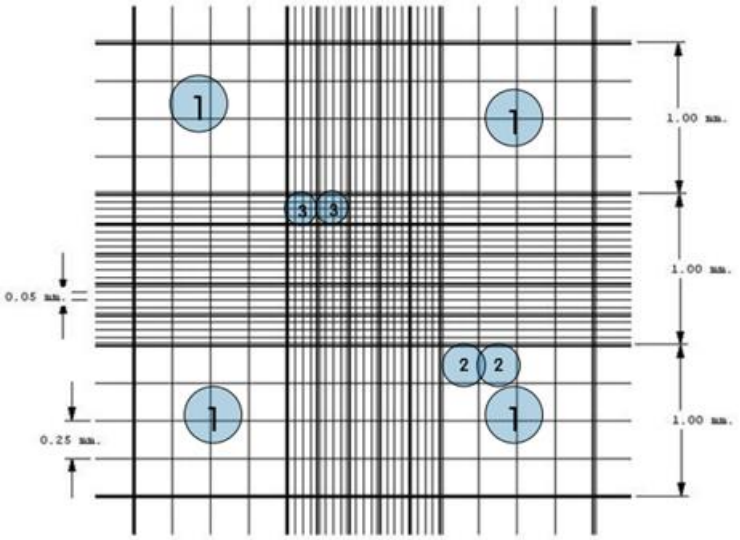
Esta técnica permite alta confiabilidade em relação às células com a membrana celular intacta, as quais não são coloridas porque a membrana celular é muito seletiva, quanto aos compostos que podem endocitar. Nas células viáveis com membrana intacta, o azul de tripan não é incorporado; pelo contrário, passa através da membrana de células mortas. Portanto, somente as células mortas terão uma cor azul distinta ao microscópio (e contadas usando a câmera Neubauer) (PERES, 2005).

A câmara de Neubauer é uma lâmina de vidro com divisões que auxiliam na contagem, possuindo 9 quadrados que medem 1 mm^2 de área. Somente os quatro quadrados externos são utilizados na contagem de células animais. Cada quadrado

externo é formado por mais 16 quadrados menores que auxiliam a contagem. A lamínula é colocada sobre a câmara, cobrindo a área central, onde a grade de contagem está (Figura 17). Ela serve para concentrar a amostra entre o fundo da câmara e a própria lamínula, deixando exatamente 0,1 mm nesse espaço (ALVES; GUIMARÃES; 2010).

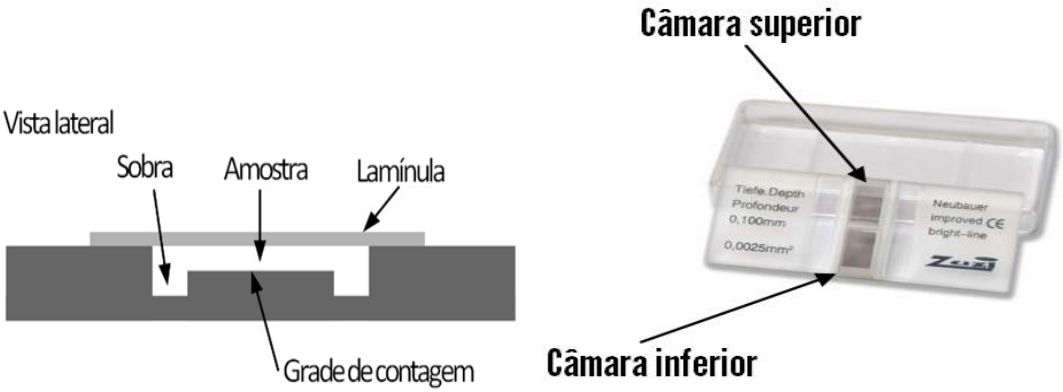
A contagem do número de células é realizada em câmara de Neubauer (Figura 16).

Figura 16 - Representação esquemática de câmara de Neubauer



Fonte: CÂMARA (2017)

Figura 17 - Detalhamento da câmara de Neubauer



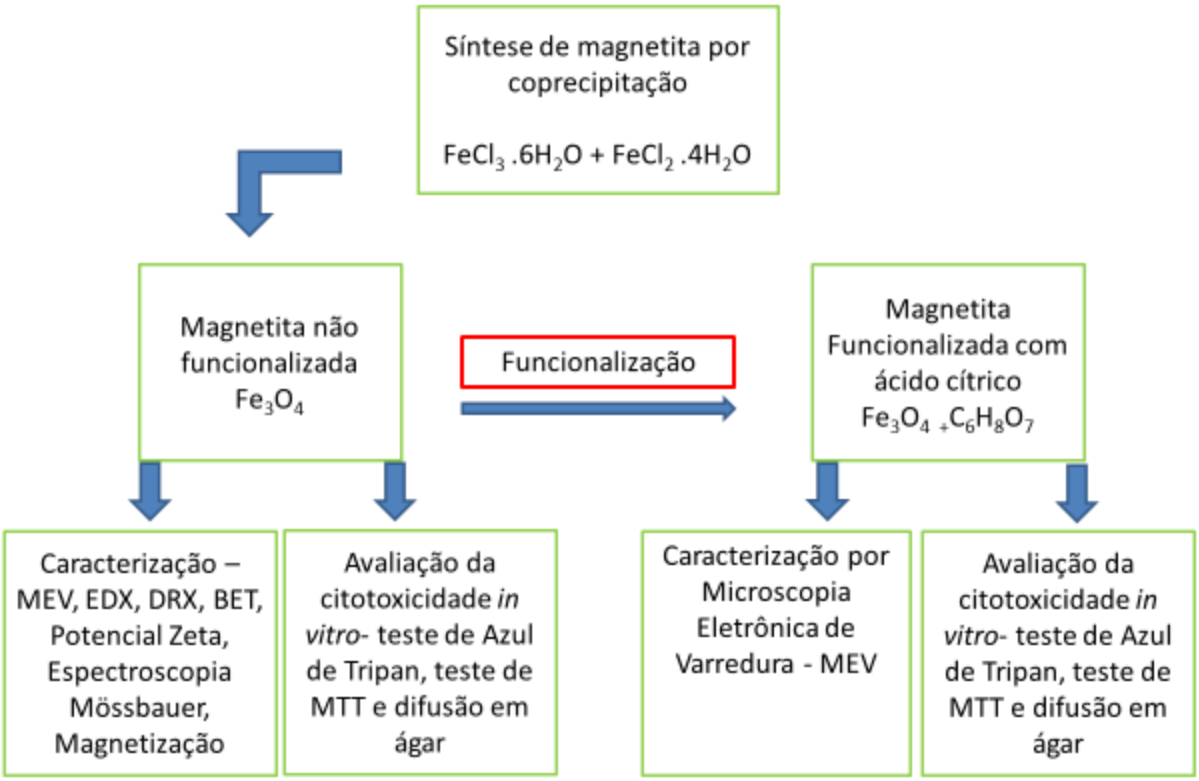
Fonte: CÂMARA (2017)

Para a contagem as células devem estar totalmente individualizadas. Para células aderentes, é necessário fazer uma tripsinização prévia, o que não é feito no caso de células não aderentes.

10. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia da pesquisa segue o seguinte fluxograma (Figura 18):

Figura 18 - Fluxograma das etapas da pesquisa.

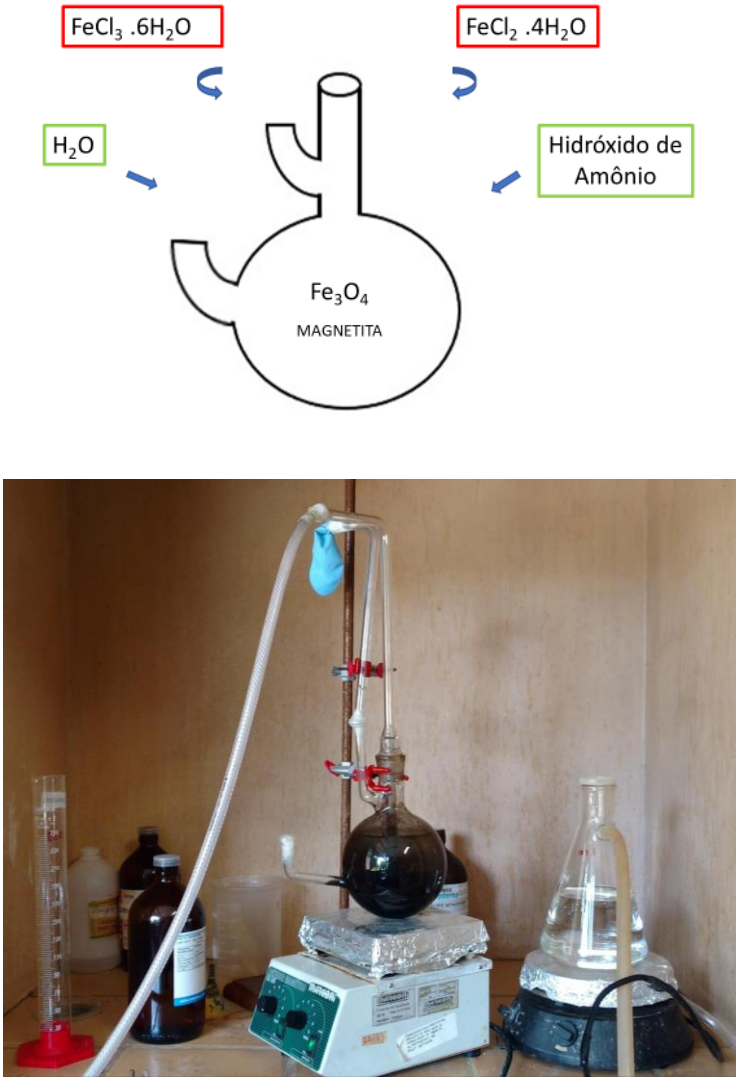


Fonte: do próprio autor

10.1. Síntese das nanopartículas

Para a síntese das nanopartículas utilizou-se o método da coprecipitação. De forma simplificada a síntese consiste na mistura de $FeCl_3 .6H_2O$ e $FeCl_2 .4H_2O$, com a razão estequiométrica de 2:1 (Fe^{3+} /Fe^{2+}). Foram pesados 24 g de $FeCl_3$. 6 H_2O (0,08879 mol) e 18 g de $FeCl_2$. 4 H_2O (0,0459 mol), adicionados ao balão e acrescidos de 500ml de H_2O mili-Q (degaseificada), procedeu-se a solubilização por 5 minutos e enfim adicionou-se 200 ml de hidróxido de amônio sob atmosfera de nitrogênio 95%, em fluxo positivo. Em condições anaeróbicas e pH elevado (8 a 14) com a razão estequiométrica $2Fe^{3+}$ /Fe^{2+} é esperada a formação de magnetita (Fe_3O_4). A secagem da magnetita foi realizada por liofilização (FERREIRA, 2013) (vide Figura 19).

Figura 19 - Esquema da rota de Sistema utilizado na síntese da magnetita e a montagem experimental.



Fonte: do próprio autor

Neste sentido, foi escolhido o método de coprecipitação devido às suas características únicas, como por exemplo, processo de mistura simples estequiométrica de dois sais de ferro (dupla e triplamente ionizados), e em seguida uma base (hidróxido de amônia) é acrescida a mistura, para que a mesma fique com pH entre 8 e 14, e assim as partículas de magnetita possam ser precipitadas rápido e uniformemente em menos tempo de reação, com economia de energia e homogeneidade das partículas geralmente com diâmetro entre 5 a 100nm. Essa é uma das rotas químicas mais simples para obtenção de magnetita. Para controle do tamanho e da forma, fatores como pH, força iônica, temperatura e natureza dos sais

podem ser variáveis. Com esse método é possível avaliar as propriedades microestruturais e magnéticas de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) sintetizados por reação coprecipitação sob atmosfera de nitrogênio (N_2). A influência do fluxo de N_2 durante a síntese afeta a microestrutura, morfologia e característica magnética do produto sintetizado. A característica magnética do produto sintetizado foi um dos parâmetros investigados.

10.2. Funcionalização das nanopartículas

Para a funcionalização utilizou-se o ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) como agente funcionalizante. A funcionalização ocorreu sob atmosfera de nitrogênio para evitar a oxidação da magnetita. A funcionalização segue os seguintes passos:

1) Preparo da solução aquosa do agente funcionalizante:
Solução de ácido cítrico: 0,2 mg de ácido cítrico em 1 mL de água ultrapura degaseificada.
2) Suspensão das nanopartículas em água: 1 g da amostra sintetizada em água ultrapura degaseificada foi sonicado (dissolvidas com auxílio de ultrassom) durante 10 minutos.
3) A suspensão de Magnetita foi misturada com a solução aquosa de ácido cítrico e agitada vigorosamente utilizando agitador mecânico durante 30 minutos, à temperatura de 80°C.
4) A suspensão foi lavada com água diversas vezes até que o valor do pH da água de lavagem se igualasse ao valor do pH da água. A amostra obtida foi congelada e liofilizada (FERREIRA, 2013).

10.3. Caracterização química estrutural

Após a etapa de síntese a amostra sintetizada na UFMG passou por caracterização química e estrutural através das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raio X (DRX), medida de área superficial pelo método de BET, medição de potencial zeta, espectroscopia Mössbauer e magnetização. Na amostra funcionalizada foi realizado o ensaio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi também avaliada a citotoxicidade e viabilidade celular *in vitro,* por contato direto,

utilizando o ensaio colorimétrico de azul de tripan, MTT e difusão em ágar nas amostras sintetizadas e funcionalizadas.

10.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV foi realizada no laboratório da empresa Phoster. O equipamento utilizado é da marca Tecsan. A amostra sintetizada foi colocada em lâmina de ouro, colocado em porta amostra e foram realizados aumentos de 300 x, de 600 x, de 740 x, aumento de 3500 x, e aumento de 4100 x.

10.3.2 Difração de Raio X (DRX)

O ensaio de DRX foi realizado no Centro Federal Tecnológico de Minas Gerais (CEFET-MG), no laboratório de Microscopia e Caracterização. O equipamento utilizado é da marca Shimadzu, 7000 XRD. Foi usado um tubo de raio x de Cobre com tensão de 40 kV e corrente 30 mA. A varredura foi realizada de 10 a 80º em tomada fixa de 2 segundos. Foi também realizada de forma complementar uma análise EDX para verificar a composição química da amostra e direcionar a identificação da fase na DRX. A identificação foi realizada através do software X-powder com Banco de dados do ICDD PDF-2002.

10.3.3 Espectroscopia Mössbauer

A espectroscopia Mössbauer de Fe^{57} foi realizada em um espectrômetro convencional no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com aceleração constante, fonte de Co^{57} em Rh matriz mantida à temperatura ambiente (RT) utilizando a geometria de transmissão. O sistema Mössbauer utilizado no CDTN utiliza um transdutor controlado por uma unidade de comando por função linear e detectores da radiação do tipo contador proporcional com câmara de gás com 97% de Criptônio e 3% de CO_2 na pressão de 1atm. Os espectros foram analisados quantitativamente, usando um método computacional específico através do software Normos. Os desvios isoméricos (IS) foram padronizados em relação a Fe natural (α-Fe). Foram obtidas propriedades magnéticas à temperatura ambiente em um magnetômetro de amostra vibrante de Lakeshore 7404.

10.3.4 Ensaio de Magnetização

A magnetização foi realizada à temperatura ambiente em um magnetômetro de amostra vibrante de Lakeshore 7404. Nesta análise foram obtidas curvas de histerese da amostra sintetizada, da qual é possível determinar parâmetros como coerciva, campo magnético, a magnetização de saturação, a magnetização máxima e a magnetização de campo zero.

10.3.5 Análise de área superficial e porosidade por adsorção de N2 (BET)

As análises de área superficial foram realizadas no equipamento Nova 2200 da marca Quantachrome. Foi feito o ensaio em aproximadamente 0,5g de material magnético utilizando-se porta-amostras de 9 mm de diâmetro sem bulbo, e análise utilizando-se o preenchedor filler rod. A preparação foi feita por 16 h a 350ºC e as análises foram de 40 pontos numa isoterma completa.

10.3.6 Medição do Potencial Zeta

O óxido de ferro foi analisado em dispersão em água deionizada. A dispersão foi tratada em banho de ultrassom por 20 minutos. Dos 60 g de dispersão preparados, foram utilizados 18 mL para cada titulação, iniciando-se pelo pH normal da solução. A cada pH foram feitas 3 medidas, sendo que cada uma delas consiste em 20 medições únicas. O equipamento utilizado foi o Zetasizer Nano ZSP da marca Malvern. Os ensaios foram realizados no Instituto Leibniz de Novos Materiais (INM) em Saarbrücken, Alemanha.

10.4. Testes Biológicos

Os testes biológicos foram realizados no Serviço de Biologia Celular da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento da Fundação Ezequiel Dias (FUNED). Foram realizadas técnicas *in vitro* utilizadas para investigação de citotoxicidade e viabilidade celular das nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas e não funcionalizadas.

10.4.1 Viabilidade celular pelo método de MTT

10.4.1.1 Cultivo celular de células fibroblastos Wi-26 VA4

As células utilizadas foram os fibroblastos WI-26 VA4 (ATCC® CCL-95.1™). Foram cultivados em meio Eagle's Minimum Essential Medium - EMEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino e L-glutamina a 1%. O cultivo foi realizado em frascos de cultivo em poliestireno (TPP®) e mantido à temperatura de 37° com atmosfera enriquecida com 5% CO_2.

As células foram mantidas previamente criopreservadas em 5% de DMSO em um tanque de nitrogênio líquido, lotado no Serviço de Biologia Celular da Fundação Ezequiel Dias. Após descongelamento, elas foram acondicionadas em frasco de cultivo T-25, contendo 10^6 células/ml em uma suspensão de 1 ml e 5mL de meio de cultura EMEM suplementado. O crescimento celular foi acompanhado por meio de observação em microscopia óptica invertida (Olympus CK40).

10.4.1.2 Manutenção das culturas celulares

As células WI-26 VA4 foram subcultivadas formando uma monocamada confluente, e replicadas com tripsinização. Após a retirada do meio de cultura da garrafa, foram adicionados 2 mL de tripsina e retirado na mesma hora para lavagem da garrafa. Posteriormente foram adicionados a garrafa 3 mL de tripsina e a mesma foi incubada por 3 minutos em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37ºC. Após incubação a garrafa foi agitada levemente e seu conteúdo foi retirado com pipeta, colocado em tubos de centrífuga (Falcon) e centrifugado à 810rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuspendido com 10 mL de meio, sendo as células subcultivadas em frascos maiores (T-75). Esse procedimento de subcultura foi realizado uma vez por semana, e a troca de meio, ou seja, retirada do meio de cultura do frasco e acréscimo de meio novo, foi realizada a cada dois dias.

10.4.1.3 Preparo das amostras para ensaios de citotocixidade

Foram utilizadas nos testes quatro amostras: magnetita sintetizada no departamento de Química da UFMG e funcionalizada na Fundação Ezequiel Dias (FUNED), magnetita sintetizada na Vale (rejeito industrial do processo de extração da titânia),

magnetita sintetizada e funcionalizada no laboratório Phoster, magnetita cedida pelo laboratório Phoster não funcionalizada. As amostras estavam inicialmente em estado sólido (pó), sendo preparadas soluções de cada amostra na concentração de 4mg/mL utilizando água deionizada purificada no sistema Milli-Q® (Millipore, EUA). Para a diluição das amostras na água, foi utilizado o Ultrassom THORNTON, e posteriormente utilizado o Vórtex. As soluções foram filtradas, em filtros de tamanho 0,45um (Millipore, EUA) em ambiente estéril, dentro da capela de fluxo laminar (VECO). Após os procedimentos, a solução estava pronta para utilização nos testes.

10.4.1.4 Diluicão Seriada

Para saber qual a melhor concentração celular nos poços para realizar os experimentos, foi realizada a diluição seriada. As células foram tripsinizadas e semeadas em duas placas de 96 poços (SARSTEDT), em triplicatas na concentração inicial de $2x10^5$ células/poço sendo diluídas pelo método de diluição seriada, na concentração final de $0,125x10^5$ células/poço. As células foram incubadas a 37°C em estufa com atmosfera de CO_2 a 5%. Após 24 horas, após a verificação do crescimento celular em monocamada nos poços de uma placa, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS 1X (100µL/poço) e foi adicionado o reagente MTT em meio sem suplementação (100µL/poço) a 0,5 mg/mL. Foi realizada nova incubação por 3 horas e após esse período, a placa foi centrifugada por 10 minutos a 1000 rpm, o sobrenadante foi retirado e foi adicionado 100 µL/poço de DMSO a fim de solubilizar os cristais de formazan. Finalmente, a leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax® M5e), no comprimento de onda de 550 nm. Após mais 24 horas, o mesmo procedimento foi realizado com a outra placa, obtendo assim um gráfico de viabilidade celular com 24 e 48 horas.

10.4.1.5 Viabilidade celular pelo método de MTT com exposição das amostras

As células foram tripsinizadas e semeadas em triplicatas com concentração de 1 x 10^5 células/poço em placas de 96 poços (SARSTEDT) e incubadas a 37°C em estufa com atmosfera de CO_2 a 5%. Após 24 horas, após a verificação do crescimento celular em monocamada nos poços, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS 1X (100µL/poço) e foram introduzidas amostras de

magnetita diluídas em água Milli-Q em triplicata na concentração inicial de 2mg/mL, a qual foi diluída mais quatro vezes, também em triplicatas, através da diluição seriada com meio EMEM suplementado com 1% de soro fetal bovino. Também foram realizados os controles de vida, somente em meio de cultura, o controle de solução, contendo água Milli-Q (Milli-Q®), e o controle de morte, contendo água oxigenada. Ambos os controles foram realizados em triplicata. As placas foram novamente incubadas durante 24 horas. Após esse período, o meio de cultura com as soluções foi retirado e as células foram novamente lavadas com PBS 1X. Posteriormente, foi adicionado o reagente MTT em meio sem suplementação (100µL/poço) a 0,5 mg/mL. Foi realizada nova incubação por 3 horas e após esse período, a placa foi centrifugada por 10 minutos a 1000 rpm, o sobrenadante foi retirado e foi adicionado 100 µL/poço de DMSO a fim de solubilizar os cristais de formazan. Finalmente, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax® M5e), no comprimento de onda de 550 nm. A viabilidade celular é calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade Celular} = \frac{\text{Absorvância da amostra de células tratadas}}{\text{Absorvância do controle de vida}} \times 100$$

10.4.2 Avaliação de citotoxicidade pelo método de difusão em ágar

O teste de citotoxicidade por difusão em ágar foi realizado com fibroblastos Wi-26 VA4 semeados em placas de cultura de 6 poços na concentração de $5{,}5 \times 10^4$ células/mL. Após 24 h em cultura a 37ºC e atmosfera úmida com 5% CO_2, o meio de cultura foi trocado por meio EMEM fresco contendo ágar a 1,5% e indicador (vermelho neutro) na concentração de 0,4g/mL. Após solidificação, as amostras foram colocadas sobre o substrato no interior de cilindros de clonagem e incubadas por 24 horas sob as mesmas condições. Ao controle positivo foi adicionada água oxigenada a 3% e para controle negativo utilizou-se meio EMEM. A atividade citotóxica foi medida pelo diâmetro do halo de inibição do crescimento celular formado após exposição à amostra testada. A graduação do efeito citotóxico varia de 0 a 4, que significam: 0 - ausência (ausência de descoramento ao redor ou sob a amostra); 1 - leve (zona de descoramento limitada a área sob a amostra); 2 - branda (tamanho da zona de descoramento a partir da amostra menor que 0,5cm); 3 -

Moderada (zona de descoramento a partir da amostra entre 0,5cm a 2,0 cm) e 4 - Severa (zona de descoramento a partir da amostra maior que 1,0cm). Halos superiores a 2 cm indicam toxicidade da amostra.

10.4.3 Viabilidade celular pelo método de Azul de Tripan

10.4.3.1 Cultivo celular de células RKO-AS45-1 (ATCC®CRL-2579™)

As células RKO de câncer colorretal foram cultivados em meio RPMI 1640 (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino e L-glutamina a 1%. O cultivo foi realizado em frascos de cultivo em poliestireno (TPP®) e mantido à temperatura de 37°C com atmosfera enriquecida com 5% CO_2.

As células foram mantidas previamente criopreservadas em 5% de DMSO em um tanque de nitrogênio líquido, lotado no Serviço de Biologia Celular da Fundação Ezequiel Dias. Após descongelamento, elas foram acondicionadas em frasco de cultivo T-25, contendo 10^6 células/ml em uma suspensão de 1 ml e 5mL de meio de cultura RPMI 1640. O crescimento celular foi acompanhado por meio de observação em microscopia óptica invertida (Olympus CK40).

10.4.3.2 Manutenção das culturas celulares

As células RKO-AS45-1 (ATCC®CRL-2579™) foram subcultivadas formando uma monocamada confluente, e replicadas com tripsinização. Após a retirada do meio de cultura da garrafa, foram adicionados 2 mL de tripsina e retirado na mesma hora para lavagem da garrafa. Posteriormente foram adicionados a garrafa 3 mL de tripsina e a mesma foi incubada por 3 minutos em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37ºC. Após incubação a garrafa foi agitada levemente e seu conteúdo foi retirado com pipeta, colocado em tubos de centrífuga (Falcon) e centrifugado à 810rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuspendido com 10 mL de meio, sendo as células subcultivadas em frascos maiores (T-75). Esse procedimento de subcultura foi realizado uma vez por semana, e a troca de meio, ou seja, retirada do meio de cultura do frasco e acréscimo de meio novo, foi realizada a cada dois dias.

10.4.3.3 Preparo das amostras para ensaio de citotocixidade

Foram utilizadas nos testes duas amostras: magnetita sintética e magnetita sintética funcionalizada. As amostras estavam inicialmente em estado sólido (pó). Após maceração, foram preparadas soluções de cada amostra na concentração de 4mg/mL utilizando água deionizada purificada no sistema Milli-Q® (Millipore, EUA). Para a diluição das amostras na água, foi utilizado o Ultrassom THORNTON, e posteriormente utilizado o vórtex. As soluções foram filtradas, em filtros de tamanho 0,22µm (Millipore, EUA) em ambiente estéril, dentro da capela de fluxo laminar (VECO). Após os procedimentos, a solução estava pronta para utilização nos testes.

10.4.3.4 Viabilidade celular pelo método de Azul de Tripan com exposição das amostras

Após tripsinização, as células de câncer colorretal RKO-AS45-1 (ATCC®CRL-2579™) foram semeadas em triplicata em placas de 24 poços (CORNING®) na concentração de $2x10^4$ células em meio RPMI 1640 e incubadas com a magnetita nas concentrações 1,5, 0,75 e 0,375mg/mL em estufa com atmosfera de CO_2 a 5%.

O controle negativo foi tratado somente com meio de cultura RPMI 1640 e o positivo com água oxigenada 3%. Após 48 horas o meio de cultura foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5 mL. As células foram lavadas com PBS 1X (200µL/poço) e adicionou-se 100µL de tripsina em cada poço. O meio de cultura dos eppendorfs foi transferido para os respectivos poços, para que a tripsina fosse inativada. Homogeneizou-se o conteúdo de cada poço e transferiu-se novamente para o respectivo eppendorf. Posteriormente o conteúdo foi centrifugado por 5 minutos a 1500rpm e o sobrenadante de cada tubo foi descartado. Ao pellet restante foi adicionado 30 µL de meio RPMI 1640 (10 % SFB e 1% L- glutamina) seguidos por 30 µL de solução azul de tripan. Após homogeneização, foi retirada uma alíquota de 10 µL de cada eppendorf e colocadas na câmara de Neubauer para contagem. Foi realizada a contagem, diferenciando células coradas (não viáveis) das não-coradas (viáveis). A viabilidade celular foi expressa em percentual de células viáveis em relação às células totais (viáveis e não-viáveis). O mesmo procedimento foi também realizado com placas incubadas após 72 horas.

11. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o processamento da síntese das NPMs foi possível fazer uma análise visual acompanhada das propriedades magnéticas (vide Figura 20).

Figura 20 - Amostra de magnetita sintetizada



Fonte: do próprio autor

A amostra obtida por coprecipitação apresentou-se predominantemente preta, e demonstrando com caráter fortemente magnético, estes são indícios característicos de amostras provavelmente constituída de elevado percentual de magnetita (Fe_3O_4). Ferreira (2013), constatou que a magnetita é preta enquanto a maghemita (γ–Fe_2O_3) é marrom, o que corrobora a observação do presente trabalho.

11.1. Caracterização química estrutural de amostra após a síntese

11.1.1 Espectroscopia de fluorescência de raios X (EDX)

Os resultados semi-quantitativos de análise química por espectroscopia de fluorescência de raios X são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Resultado de EDX da magnetita sintética

Analito	Resultado
Fe	98%
Al	0.5%
Outros	1.5%

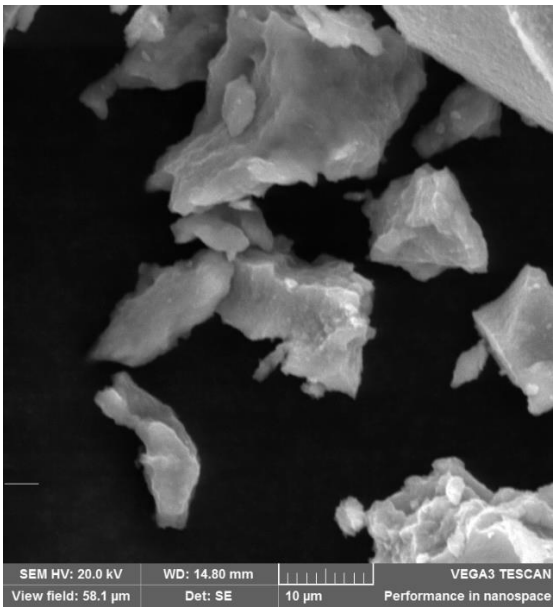
Fonte: dados da pesquisa

Observa-se que a amostra sintetizada apresenta aproximadamente 98% de ferro com baixo teor de Al e outros elementos químicos.

11.1.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A amostra sintetizada na UFMG foi colocada no suporte porta-amostras do MEV (“stub”), posteriormente foi recoberto com uma fina camada de folha de ouro. Após a metalização, foi realizado o ensaio de MEV juntamente com a análise de EDX (espectrometria de energia dispersiva de raios-x). As imagens da fotomicroscopia realizada para a amostra sintetizada são apresentadas na figura 21.

Figura 21 - Microscopia eletrônica de varredura de magnetita após a síntese.



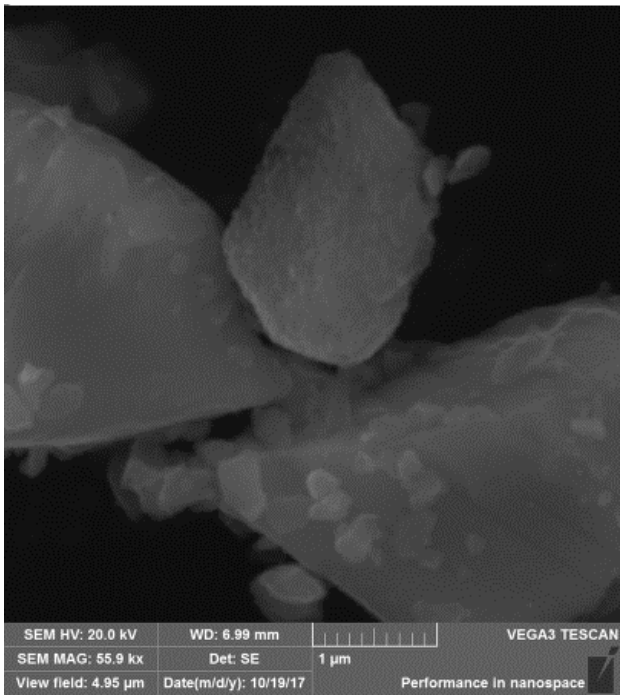
Fonte: do próprio autor

A amostra apresentou partículas com granulometria maior que 10 µm, e ainda muito agrupadas (aglomeradas). Há uma indicação de distribuição bimodal de tamanho de partícula (duas faixas de tamanho de partículas). Observou-se através do MEV que os pós e grânulos são possivelmente constituída de aglomerados de partículas coloidais mesmo após a funcionalização, e com composição compatível com as magnetitas sintetizadas encontradas na literatura (Figura 22). Além disso, é possível que as partículas menores estejam aglomeradas quando em forma de pó, pois de acordo com a literatura, a estabilidade dessas partículas é fortemente dependente de forças atrativas (de curto alcance constituindo as forças de van der Walls, e de longo alcance, as forças dipolares magnéticas) e repulsivas (eletrostática devido à

carga na superfície das NPs a estabilidade devido às interações eletrostáticas) (THANH, 2012; ZOTTIS, 2015).

As partículas apresentaram um certo grau de polidispersividade o que é característico em partículas sintetizadas pelo método de coprecipitação segundo a literatura (ZOTTIS, 2015).

Figura 22 - Microscopia eletrônica de varredura de magnetita após funcionalização.



Fonte: do próprio autor

A funcionalização com ácido cítrico não se mostrou efetiva. Observou-se partículas ainda muito agrupadas, com distribuição bimodal de tamanho de partícula, submicrométricas e também partículas maiores que 1µm.

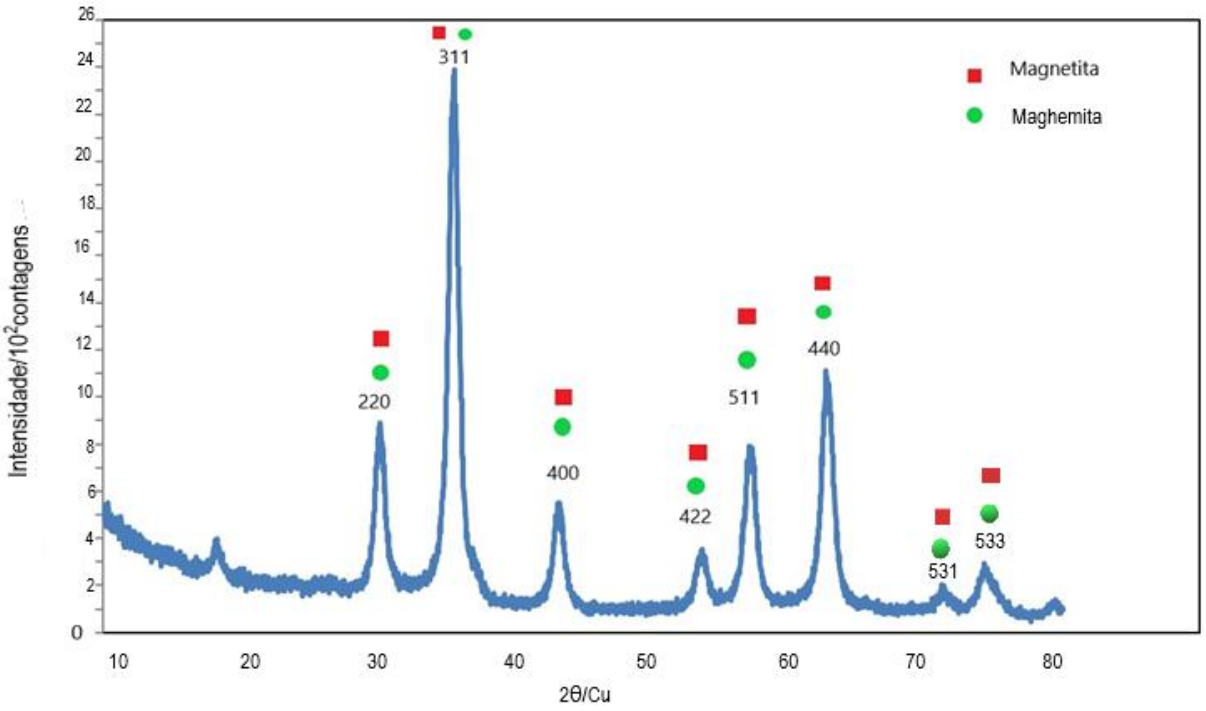
O tamanho das partículas pode ser alterado através de técnica de moagem em altas energias (técnica do tipo top down), pois a técnica permite a redução de materiais de um tamanho maior para micro e nanoescala em uma escala tridimensional (FONTANIVE et al, 2014, SANTANNA, 2008; COTICA, 2004).

As análises complementares de EDS, confirmam o resultado de EDX mostrando que a amostra possui um teor de 98,3% de ferro, e elementos residuais como alumínio, fósforo, manganês, dentre outros elementos químicos na forma de traços.

11.1.3. Difração de raio X - DRX

A figura 23 apresenta o difratograma de raio X da amostra de magnetita sintetizada (coprecipitação) no Departamento de Química da UFMG.

Figura 23 - Difratograma raio X da amostra de magnetita sintetizada na UFMG.



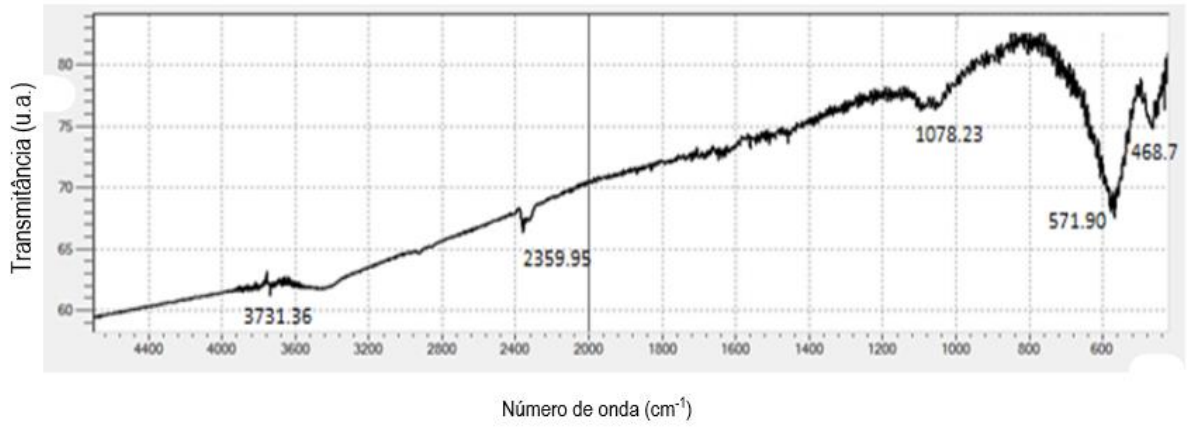
Fonte: dados da pesquisa

A análise de DRX foi comparada com padrões tabelados para a magnetita (Fe_3O_4) (PDF 19-629) e maghemita (γ–Fe_2O_3) (PDF 39-1346), obtidos no banco de dados ICDD-PDF. O ensaio mostrou picos com fases de magnetita e maghemita (vide Gráfico 1). Através da comparação, pode se afirmar que a amostra apresenta a estrutura do espinélio, os picos alargados sugerem dimensão nanométrica dos cristalitos, o que dificulta a distinção entre a magnetita e maghemita. O tamanho dos cristalitos das partículas de magnetita nas amostras foram da ordem de 20 a 40 nm. Tais observações estão de acordo com a literatura (ZOTTIS, 2015, FERREIRA 2013).

11.1.4. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de infravermelho da amostra NPM sintética é apresentado na figura 24.

Figura 24 - Espectro de FTIR da amostra sintética.



Fonte: dados da pesquisa

Na região de aproximadamente 3700-3400 cm^{-1}, as bandas são atribuídas ao estiramento de moléculas de H_2O. Na região de aproximadamente 2350 cm^{-1}, as bandas atribuídas ao CO_2 atmosférico apresentam comportamento “negativo”, ou seja, o branco feito antes da análise em si continha maior teor de CO_2, provavelmente devido a uma exposição prolongada ao ar. Entre 1600 e 1200 cm^{-1}, observa-se franjas de interferência, atribuídas a umidade na amostra ou no sistema.

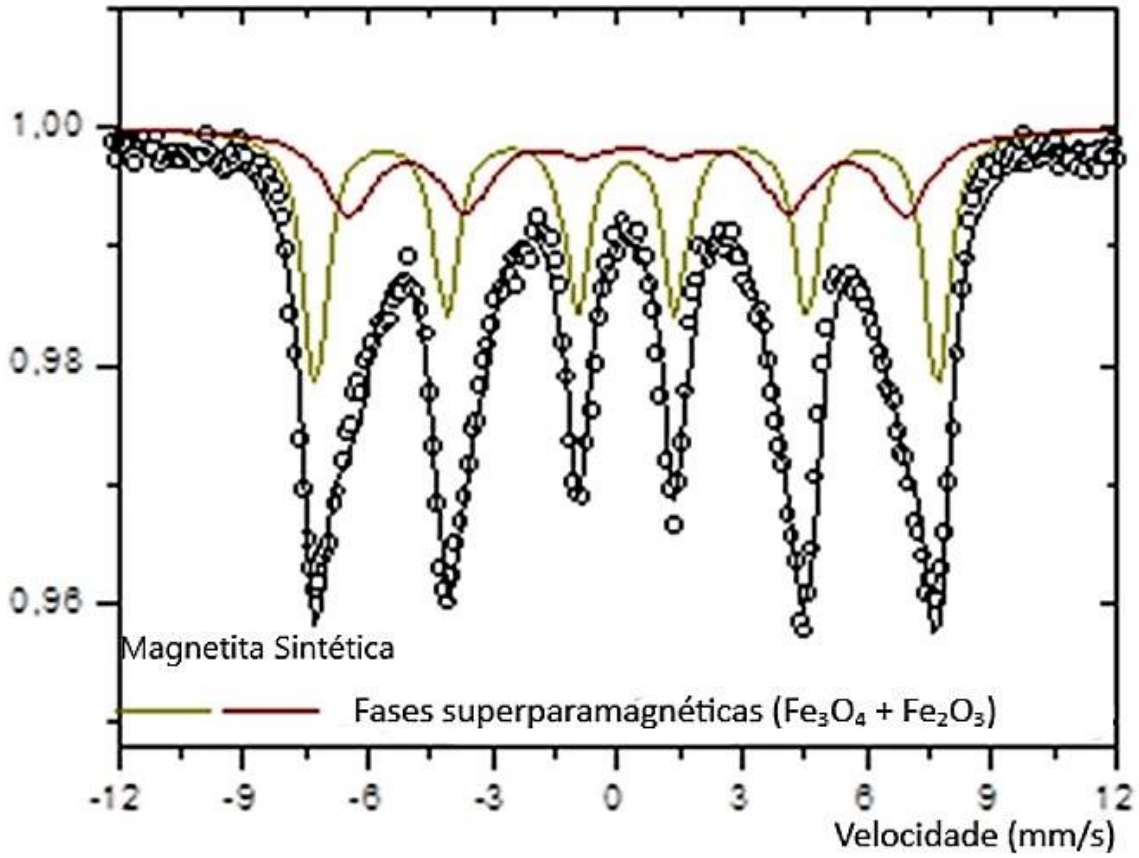
A banda em 571 cm^{-1} é atribuída ao estiramento de grupamentos Fe-O, característicos da hematita ou da magnetita. Finalmente, as bandas na região de 466 cm^{-1} são indicativos de grupamentos ácidos. A curvatura do espectro é descrita pela literatura como efeito do espalhamento da radiação de infravermelho pela presença de partículas inorgânicas.

De acordo com a literatura, tanto a magnetita quanto a maghemita apresentam estrutura de espinélio inverso. A análise de FTIR de grupo mostra, que para a fase de magnetita são esperadas duas bandas no espectro FTIR: uma mais intensa e alargada em 580 cm^{-1} e a outra menos intensa em 400 cm^{-1} (SCHWERTMANN, 2003; FERREIRA, 2013). Neste caso, a amostra apresentou bandas próximas aos espectros de referência o que evidencia a presença de magnetita no material.

11.1.5. Espectroscopia Mössbauer

Os espectros Mössbauer obtidos a temperatura ambiente (vide Figura 25), assim como a Tabela 3 de parâmetros hiperfinos são apresentados a seguir.

Figura 25 - Espectro Mössbauer de magnetita sintetizada à temperatura ambiente utilizando a geometria de transmissão.



Fonte: dados da pesquisa

De acordo com Ferreira (2013), a magnetita é um óxido de ferro ferrimagnético, em que a estrutura química é formada por duas simetrias de coordenação Fe-O: uma tetraédrica (comumente, denominados sítios A) e outra octaédrica (sítios B). Da sonda nuclear Fe^{57}, cada um dos sítios apresenta um campo hiperfino característico.

Foram identificadas as fases magnetita e maghemita da amostra (Tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros hiperfinos dos espectros Mössbauer de Fe^{57}obtidos a temperatura ambiente

Amostra (RT)	**Fase**	**δ ± 0,05 (mm/s)**	**Deq ± 0,05 (mm/s)**	**B_{HF} ± 0,5 (T)**	**Área relativa ± (1%)**
Magnetita sintética	Mix (Fe_3O_4 + γ– Fe_2O_3) (*)	0.31	-0.06	46.1	45
		0.34	-0.02	41,5	55

*comportamento superparamagnético a 25°C.

Fonte: dados da pesquisa

A técnica de espectroscopia Mössbauer fornece valores para o deslocamento isomérico das fases, em relação ao αFe, dado por δ (mm/s). Além disso, são obtidos também valores para o desdobramento quadrupolar (D) e o campo magnético hiperfino (B_{hf}). A partir destes dados foi possível distinguir as fases ferrosas e seus percentuais, complementando dos achados da DRX para esta mesma amostra. Assim, as NPMs sintéticas apresentaram basicamente as fases magnetita (Fe_3O_4) com cerca de 45% e maghemita (γ–Fe_2O_3) da ordem de 55%, em massa.

Segundo Partiti (2005), quando as partículas forem de dimensões nanométricas, podem apresentar relaxação superparamagnética, e nesse caso, o campo hiperfino flutua muito rapidamente no tempo e a forma do espectro Mössbauer se altera, podendo colapsar totalmente para uma única linha. O espectro da amostra sintetizada apresenta formação de uma única linha, o que é indicativo de comportamento superparamagnético.

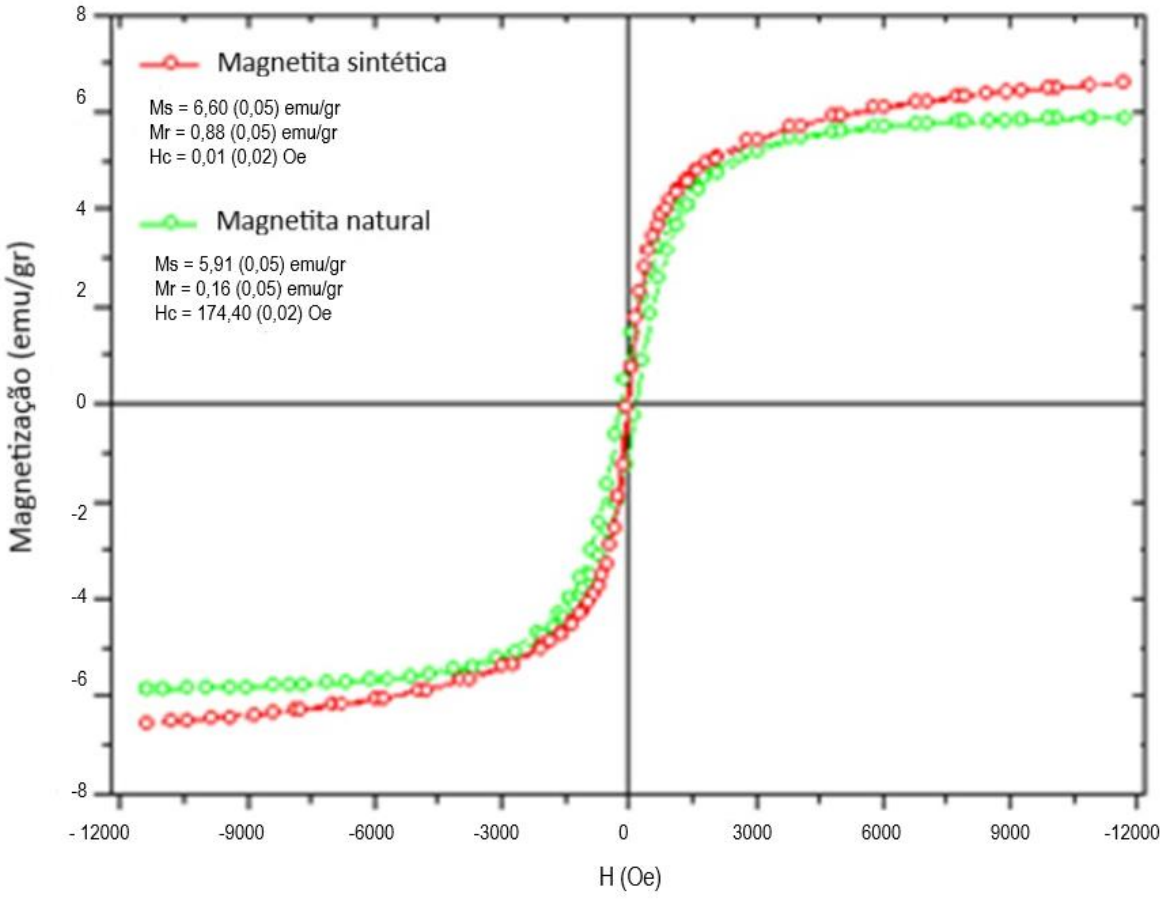
De acordo com o espectro Mössbauer à temperatura ambiente apresentado pela amostra observa-se um espectro com picos alargados, característico de comportamento superparamagnético nanoestruturado.

11.1.6. Magnetização

As curvas de histerese magnética da amostra sintética foram obtidas conjuntamente com uma amostra natural contendo cerca de 64% de magnetita (Fe_3O_4) e 36% outros óxidos de ferro (α– Fe_2O_3, γ–Fe_2O_3 e $Fe_{1-x}O$).

As medidas de magnetização do material sintético e deste material natural são apresentadas na Figura 26.

Figura 26 - Comparação das magnitudes de magnetização entre magnetita sintética (produzida na dissertação) e uma magnetita natural obtido do laboratório da Phosther.



Fonte: dados da pesquisa

Através destas curvas é possível determinar parâmetros como coerciva, campo magnético, a magnetização de saturação, a magnetização máxima e a magnetização de campo zero. Esses resultados mostram que ambas as amostras apresentam baixa ou nenhuma perda por histerese, e comportamento muito similar

sob ação de campo eletromagnético alternado. Confirmando, portanto, o comportamento superparamagnético de ambos os materiais ensaios.

A magnetização de saturação (M_S) da amostra não funcionalizada de 6,6 emu/gr está cerca de uma ordem de grandeza abaixo dos valores esperados para amostra de magnetitas nanométricas. Este resultado reflete possivelmente o efeito de aglomeração e/ou agregação com baixa área superficial as partículas, conforme observados nas micrografias de MEV. O valor padrão para nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 não recobertas está registrado na literatura em uma faixa entre 92-100emu/gr a 300K (LEE, N.; HYEON, 2012; ROSEN et al., 2012).

A baixa magnetização da amostra sintética pode ser explicada pela aglomeração das partículas ultrafinas, que dificulta o alinhamento do campo magnético de partículas devido à maior relação superfície área-volume (partícula menor), tornando maior a contribuição de momentos não alinhados e menor magnetização.

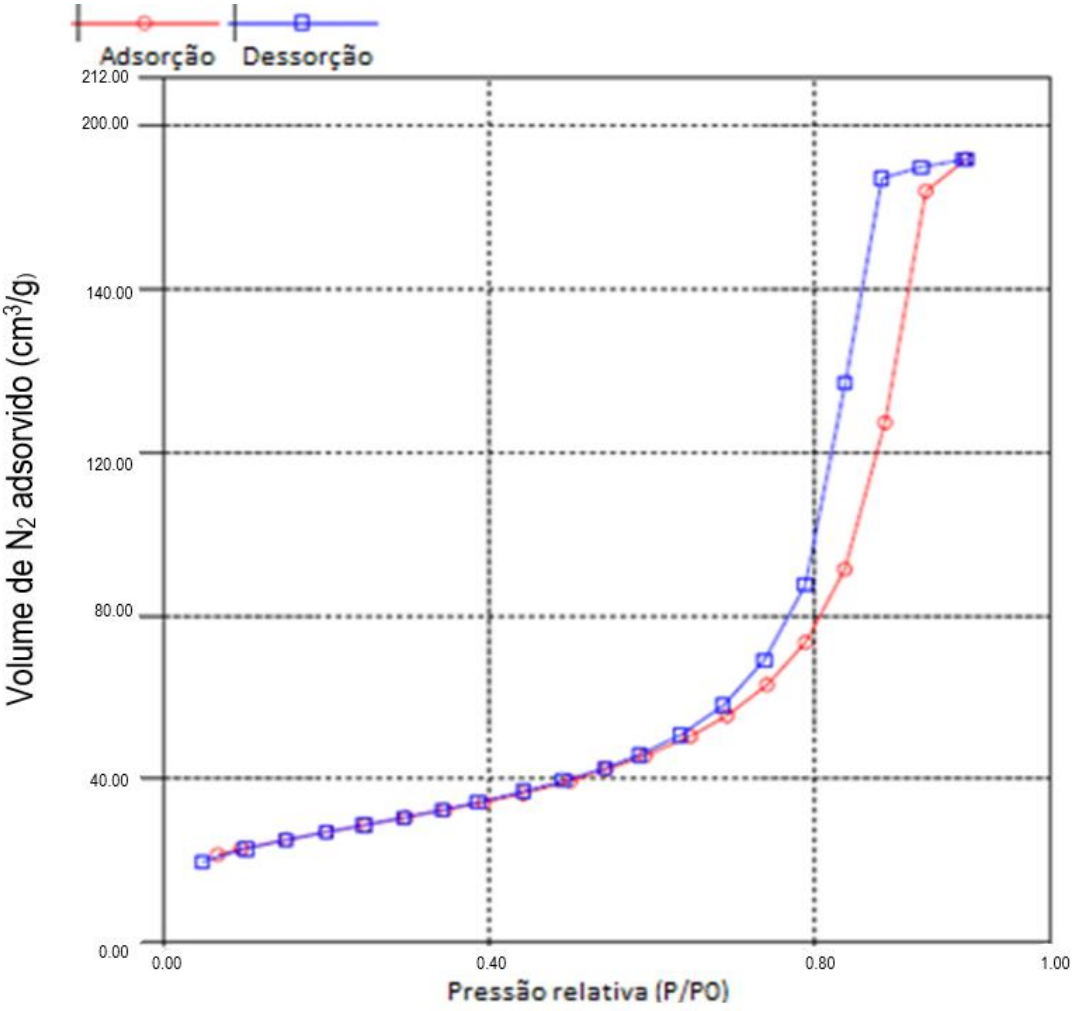
Na literatura, Thanh (2012) e Lee (2012) destacam que as nanopartículas com perfil superparamagnético apresentam curva de histerese nula, valor de Ms elevado, Mr e Hc com valores baixos ou desprezíveis, assim os valores obtidos pela amostra no ensaio mostram que estão de acordo com a literatura. A coercividade da amostra mostra que o diâmetro crítico de transição de monodomínio para multidomínio está entre 20 e 40 nm. Valores baixos de coercividade podem ser atribuídos às partículas de menor tamanho (BECYTE et al., 2016), a amostra em questão apresenta baixo valor de coercividade o que pode indicar a presença de partículas de menor tamanho formando clusters.

O efeito do superparamagnetismo, evita a agregação das partículas na solução, em ambas as situações, quando em armazenamento e após administração intravenosa (NEUBERGER et al., 2005). Uma vez que, após supressão do campo magnético aplicado (H), as partículas deixam de apresentar a interação magnética, e se comportam como materiais paramagnéticos (ZOTTIS, 2015).

11.1.7 Análise de área superficial e porosidade por adsorção de N_2 (BET)

Os resultados das análises de área superficial e porosidade são apresentadas na figura 27.

Figura 27 – Isotermas da amostra de magnetita sintética



Fonte: dados da pesquisa

Pelo perfil das isotermas obtidas é possível concluir que a amostra sintética apresenta comportamento do tipo V definido pela IUPAC, onde o valor de C é menor que 2, ou seja, interações fracas e saturadas. Há indícios de interações fracas entre adsorbato e adsorvente, indicado pela ausência de um “joelho” no início da adsorção.

O tipo de histerese do material sintético é classificado como H1, que indica uma distribuição estreita e relativamente uniforme de poros. A conclusão é dada pelo atraso do efeito de dessorção.

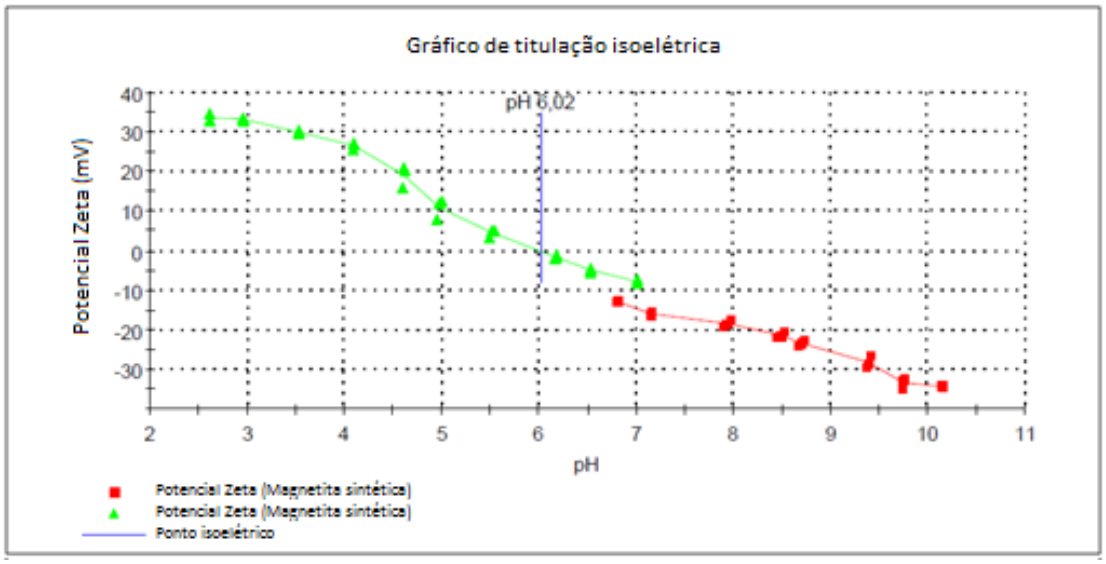
Foram obtidos valores de área superficial das amostras por cálculo realizado no software do equipamento, pelo método multi-point BET. A magnetita sintética apresentou área superficial de 86,129 m²/g. A textura porosa avaliada pelo método BJH do óxido de ferro revelou aparentemente que o N_2 utilizado na síntese contribui para o aumento da microporosidade do material evitando outras impurezas.

De acordo com Fungaro (2010), obteve-se no presente trabalho resultados experimentais relativamente semelhantes aos obtidos também por outros autores. A magnetita apresentou tamanho de cristalitos menores do que 40nm (entre 20 e 40 nm) embora possivelmente agregada, e acusou-se a presença de maghemita como impureza. As duas amostras magnéticas sintetizada (funcionalizada e não funcionalizada) apresentaram comportamento superparamagnético. Ambos apresentaram uma forte atração pelo imã sem se tornarem magnéticos. Este comportamento associado à propriedade adsortiva (BET e BJH) das amostras sintéticas, reforçam que esta tecnologia de baixo custo permite o emprego destas amostras em técnicas de adsorção e/ou separação magnética.

11.1.8 Potencial Zeta

Na figura 28, é apresentado o resultado de potencial zeta da amostra de magnetita sintética.

Figura 28 - Resultado de potencial zeta da amostra de magnetita sintética



Fonte: dados da pesquisa

A amostra sintética não funcionalizada apresenta o ponto isoelétrico (representa a situação na qual a suspensão atinge sua máxima instabilidade) em pH 6. Em suspensões com valores de potencial zeta maiores que +30mV ou menores que -30mV são considerados estáveis, portanto, a amostra em questão possui estabilidade em meio aquoso quando em pH abaixo de 3 e acima de 9. Em estudo recente, para amostras de magnetita não funcionalizadas a solução alcança estabilização abaixo de 5,5 e acima de 9, já para as funcionalizadas com ácido cítrico, a estabilização ocorre em pH acima de 7 (FERREIRA,2013).

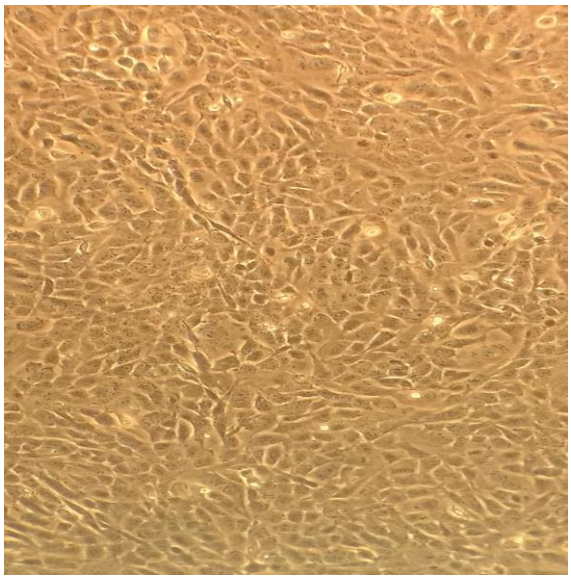
A magnitude do potencial zeta dá uma indicação da potencial estabilidade do sistema coloidal. Se todas as partículas em suspensão têm um potencial zeta grande e negativo ou positivo, então elas tendem a se repelir (±20mV), nesse caso não há formação de aglomerados (abaixo do pH 4,5 ou acima do pH 8,0) e a suspensão coloidal é estável. Entretanto, se as partículas têm baixos valores de potencial zeta pH entre 4,5 e 8,0 então não existem forças que inibem a atração entre as partículas, sendo assim grandes aglomerados são formados, fato observado nas fotomicrografias de MEV. O fator que mais afeta o potencial zeta é o pH. Geralmente, em pH's ácidos a partícula assume carga positiva, e o potencial zeta será positivo, em pH's básicos o potencial zeta tende a ser negativo (FERREIRA, 2013).

11.2. Caracterização biológica

11.2.1 Cultivo Celular

A figura 29 mostra a confluência da cultura das células formando uma monocamada.

Figura 29 - Monocamada das células WI-26 VA4 cultivadas em frascos tratados para adesão (poliestireno) em aumento de 20x.



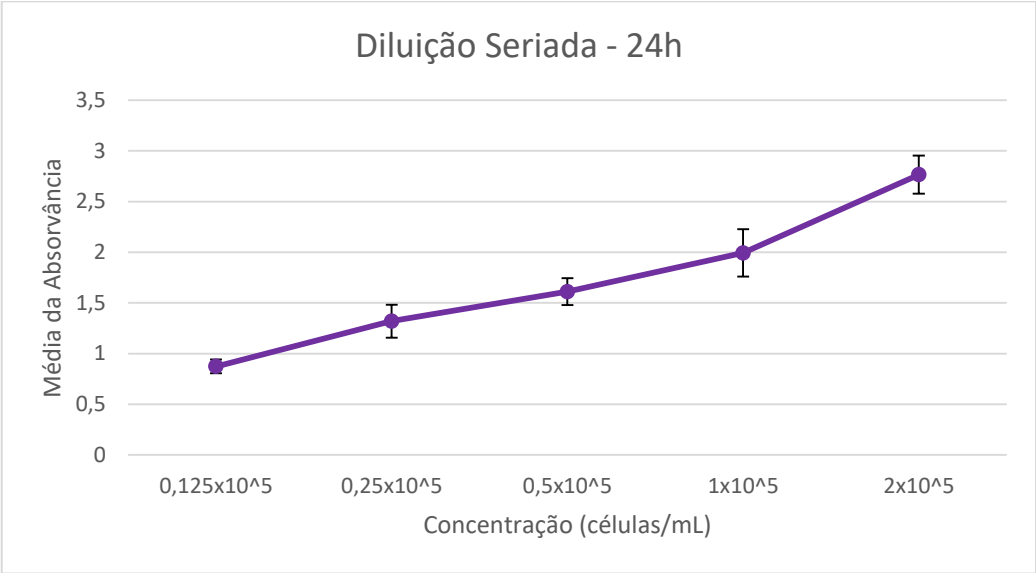
Fonte: dados da pesquisa

As células de fibroblasto WI-26 VA4 (ATCC) foram cultivadas em frascos de cultivo (CORNING®) para células aderentes, e apresentaram confluência em cultura após de tempos superior a 72h, com uma morfologia epitelial típica.

11.2.2 Diluição Seriada

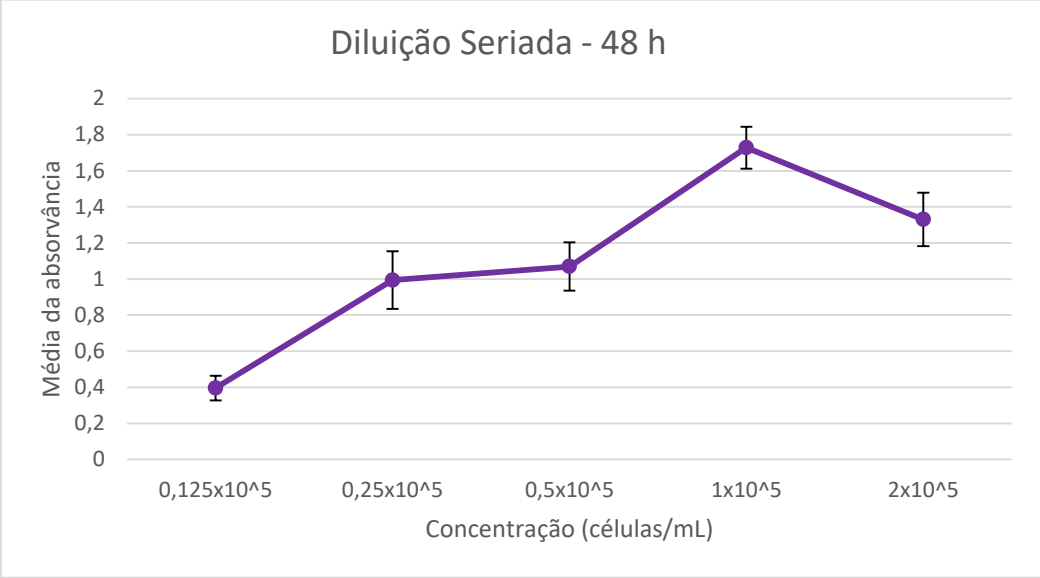
Os resultados de plaqueamento celular de forma seriada demonstraram que a viabilidade celular foi maior após 24 horas com as células incubadas na concentração de $2x10^5$/mL, no entanto após 48 horas observou-se que a concentração de $1x10^5$/mL foi a que apresentou cultura com semiconfluência possivelmente ainda em monocamada (vide Gráfico 1 e 2).

Gráfico 1 - Diluição seriada após 24 horas de incubação.



Fonte: dados da pesquisa

Gráfico 2 - Diluição seriada após 48 horas de incubação.



Fonte: dados da pesquisa

Foi decidida a utilização da concentração de $1x10^5$/mL nos estudos posteriores, pois a viabilidade nessa concentração após 24 horas foi elevada, sendo também a que apresentou maior viabilidade celular após 48 horas.

As funções de distribuições apresentam um comportamento exponencial para o crescimento em culturas celulares típica de monocamada com baixa densidade em

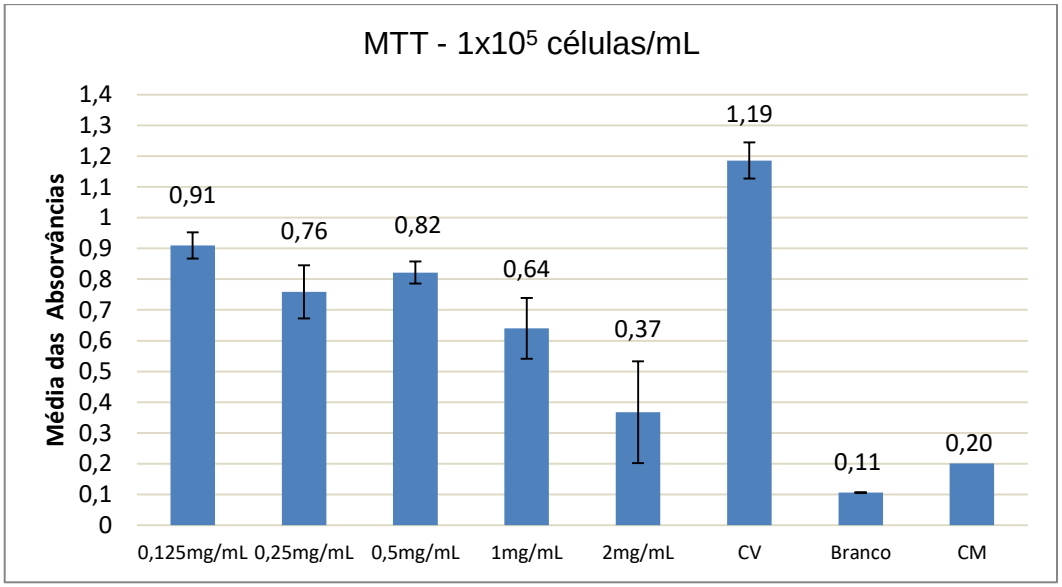
tempo de 24h. Já no repique de 48h observa-se uma lei de potência na cultura com a passagem de uma cultura semiconfluente para uma confluente nas concentrações de plaqueamento de $1x10^5$/mL e $2x10^5$/mL, onde há uma transição irreversível com possível morte celular. Os resultados em 48h levantam uma hipótese de que as restrições ao crescimento impostas por uma longa permanência das células em cultura não seria possível nesta concentração, constituindo uma evidência bastante indireta para restringir o seu uso em tempos de 72h.

Nos experimentos posteriores (MTT, difusão em ágar e azul de tripan) envolvendo várias propriedades de quantificação do crescimento e viabilidade celular onde a densidade de saturação celular tem um fator preponderante, optou-se por plaquear inicialmente com uma menor concentração para viabilizar o crescimento em suspensão em tempos de até 72 h com células cultivadas em monocamadas.

11.2.3 Ensaio de citotoxicidade pelo método de MTT

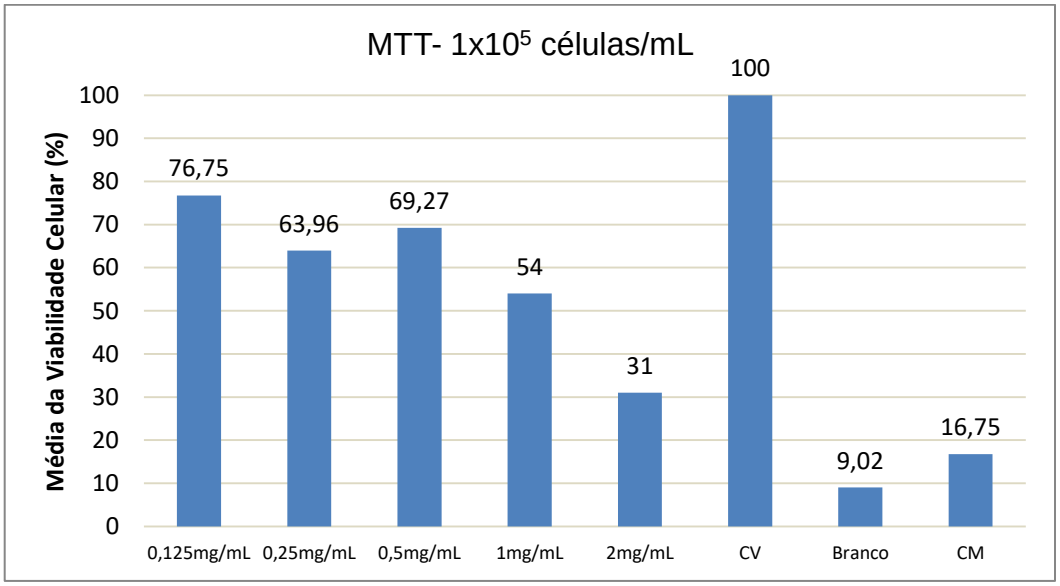
As células foram cultivadas com concentração de nanopartículas de magnetita variando 0,125 a 2,0 mg/mL, incubadas com $1x10^5$ células/mL em placas para cultura de células de 96 poços. Os resultados das leituras da densidade ótica e média da viabilidade celular são mostrados nos Gráficos 3 e 4, as culturas foram observadas após 24h de exposição à amostra, em ensaios em triplicatas para cada concentração.

Gráfico 3 - Média das absorbâncias óticas em função da concentração de nanopartículas



Fonte: dados da pesquisa

Gráfico 4 - Análise da viabilidade celular em função da concentração de nanopartículas



Fonte: dados da pesquisa

Os resultados do ensaio de MTT demonstram que a maior sobrevida celular ocorreu na concentração 0,125 mg/mL, apresentando viabilidade celular de 76,75%. Foi também observado ao microscópio que as células cresceram de modo a constituírem colônias ao redor das nanopartículas de magnetita. Com esta finalidade foi que as células foram plaqueadas a densidades mais baixas, de modo a permitir

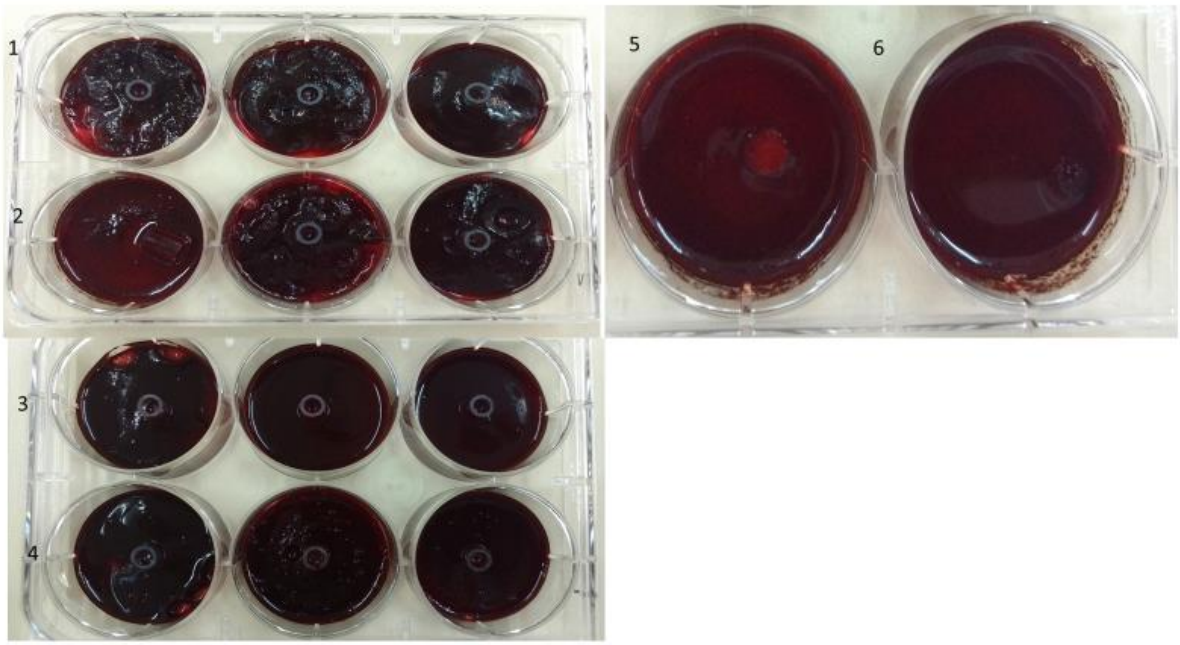
uma distribuição de células primordialmente isoladas. Estas células isoladas multiplicam-se por mitose e começam a formar pequenos agregados junto as nanopartículas. Ao mesmo tempo, observou-se ainda que as células migravam e se agregavam a outras células e aos agregados de nanopartículas. Como resultado deste processo, esses agregados aumentam de tamanho não só por meio de divisões celulares, mas também pela agregação de novas células que se movem em sua direção e pela união de agregados adjacentes contendo nanopartículas.

Os resultados de citotoxicidade das amostras sintetizadas de NPMs isoladas e a comparação entre os grupos controles no ensaio de MTT, decorrente do tempo de exposição de 24h nas concentrações de 1mg/mL e 2mg/mL de NPMs, não apresentaram valores significativos (viabilidade maior que 60%). Acredita-se que a cor escura da magnetita e elevada opacidade do meio agregados possa ter de alguma forma interferido nos resultados deste experimento. Por isto, optou-se por realizar os outros dois ensaios de toxicidade (difusão em ágar e azul de tripan) para confirmação dos resultados de viabilidade celular.

11.2.4 Ensaio de citotoxicidade por difusão em ágar

A figura 30 mostra os resultados do ensaio de citotoxicidade por difusão em ágar com os fibroblastos (Wi-26 VA4) semeados em placas de cultura de 6 poços na concentração de $5,5x10^4$ células/mL.

Figura 30 - Placas de 6 poços contendo amostras magnetita sintética e natural (1 e 2), magnetita não funcionalizada e funcionalizada (3 e 4), e poços utilizados para controle positivo e negativo (5 e 6).



Fonte: dados da pesquisa

Legenda:

1- Amostra magnetita sintética não funcionalizada
2- Amostra magnetita natural
3- Amostra magnetita sintética não funcionalizada
4- Amostra magnetita sintética funcionalizada
5-Controle Positivo Água Oxigenada
6-Controle Negativo Meio Emem

Como resultado das comparações entre grupos, se percebeu não haver atividade citotóxica das nanopartículas de magnetita com a concentração testada (5,5 x10^4 células/mL), observada pela não formação de halo ao redor da amostra aplicada no substrato. Apenas o controle positivo apresentou halo, devido a lise celular provocada pela água oxigenada. Já o controle negativo não apresentou halo. O controle positivo foi realizado com água oxigenada a 3% e para o controle negativo foi usado meio Emem. Quanto a graduação do efeito citotóxico observou-se ausência de descoramento ao redor ou sob a amostra (grau 0) indicando não haver quaisquer traços de toxicidade nas amostras ensaiadas.

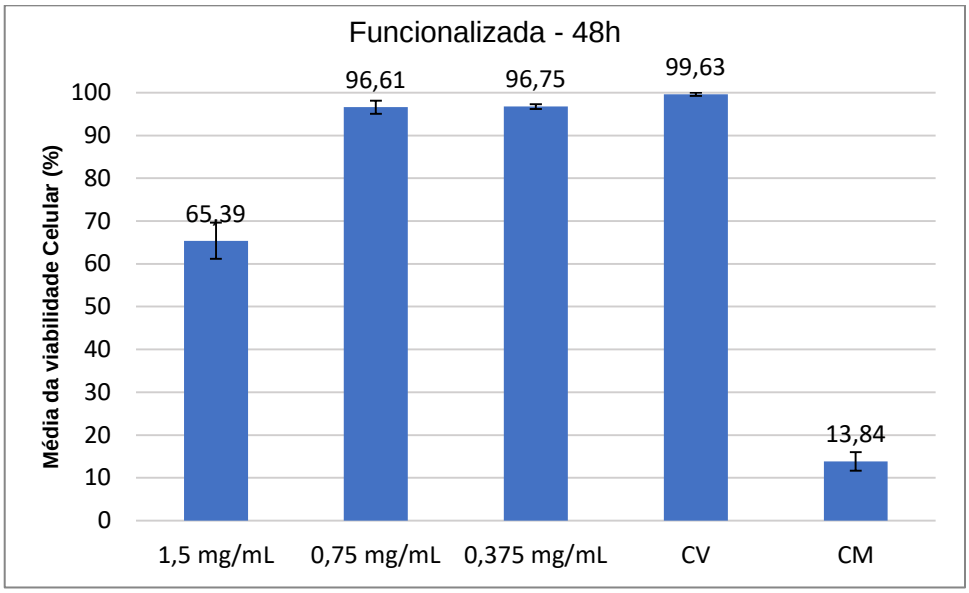
A literatura também demonstra que em experimentos realizados com fibroblastos de camundongo tratados com nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) em tempos de até 96 h e em concentrações inferiores a 10mg/mL,

observou-se uma viabilidade celular de 80% em relação ao controle (MAHMOUDI et al, 2012). Aparentemente este resultado parece ir na mesma direção dos resultados de ensaios de MTT, reforçando portanto, pelo ensaio de difusão em ágar, a baixa toxicidade das nanopartículas de magnetitas tanto funcionalizadas quanto não funcionalizadas. Hong et al. (2011) também testaram a resposta de nanopartículas de ferro com diversos grupos de cobertura acoplados, incluindo o citrato, em células de fibroblasto murino. A partir de seus resultados, concluíram que houve uma leve redução da viabilidade celular (15%) dose dependente. Segundo Cunha (2015) a citotoxicidade de NPMs depende de diversos fatores, incluindo o tipo celular em estudo. A densidade celular e a concentração de nanopartículas podem afetar o resultado da análise de toxicidade (JENG et al, 2006). Outros fatores como tipo celular, tempo de exposição e características como carga, tamanho e cobertura podem também parecem diferenciar os resultados da análise de citotoxicidade (MAHMOUDI et al, 2012).

11.2.5 Teste de Azul de Tripan

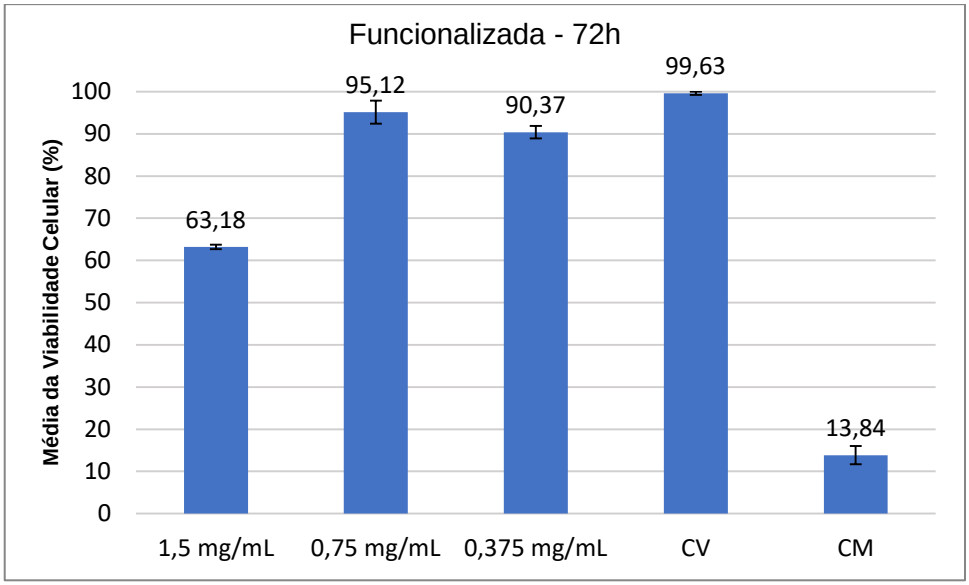
A seguir são apresentados os resultados dos ensaios biológicos realizados por técnicas *in vitro* utilizadas para investigação de citotoxicidade e viabilidade celular das nanopartículas de óxido de ferro funcionalizadas e não funcionalizadas. A viabilidade celular das amostras sintetizadas e funcionalizadas foram avaliadas pelo método de Azul de Tripan. A célula utilizada foi a RKO-AS45-1 (ATCC®CRL-2579™), o teste foi realizado em triplicata. Foi determinado para controle negativo o termo CV e para controle positivo o termo CM. O resultado da viabilidade celular foi expresso em percentual de células viáveis em relação às células totais (viáveis e não-viáveis). Os mesmos procedimentos foram realizados com placas incubadas por 48 e 72 horas (Gráficos 5 a 9).

Gráfico 5 - Média da viabilidade celular de amostra funcionalizada pós 48 h.



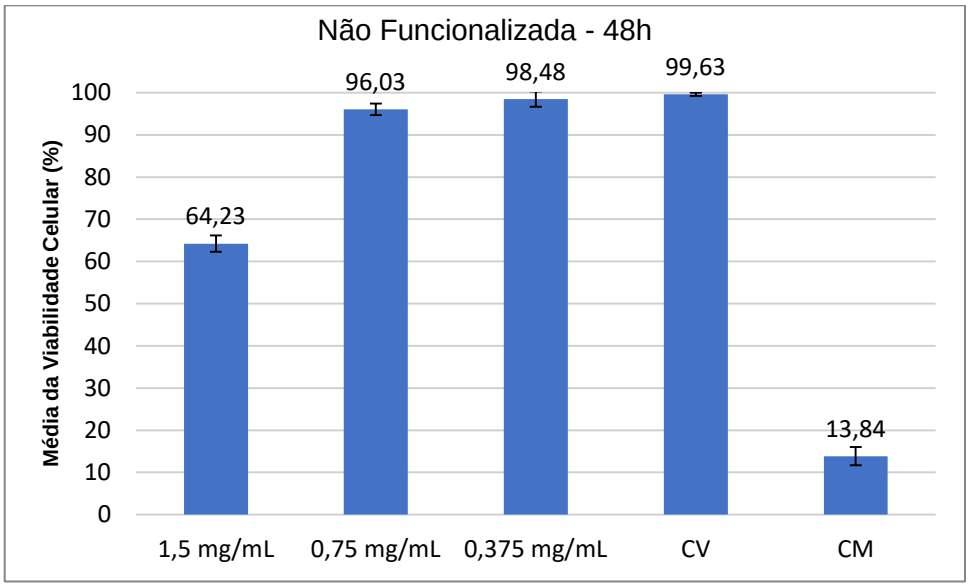
Fonte: dados da pesquisa

Gráfico 6 - Média da viabilidade celular de amostra funcionalizada pós 72 h



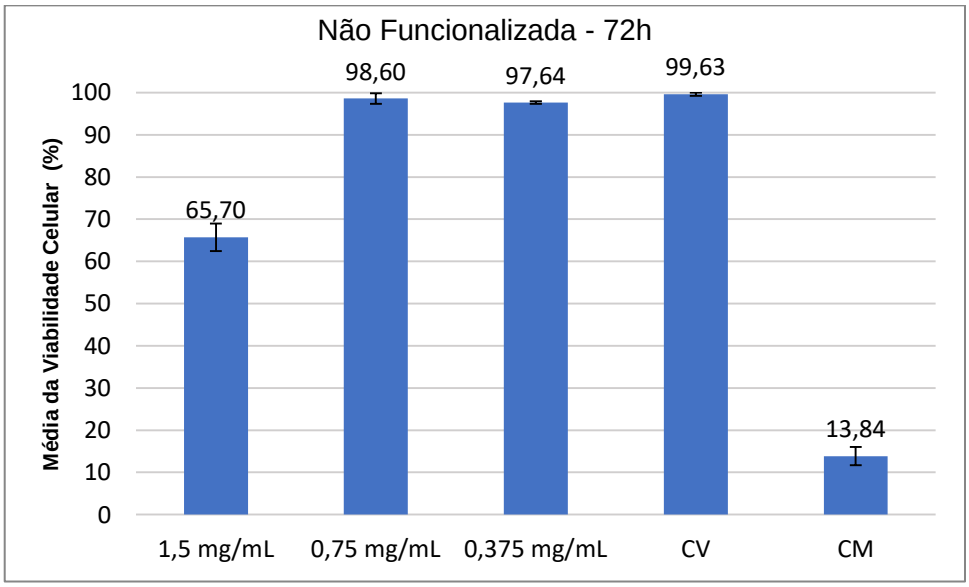
Fonte: dados da pesquisa

Gráfico 7 - Média da viabilidade celular de amostra não funcionalizada pós 48 h



Fonte: dados da pesquisa

Gráfico 8 - Média da viabilidade celular de amostra não funcionalizada pós 72 h



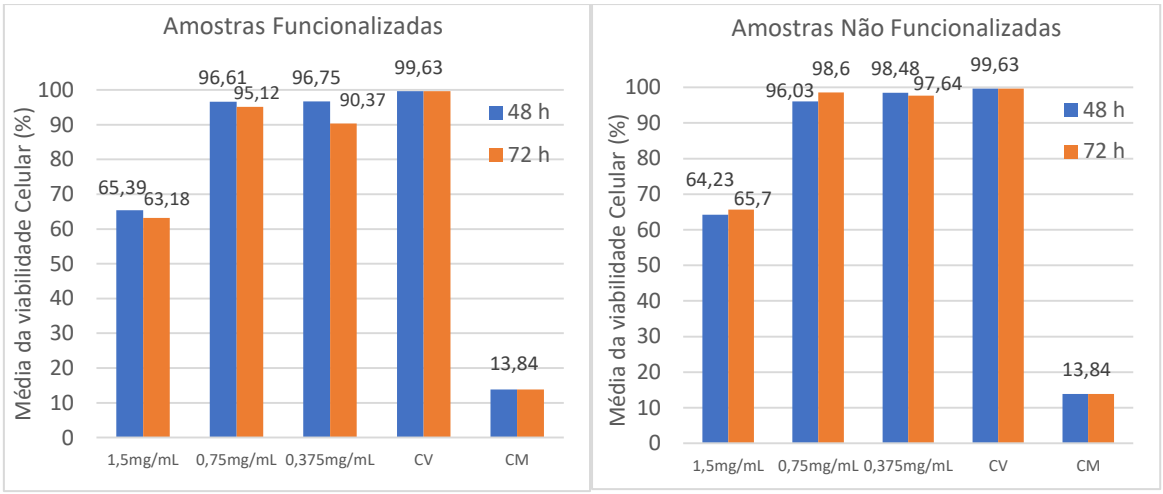
Fonte: dados da pesquisa

Observando a média da porcentagem de viabilidade celular de amostras funcionalizadas e não funcionalizadas pode-se afirmar que as magnetitas nas concentrações de 0,75mg/mL e 0,375mg/mL apresentaram nos dois tempos (48 e 72h) elevada viabilidade compatível a observada em relação ao controle com às células RKO-AS45-1 (ATCC®CRL-2579™). Houve razoável semelhança na comparação com as médias de viabilidade celular (com todos os resultados superior

a 90%) para as amostras 0,75mg/mL e 0,375mg/mL funcionalizadas ou não tempos de incubação 48 e 72 horas, embora observou-se uma ligeira redução na concentração de 0,375mg/mL.

Para o mesmo tempo de incubação (48-72 horas) a amostra funcionalizada com a concentração de 0,375mg/mL, apresentou ligeira redução com média de 90,37%. A amostra não funcionalizada apresentou para estes mesmos tempos e concentração viabilidade celular em média mais elevado de 97,64%, comparando tempos de incubação 48 e 72 horas, na concentração de 0,75mg/mL não se observou diferenças significativas. Por fim, para o mesmo tempo de incubação (48-72 horas), a amostra funcionalizada e não funcionalizada com a concentração de 1,5mg/mL apresentou as menores médias em torno de 63,18 a 65,7% indicando citotoxicidade moderada.

Gráfico 9 - Comparação da viabilidade celular entre amostras funcionalizadas e não funcionalizadas



Fonte: dados da pesquisa

Vendrame (2011), em teste de Azul de Tripan realizado com leucócitos na presença de magnetita mostra que a viabilidade celular foi maior que 95%, o que significa um que o efeito citotóxico não foi observado, assim como as magnetitas nas concentrações 0,75mg/mL e 0,375mg/mL ensaiadas neste trabalho.

Em recente estudo, Perecin (2016) mostra que houve alta viabilidade celular de células de câncer HELA e HepG2 quando expostas ao óxido de ferro, inclusive

algumas amostras apresentaram viabilidade celular maior do que o grupo controle (100%).

Segundo Cunha (2015), os ensaios de viabilidade requerem um certo cuidado na geração de falsos-positivos e para a obtenção de um resultado fiel, mais de uma técnica deve ser utilizada como, por exemplo, ensaios de integridade de membrana celular (Azul de Tripan e lactato desidrogenase – LDH). Portanto, neste estudo, foi também realizado o teste de viabilidade celular MTT para confirmar o resultado obtido por meio do ensaio de azul de tripan. Este resultado, portanto, corrobora o resultado anterior de que as nanopartículas funcionalizadas com ácido cítrico, nas concentrações e tempos testados não tiveram efeitos citotóxicos significativos e pouco afetaram a viabilidade celular.

Os efeitos citotóxicos de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com ácido cítrico, ainda são intensamente estudados e discutidos. Em estudos realizados até então, ainda não se chegou a um consenso sobre doses e tempos dependentes necessários para causar mortalidade celular expressiva (CUNHA, 2015).

As magnetitas sintetizadas mostraram viabilidade celular acima de 90% (diferenciação entre células vivas ou mortas) no ensaio de azul de tripan que possui alta confiabilidade, exceto na concentração 1,50mg/mL nos ensaios de 48 e 72h. Mesmo nas amostras não funcionalizada com ácido cítrico houve boa viabilidade celular. Sendo assim, é possível inferir que as amostras nas concentrações de 0,75mg/mL e 0,375mg/mL apresentam potencial para continuação dos estudos de tratamento de câncer.

12. CONCLUSÃO

O método de síntese por coprecipitação das magnetitas sintéticas se mostrou eficaz para obtenção em escala de bancada, sendo importante a manutenção de uma atmosfera inerte com N_2.

A funcionalização com ácido cítrico das nanopartículas não permitiu que as mesmas fossem totalmente desagregadas, o que poderá dificultar seu potencial terapêutico de hipertemia (ideal partículas menores que 50 nm), devido à dificuldade de excreção pelas vias do sistema renal. Apresentou razoável característica superparamagnética (uma ordem de grandeza abaixo), observada pelo ensaio de magnetização, e composição química confirmada pela espectroscopia Mössbauer da magnetita sintetizada, na seguinte proporção de fases, em massa: magnetita (Fe_3O_4) cerca de 45% e maghemita (γ–Fe_2O_3) da ordem de 55%.

As demais caracterizações físico-química da magnetita sintetizada revelaram que sua composição de fases é compatível com magnetitas encontradas na literatura. A magnetita sintética apresentou ao MEV uma distribuição de tamanhos de partículas bimodal com uma fração submicrométrica e outra da ordem 20 a 40 micrômetros.

A área superficial medida por BET foi de 86,129 m^2/g e pelo método BJH observou uma textura com microporos. Diante das isotermas obtidas pelo ensaio de BET é possível concluir que a amostra sintética apresenta comportamento do tipo V (pela IUPAC), onde o valor de C é menor que 2, ou seja, interações fracas e saturadas. O tipo de histerese do material sintético é classificado como H1, que indica uma distribuição de poros estreita e relativamente uniforme. A conclusão é dada pelo atraso do efeito de dessorção.

O ponto isoelétrico das partículas foi obtido em pH 6, com potencial de zeta indicando forte aglomeração em pH variando de 4,5 a 8. A funcionalização com ácido cítrico teve efeito parcial na desagregação de partículas dos clusters. A aglomeração das partículas foi um limitador relacionado possivelmente a rota de síntese, uma moagem será necessária para atingir uma distribuição contendo apenas nanopartículas, o que elevaria a magnetização (propriedades

superparamagnéticas) e a biofuncionalidade terapêutica pela facilidade de excreção das nanopartículas.

As magnetitas sintetizadas mostraram viabilidade celular superior a 90% no ensaio de azul de tripan que possui no caso destas amostras aparentemente melhor confiabilidade (em relação aos ensaios de MTT e/ou difusão em ágar), exceto na concentração 1,50mg/mL nos ensaios de 48 e 72h com Azul de Tripan que apresentaram viabilidade da ordem de 65%, ou seja moderada toxicidade. Mesmo nas amostras não funcionalizadas com ácido cítrico, houve boa viabilidade celular. Sendo assim, é possível inferir que as amostras mesmo não possuindo características e tamanhos majoritariamente nanométricos, poderiam ser cominuidas por moagem, e assim teriam potencial para o uso terapêutico no tratamento de câncer.

13. SUGESTÃO DE TRABALHOS FUTUROS

Completar as caracterizações físico-químicas de amostras de magnetita funcionalizadas, mediante as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET), avaliando também seu comportamento térmico através da análise termogravimétrica (TGA), e da calorimetria diferencial de varredura (DSC).

Aprimorar a funcionalização com outros agentes dispersantes das nanopartículas.

Avaliação de citotoxicidade de amostras de magnetita funcionalizadas com outros agentes químicos, através de MTT, difusão em ágar, com amostras dissolvidas em solução PBS.

Avaliação da performance em estudos clínicos das amostras de magnetita funcionalizadas para hipertermia, e liberação de drogas encapsuladas com quitosana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em < http://portal.anvisa.gov.br > Acesso em: 08 abr.2017

ALVES, E. M. A.; GUIMARÃES, A. C. R**. Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde –** Rio de Janeiro: EPSJV/IOC, v. 2, 2010.

ANDRA, W. et al. Temperature distribution as function of time around a small spherical heat source of local magnetic hyperthermia. **Journal of magnetism and magnetic materials**, v.194, p. 197-203, 1999.

ANDRADE, V. et al. Qualidade de vida de pacientes com câncer hematológico em tratamento quimioterápico. **Revista da Escola de Enfermagem**, v. 47, p. 355-361, 2013.

ARRUEBO, M.; FERNANDEZ-PACHECO, R.; IBARRA, M. R.; SANTAMARÍA, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. **Nano Today**. v.2, n. 3, p.22-32, 2007.

AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Disponível em < https://www.atcc.org > Acesso em: 11 jan.2017.

BARNETO, I.C., et al. Toxicidad de la quimioterapia. In: DIAZ-RUBIO, E.; GARCÍA-CODE, J. **Oncología clínica básica**. Madrid: Aran Ediciones, S.A. p. 247-258, 2000.

BATLLE, X., LABARTA, A., Finite-size effects in fine particles: magnetic and transport properties. **J. Phys. D: Appl. Phys**., v. 35, p. 15–42, 2002.

BECYTE, V. et al. Study of magnetic and structural properties of cobalt-manganese ferrite nanoparticles obtained by mechanochemical synthesis. **Materials Chemistry and Physics.** Lituânia, n. 172, p. 6-10, 2016.

BÊDE, P. M. **Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para aplicações biomédicas.** 2010 – Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) – Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2010.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not. **Journal of controlled release**. Irlanda, n. 235, p. 337-351, 2016.

BRUNDLE, C. A.; EVANS, W. W. **Encyclopaedia of materials characterization**. 1992.

CALABRESI, P., CHABNER, B.A. Quimioterapia das doenças neoplásicas. In: GOODMAN, L. S.; GILMAN, L. S. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10.ed. Rio de Janeiro, R.J.: McGraw-Hill, 2003.

CALLISTER, W. D. J. **Ciência e engenharia de materiais:** uma introdução.5.ed. Rio de Janeiro, R. J.: LTC, 2002.

CÂMARA, B. Conhecendo a câmara de Neubauer. Disponível em: < https://www.biomedicinapadrao.com.br/2013/10/conhecendo-camara-de-neubauer.html > Acessado em: 11 jan.2017.

CASTRO, V.F. et al. Propriedades magnéticas e biocompatíveis de nanocompósitos para utilização em magneto-hipertermia. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 4, p. 79-82, 2010.

CERVANTES, A. Principios generales de la quimioterapia antineoplásica. In: **Manual de terapéutica médica**. Barcelona: RODES, J.; CARNE, X.; TRILLA, A. Masson, p. 909-918, 2002.

CHADHA, R. et al. Drug carrier systems for anticancer agents: a review. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 185-197, 2008.

CIOFANI, G., RIGGIO, C., RAFFA, V., MENCIASSI, A., CUSCHIERI, A. A bi-modal approach against cancer: magnetic alginate nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia. **Med. Hypotheses** v.73, p. 80-82, 2009.

COTICA, L.F. et al. Mechanical milling of the (alpha-Fe_2O_3)(x)(alpha-Al_2O_3)(1-x) system: an X-ray diffraction and Mössbauer spectral study. **Solid State Ionics**, v.171, p. 283-288, 2004.

CUNHA, M. C. P. C. **Efeitos das nanopartículas de maghemita estabilizadas com citrato em células de carcinoma submandibular humano in vitro**. 2015. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Universidade de Brasília – UNB, Brasília, 2015.

DUARTE, E. V. **Síntese e caracterização de nanopartículas baseadas em óxido de ferro**. 2005. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2005.

DYAR, M. D.; AGRESTI, D. G.; SCHAEFER, M. W.; GRANT, C. A.; SKLUTE, E. C. Mössbauer spectroscopy of Earth and planetary materials. **Annual Reviews of Earth and Planetary Science.** Massachusets, EUA. n. 34, p. 83-125. Jan 2016.

EFFENBERGER, F. B. **Nanomateriais magnéticos para aplicações em terapia e imagem**. 2012- Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2012.

FARAJI, A. H., WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. Bioorgan. **Med. Chem**. v. 17, p. 2950-2962, 2009.

FÉLIX, L. L. **Síntese e caracterização de nanopartículas de magnetita com e sem recobrimento de ouro para aplicações em hipertermia magnética**. 2017- Tese (Doutorado em Física) – Universidade de Brasília – UNB, Brasília, 2017.

FERREIRA, R. V. **Síntese e caracterização de magnetolipossomas termossensíveis contendo fármacos antitumorais encapsulados**. 2013. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2013.

FONTANIVE, V. C. P. et al. Aspectos físicos e biológicos de nanopartículas de ferritas magnéticas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.35, p.549-558, 2014.

FREITAS, R.A. What is nanomedicine? **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine,** v. 1, p. 2-9, 2005.

FUNGARO, D.A et al. Remoção de íons zn2+, cd2+ e pb2+ de soluções aquosas usando compósito magnético de zeólita de cinzas de carvão. **Química e Meio Ambiente**, v.33, n.6, p.1275-1278, 2010.

GALINDO, N. et al. Prevención y protocolo de urgencia ante la extravasación de quimioterapia antineoplásica por vías periféricas. **Cancerologia**, v.5, p. 7-16, 2010.

GAOA, J., Xu B. Applications of nanomaterials inside cells. **Nano Today**, v.4, p. 37-51, 2009.

GOTIC, M.; MUSIC, S. Mössbauer, FT-IR and FE SEM investigation of iron oxides precipitated from $FeSO_4$ solutions. **Journal of Molecular Structure.** Croatia, p. 445-453. Jan. 2007

GUBIN, S.P. et al. Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties. **Russian Chemical Reviews**. v. 74, n. 6, p. 489-520, 2005.

GUIBERT, C.; FRESNAIS, J.; PEYRE, V.; DUPUIS, V. Magnetic fluid hyperthermia probed by both calorimetric and dynamic hysteresis measurements. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials.** Paris, n. 421, p. 384-392, 2016.

GUPTA, A. K., GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, p. 3995–4021, 2005.

HAMIDI, M., AZADI, A., RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Adv. Drug Deliver**. Rev. v. 60, p.1638-1649, 2008.

HERGT, R.; ANDRA, W. Magnetic hyperthermia and thermoablation. In: ANDRA, W; NOWAK, H. **Magnetism in Medicine**. A Handbook. Weinheim. WILEY-VCH, p. 550 567, 2007.

HERGT, R. et al. Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. **Journal of Physics: Condensed Matter**, v.18, p. 2919, 2006.

HONG, S. C. et al. Subtle cytotoxicity and genotoxicity differences in superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with various functional groups. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p.3219-3231, 2011.

HUBER, D. L. Synthesis, properties, and applications of iron nanoparticles. **Small,** v.1, n. 5, p. 482 –501, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Disponível em < http://www1.inca.gov.br/ > Acesso em: 28 mai. 2017.

JENG, H. A.; SWANSON, J. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. **Journal of Environmental Science and Health**. Part A, Toxic/hazardous Substances & Environmental Engineering, v. 41, p. 2699–2711, 2006.

JOOS, A.; RÜMENAPP, C.; WAGNER, F. E.; GLEICH, B. Characterization of iron oxide nanoparticles by Mössbauer spectroscopy at ambient temperature. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials.** Alemanha, n. 399, p. 123-129, 2015.

KARUNAKARAN C.; SENTHILVELAN S. **Electrochem. commun**. 8 ed., v 1, 95 p. 2006.

KIM, D. H., NIKLES, D. E., JONHSON, D. T., BRAZEL, C. S. Heat generation of aqueously dispersed $COFe_2O_4$ nanoparticles as heating agents for magnetically activated drug delivery and hyperthermia. **J. Magn. Magn. Mater**. v.320, p.2390-2396, 2008.

KIM, W.; SUH, C.; CHO, S.; ROH, K.; KWON, H.; SONG, K.; SHON, I. A new method for the identification and quantification of magnetite-maghemite mixture using conventional X-ray diffraction technique. **Talanta.** Elsevier. Mar, 2012.

LACAVA, L.M., et al. Long-term retention of dextran-coated magnetite nanoparticles in the liver and spleen. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, p .272 -276, p. 2434–2435, 2004.

LEE, N.; HYEON, T. Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 2575-2589, 2012.

LIU, H., GAO, L., Preparation and properties of nanocrystalline α-Fe_2O_3-sensitized TiO_2 nanosheets as a visible light photocatalyst. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 89, p. 370–373, 2006.

LOWELL, S.; SHIELDS, J. E. **Powder surface area and porosity.** New York: Chapman & Hall. 250 p. 1998.

MONTORO, L. A. **Caracterização de materiais:** gas sorption. UFMG, Belo Horizonte, 2015.

MAGALHÃES, F. **Síntese e caracterização de óxidos de ferro e compósitos para aplicações no tratamento redox de efluentes aquosos**. 2008. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2008.

MAHMOUDI, M. et al. Assessing the in vitro and in vivo toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Chemical Reviews**, v.112, p. 2323–2338, 2012.

MARTINS, P. M. A. **Produção e caraterização de nanopartículas magnéticas para aplicação biotecnológica** - Dissertação (Mestrado em Micro e Nano tecnologias) - Universidade do Minho, Portugal, 2011.

MOURA, L.M. **Produção, caracterização e avaliação da biocompatibilidade de blendas de PLGA e PHB.** 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais)-Centro Federal Tecnológico de Minas Gerais – CEFET –MG, Belo Horizonte, 2014.

NAMDURI, H.; NASRAZADANI, S. Quantitative analysis of iron oxides using Fourier transform infrared spectrophotometry. **Corrosion Science**, 2008. n. 50. p. 2493-2497. Jul. 2008.

NAGAHARA, L. A.; FERRARI, M.; GRODZINSKI, P. Nanofunctional Materials in Cancer Research: Challenges, Novel Methods, and Emerging Applications. **M R S Bulletin**, v. 34, p. 406-409, 2009.

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

ORÉFICE, R. L., PEREIRA, M. M., MANSUR, H. S. **Biomateriais**: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Ed. Cultura Médica, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Disponível em: < http://www.who.int/cancer/en > Acesso em: 26 mar. 2016.

ORTEGA, A. S. V. **Sistema de liberación de fármacos antineoplásicos basados en nanopartículas sitio-dirigidas con campos magnéticos.** 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências ênfase em Fármácia) - Universidade Autónoma de Nuevo León, Faculdade de Ciências Químicas, México, 2014.

OSORIO, G., ALARCÓN, G., MAJILIS, A. Hematología. **Diagnóstico y terapéutica. publicaciones técnicas mediterráneo**, p.625-665, 2008.

PANKHURST, Q. A. et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **J. Phys. D: Appl. Phys.**, v. 36, p. 167–181, 2003.

PARTITI, C. S. M. **Avanços metodológicos: espectroscopia Mössbauer na análise de óxidos e hidróxidos de ferro.** In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 30 ed. 2005.

PERECIN, C. J. **Nanopartículas superparamagnéticas encapsuladas com polímeros para tratamento de câncer por hipertermia.** 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

RIBEIRO, T. G. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxidos mistos de $MnFe_2O_4$ recobertas com quitosana:** estudos da influência da dopagem com Gd3+ nas propriedades estruturais e magnéticas. 2008. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

RINALDI, C. et al. Applications of magnetic nanoparticles in medicine: magnetic fluid hyperthermia. **PRHSJ**, v. 28, n. 3, 2009.

RIFFLE, J. S. et al. Magnetic nanostructured fluids. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v. 223, p. D38-D39, 2002.

RODRIGUES, E. C. S. **Síntese e caracterização de nanocompósitos de partículas de α-Fe, wüstita e magnetita para aplicações biomédicas**. 2017- Tese (Doutorado em Física) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

ROSEN, J. E. et al. Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 3, p. 275-290, 2012.

SALABAS, Lu, A., SCHTH, E. L., F., Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization and application. **Angew. Chem**. **Int**. v. 46, p. 1222–1244, 2007.

SANTANNA, Y.V.B. et al. Structural, microstructural and magnetocaloric investigations in high-energy ball milled $Ni_{2.18}$ $Mn_{0.82}$ Ga powders. **Solid State Communications**., v. 148, p. 289-292, 2008.

SANTOS, E. S.; GAMA, E. M.; FRANÇA, R. S.; SOUZA, A. S.; MATOS, R. P. Espectrometria de fluorescência de raios-X na determinação de espécies químicas. **Enciclopédia Biosfera,** Goiânia, v.9, n.17, p.3413, dez. 2013.

SCHARDOSIM, M.G. **Confecção de estruturas tubulares permeáveis de PLGA**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) - Pontifícia Universidade Católica – PUC – RS, Porto Alegre, 2014.

SCHMALZ, G. Agar overlay method. **International Endodontic Journal**, v.21, p. 59-66, 1988.

SCHWERTMANN, U.; CORNELL, R.M. **The Iron Oxides**: structure, properties, occurences and uses. Weinheim; WILEY-VCH, 664p. 2003.

SILVA, M. F. et al. Quantification of maghemite nanoparticles. In: SHÜTT, W. et al. **Scientific and clinical applications of magnetic carriers**: an overwiew. New York: Plenum, v. 171, 1997.

SINGH, L. H.; GOVINDARAJ, R.; MYTHILI, R.; AMARENDRA, G. Stability and magnetic interactions between magnetite nanoparticles dispersed in zeolite as studied using Mössbauer spectroscopy. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials.** Kalpakkam, India, 2016.

SOUZA, A. T. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para aplicações biomédicas – um estudo citotóxico em linhagem celular de carcinoma cervical humano (células HeLa)**. 2011. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2011.

SOUZA, K. C. **Síntese e caracterização de nanopartículas e nanocompósitos magnéticos para aplicações biomédicas**. 2011.Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2011.

SUN, C.; LEE, J. S. H.; ZHANG, M., Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1252-1265, 2008.

SUN, S. et al. Monodisperse MFe_2O_4 (M= Fe, Co, Mn) nanoparticles. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 126, n. 1, 2004.

THANH, N. T. **Magnetic nanoparticles from fabrication to clinical aplications**. Taylor & Francis Group, 2012.

THOMMES, M.; SMARSLY, B.; GROENEWOLT, M.; RAVIKOVITCH, P. I.; NEIMARK, A. V. Adsorption hysteresis of nitrogen and argon in pore network and characterization of novel micro- and mesoporous silicas. **Langmuir,** New Jersey, v. 22, p. 756-764, 2005.

VENDRAME, S. C. **Síntese, caracterização e análise de citotoxicidade de nanopartículas de magnetita para aplicações biomédicas**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual do Centro-oeste, Guarapuava, 2011.

WASEDA, Y.; MATSUBARA, E.; SHINODA, K. **X-ray diffraction crystallography: introduction, examples and solved problems.** Sendai, Japão: Springer, 322p. 2011.

YANG, C. et al. Surface functionalization and characterization of magnetic polystyrene microbeads. **Langmuir**, v. 24, n. 16, p. 9006-9010, 2008.

ZOTTIS, A. D. **Síntese, caracterização e testes in vitro de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 para atuarem como agentes de contrastes negativos t2 para o diagnóstico de câncer de mama.** 2015. Doutorado (Doutorado em Química Inorgânica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.